

· 组学研究 ·

基于 iTRAQ 技术的安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠蛋白质组学研究

罗蔚, 唐友明, 韩叶芬, 吴德坤, 牛豫洁, 夏泽, 韦维, 郑景辉(广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011)

摘要: **目的** 应用 iTRAQ 蛋白质组学技术鉴定筛选安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异表达蛋白, 初步探讨安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠的分子作用机制。**方法** 采用乙酸法配合多因素复合模拟中医病因制备胃溃疡肝郁脾虚证大鼠模型, 提取胃黏膜原代细胞进行培养, 制备安胃汤含药血清对其进行干预, 采用 iTRAQ 技术鉴定筛选差异蛋白。通过 DAVID、KEGG、VISANT 和 STRING 数据库对差异蛋白进行注释、富集分析、信号转导通路分析和蛋白质相互作用分析, 并对其中的关键蛋白通过 Western Blot 实验进行验证。**结果** 安胃汤组与对照组之间共有 59 个差异表达蛋白, 生物信息学分析显示其主要参与 53 种生物学过程, 10 种细胞组分, 16 类分子途径, 以及 74 条信号转导通路; Western Blot 验证实验结果与 iTRAQ 蛋白质组学结果基本一致。**结论** 基于 iTRAQ 蛋白质组学可筛选出安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞相关蛋白 (Akt1、Jak1、Jak2、Plcb3、Adrb2、Stat2、Prkcg、Plcb4、Ptpn2、Chrm3 及 Ifngr1), 初步分析提示其与胃溃疡的多种细胞生物学活动有关。

关键词: 安胃汤; 胃溃疡; 胃黏膜细胞; 肝郁脾虚证; 蛋白质组学; 生物信息学

中图分类号: R285.5; R857.3 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2019)01-0072-10

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2019.01.012

iTRAQ Based Proteomics Study of Anwei Decoction on Gastric Ulcer with Liver Depression and Spleen Asthenia Syndrome in Rats

LUO Wei, TANG Youming, HAN Yefen, WU Dekun, NIU Yujie, XIA Ze, WEI Wei, ZHENG Jinghui (Ruikang Affiliated Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011 Guangxi, China)

Abstract: Objective To detect protein expression differences in gastric mucosal cells with gastric ulcer with liver-depression and spleen-deficiency syndrome after treatment with *Anwei* decoction and to preliminarily explore the molecular biological mechanism. **Methods** The rat model of gastric ulcer with liver stagnation and spleen deficiency syndrome was prepared by acetic acid combined with multi-factor simulation method of TCM etiology. The gastric mucosal cells of the rat model were isolated and intervened by serum containing *Anwei* decoction. The altered proteins in gastric mucosal cells were identified by iTRAQ, the biochemical pathways and regulatory networks were analyzed with DAVID, GO, KEGG, VISANT and STRING databases. Key proteins were verified by Western Blot. **Results** Fifty-nine differentially expressed proteins were found between the *Anwei* decoction group and the control group. Bioinformatics analysis showed that 59 differentially expressed proteins were mainly involved in 53 biological processes, 10 cell components, 16 molecular pathways and 74 signal transduction pathways. Most results of Western Blot verification tests are the same as those of iTRAQ proteomics. **Conclusion** The differentially expressed

收稿日期: 2018-01-28

作者简介: 罗蔚, 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物信息学在中医药研究中的应用。Email: luowei21122044@126.com。通信作者: 唐友明, 男, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 消化系统疾病的中医药防治研究。Email: tang530011@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360533); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118140)。

proteins (Akt1, Jak1, Jak2, Plcb3, Adrb2, Stat2, Prkcg, Plcb4, Ptpn2, Chrm3 and Ifngr1) in gastric mucosal cells with gastric ulcer coupled liver-depression and spleen-deficiency syndrome intervened by *Anwei* decoction was screened by iTRAQ proteomics. The preliminary analysis suggests that it is related to various cellular biological activities of gastric ulcers, which is a mechanism worthy of further study for the action of *Anwei* decoction.

Keywords: *Anwei* decoction; gastric ulcer; gastric mucosal cell; syndrome of liver-depression and spleen-deficiency; proteomics; bioinformatics

胃溃疡(Gastric ulcer, GU)的总发病率约为人口的 10% 左右^[1], 常常反复发作、迁延难愈。胃溃疡在中医学中属“胃脘痛”“痞满”等范畴, 肝郁脾虚是胃溃疡的主要病机。安胃汤为全国名老中医林沛湘教授的经验方, 寒热并用, 活血行气, 畅通气机, 治疗慢性胃溃疡疗效确切^[2-3]。蛋白质组学能够从“整体”的角度对蛋白质的变化进行鉴定和分析^[4], 与中医学的“整体观”“辨证观”有相合之处。本研究拟利用蛋白质组学方法联合生物信息技术筛选安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白, 探讨安胃汤治疗胃溃疡的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠, 3 月龄, 130 只, 体重(150±20)g, SPF 级, 购于广西医科大学, 动物许可证号: SCXK 桂 2014-0002。

1.2 药物及主要试剂 安胃汤组方: 白芍 20 g, 半夏 13 g, 百合 20 g, 丹参 15 g, 干姜 5 g, 乌药 7 g, 薏苡仁 10 g, 黄连 5 g, 炙甘草 5 g。中药饮片均购自广西中医药大学附属瑞康医院中药房, 经广西中医药大学附属瑞康医院药剂科黄小鸥副主任中药师鉴定为正品。按照安胃汤配伍比例, 每剂药物加 10 倍量蒸馏水, 浸泡 30 min, 武火煎煮 3 min, 改用文火保持微沸继续煎煮至 30 min 结束, 倒出药液用纱布过滤, 重复煎煮 2 次, 合并滤液, 水浴挥发浓缩至 1.03 g·mL⁻¹, 4 ℃冰箱贮存备用。特级胎牛血清, 批号: GVH0078, 购自北京 Hyclone 公司; 蛋白抽提试剂盒, 批号: 20160914, 购自南京建成生物科技有限公司; BCA 蛋白定量试剂盒, 批号: P0009, 购自上海碧云天生物有限公司; 抗体 Akt1 (批号: ab81283)、Jak1 (批号: ab133666)、Jak2 (批号: ab219728)、Plcb3 (批号: ab228794)、Adrb2 (批号: ab182136)、Stat2 (批号: ab53132), Prkcg (批号:

ab179522), 购自英国 Abcam 公司; 抗体 Plcb4 (批号: sc-136041), 购自美国 Santa Cruz 公司; 抗体 Ptpn2 (PA5-76059), 购自美国 Thermo Fisher 公司; 硝酸纤维素膜、化学发光 ECL、RIPA 裂解液、考马斯亮蓝等均购武汉博士德生物有限公司; iTRAQ 8-plex 标记试剂盒, 购自美国 AB SCIEX 公司。

1.3 主要仪器 LC-20AD 型液相色谱仪, 日本岛津公司; Triple TOF 5600 型质谱分析仪、纳升电喷雾离子源, 美国 AB SCIEX 公司; Zorbax 强阳性离子交换柱, 美国 Agilent 公司; Eps300 型电泳仪、垂直电泳槽、转膜装置, 上海天能科技有限公司; GC-800 型光密度扫描仪分析系统, 美国 BIO-RAD 公司; Epoch 2 型全波长酶标仪, 美国 Biotek 公司。

1.4 模型复制 参考文献方法^[4], 以乙酸法配合多因素复合模拟中医病因来制备胃溃疡肝郁脾虚证大鼠模型。方法如下: ①取大鼠 30 只, 每日上午以每只 3 mL 灌服大黄制剂液; ②每日上午以木夹夹大鼠尾中部 30 min; ③每日下午将动物负重: 于大鼠尾根部缠绕质量为该大鼠体质量 10% 的保险丝, 放入水深 50 cm、水温 28 ℃的水槽中游泳, 以力竭为度, 即大鼠鼻尖没入水面 10 s。共 14 d。④第 15 天禁食, 于禁食 24 h 后, 水合氯醛麻醉下施行剖腹术, 打开腹腔, 暴露胃体, 在富有腺体的部位注射 50% 的冰乙酸 0.05 mL, 针头与注射部位呈 15°角, 回纳胃体, 关闭腹腔。禁食, 不禁水。

1.5 胃窦部胃黏膜上皮细胞原代培养 无菌条件下取肝郁脾虚证模型大鼠胃窦部新鲜黏膜, 放入 D Hanks 液中, 稍作洗涤, 移入消化酶中剪碎, 37 ℃磁性搅拌, 低速离心, 去上清, PBS 重悬后常规培养。

1.6 含药血清制备 选取雄性 Wistar 大鼠 50 只, 适应性喂养 1 周后, 灌胃给予安胃汤, 给药剂量按照体质量 60 kg 成人剂量的 6.17 倍^[5]计算为 10.3 g·kg⁻¹, 连续灌胃 5 d; 另设空白组大鼠 50 只, 灌胃给予等量生理盐水。给药结束后, 无菌操作下取大鼠

下腔静脉血, 37 ℃静置 1 h, 300×g 离心 15 min, 取上清液, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -20 ℃保存备用。

1.7 含药血清最大无毒浓度(TC₀)的计算 细胞悬液的配制选用经 0.25%胰酶消化后的对数生长周期的第 4 代胃黏膜细胞, 浓度为 1×10⁴·mL⁻¹, 接种于 96 孔板。实验组分别加入终浓度含安胃汤含药血清为 50%、25%、12.5%、6.25%、3.13%、1.56%、0.78%、0.39%、0.19%、0.10%的诱导培养液各 20 μL, 再加入胎牛血清培养液 180 μL(体积分数为 10%), 细胞对照组不添加任何药物, 仅加 200 μL 基础细胞培养液, 设置空白对照。每个浓度设 4 个复孔, 分别培养 24、48、72 h 后, 加入 MTT, 上酶标仪在 570 nm 处检测吸光度(A)值。计算细胞破坏百分率(%)= $(A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{实验组}}) / (A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白对照}}) \times 100\%$ ^[6], 采用二次回归曲线推算该药的无毒剂量应为细胞破坏率小于 5%的药物浓度。

1.8 含药血清的干预 选取同批同代对数生长期细胞, 0.25%不含 EDTA 的胰酶消化, 离心弃上清, 加入完全培养基混悬细胞, 接种于 25 cm² 的培养瓶, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞贴壁后, 以不含血清的 DMEM 培养液洗脱 24 h。实验分 2 组, ①安胃汤组: 大鼠胃黏膜上皮细胞培养液中加入 7.08%安胃汤含药血清进行干预; ②对照组: 大鼠胃黏膜上皮细胞培养液中加入 7.08%的空白组血清干预。置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱干预 24 h。换液, 培养 48 h 后收集各组细胞提取总蛋白, 用于蛋白质组学和 Western Blot 检测。

1.9 蛋白质组学检测及分析

1.9.1 细胞总蛋白的提取 吸掉细胞培养液, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 25 cm² 的培养瓶中加入 2 mL 裂解液; 然后分别添加终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 PMSF, 2 mmol·L⁻¹ 的 EDTA, 5 min 后, 添加终浓度 10 mmol·L⁻¹ 的 DTT, 超声 15 min; 然后 25 000×g 离心 20 min, 取上清。上清加入 5 倍体积预冷丙酮, 在 -20 ℃沉淀 2 h, 然后 16 000×g 离心 20 min, 弃上清。取适量沉淀, 加入适量蛋白裂解液溶解, 然后分别添加终浓度为 1 mmol·L⁻¹ 的 PMSF, 2 mmol·L⁻¹ 的 EDTA, 5 min 后, 添加终浓度 10 mmol·L⁻¹ 的 DTT。超声 15 min, 然后 25 000×g 离心 20 min, 取上清。上清液在 56 ℃条件下加入终浓度 10 mmol·L⁻¹ 的 DTT 处理 1 h, 还原打开二硫键。加入终浓度 55 mmol·L⁻¹ 的 IAM, 暗室静置 45 min, 进行半胱氨酸的烷

基化封闭。加入 5 倍体积冷丙酮, 在 -20 ℃静置 2 h。25 000×g 离心 20 min, 丢弃上清液。沉淀在 200 μL 0.5 mol·L⁻¹ TEAB 中超声溶解 15 min。25 000×g 离心 20 min 后, 取上清液用于 Bradford 法蛋白质浓度定量。

1.9.2 蛋白质酶解及 iTRAQ 标记 每组样品取 100 μg 蛋白, 按蛋白-酶(20:1)的比例加入 Trypsin, 37 ℃酶解 4 h; 按上述比例再补加 Trypsin 1 次, 37 ℃继续酶解 8 h。用真空离心泵抽干肽段, 0.5 mol TEAB 复溶肽段。对照组 9 例样品标记为 iTRAQ 试剂 113、114、116, 安胃汤组 9 例样品分别标记为 117、118、119, 室温培养 2 h。

1.9.3 蛋白质的液相分离 采用岛津 LC-20AB 液相系统、UltremexSCX 分离柱(4.6 mm×250 mm)对样品进行液相分离。将标记后抽干的混合肽段用 4 mL buffer A(25 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄ in 25% ACN, pH2.7)复溶。进柱后以 1 mL·min⁻¹ 的速率进行梯度洗脱: 先在 5% buffer B(25 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 1 mol·L⁻¹ KCl in 25% ACN, pH2.7)中洗脱 7 min, 然后 20 min 的直线梯度使 buffer B 由 5% 上升至 60%, 最后在 2 min 内使 buffer B 的比例上升至 100% 并保持 1 min, 然后恢复到 5% 平衡 10 min。整个洗脱过程在 214 m 吸光度下进行监测, 经过筛选得到 12 个组分。每个组分分别用 StrataX 除盐柱除盐, 然后冷冻抽干。

1.9.4 LC-ESI-MS/MS 分析 将抽干的每个组分分别用 buffer A(5% ACN, 0.1%FA)复溶至约 0.5 μg·μL⁻¹ 的浓度, 20 000×g 离心 10 min。每个组分上样 5 μL (约 2.5 μg 蛋白), 通过日本岛津公司 LC-20AD 型纳升液相色谱仪进行分离; 所用柱子柱包括 Trap 柱和分析柱 2 部分; 使用机器为 Triple TOF 5600 型(AB SCIEX, Concord, ON), 离子源为 Nanospray III source(AB SCIEX, Concord, ON), 放射器为石英材料拉制的喷针(New Objectives, Woburn, MA)。数据采集时, 机器的参数设置如下: 离子源喷雾电压 2.5 kV, 氮气压力为 30 psi(14.5 psi ≈ 1 bar), 喷雾气压 15 psi, 喷雾接口处温度 150 ℃; 扫描模式为反射模式, 分辨率 ≥ 30 000; 在一级质谱中积累 250 ms 并且只扫描电荷为 2⁺~5⁺ 的离子; 挑选其中强度超过 120 cps 的前 30 个进行扫描, 3.3 s 为一个循环; 第二个四极杆(Q2)的传输窗口设置为 100 Da 处效率为 100%; 脉冲射频电的频率为 11 kHz; 检测器

的检测频率为 40 GHz；每次扫描的粒子信号以 4 个通道分别记录，共 4 次后合并转化成数据；离子碎裂的能量设置为 (35 ± 5) eV；母离子动态排除设置为：在一半的出峰时间内(约 15 s)，相同母离子的碎裂不超过 2 次。

1.9.5 蛋白质鉴定及定量 应用 Mascot 2.3.02 软件(Matrix Science)进行蛋白质的鉴定。所使用数据库为 IPI 大鼠蛋白数据库，以 mgf 文件进行数据库搜索。各参数选择如下，搜索类型：MS/MS lonsearch，酶：Trypsin，数据库：IPI 大鼠蛋白数据库 [IPI_3.87 (39925 sequences)]，片段质量容差：0.1 Da，蛋白质量容差：0.05 Da。依据蛋白质丰度水平，当差异倍数达到 0.8 或者 1.2 倍以上，且经统计学检验其 P 值 < 0.05 时，视为差异表达蛋白质。

1.9.6 生物信息学分析 通过 GO 分析数据库 (<http://www.geneontology.org/>)对鉴定出的所有差异蛋白进行 GO 功能注释分析，分别从生物学进程 (Biological Process, BP)、细胞成分 (Cellular Component, CC) 和分子功能 (Molecular Function, MF) 这 3 方面进行分析。通过 KEGG 数据库 (<https://www.kegg.jp/>)对蛋白信号转导通路进行分析。通过 STRING 数据库 (<http://www.string-db.org/>)和 VISANT 数据库 (<http://visant.bu.edu/>)对差异蛋白进行蛋白相互作用网络分析。

1.10 Western Blot 法测定验证蛋白表达水平 收集各组细胞，加入 Lysis Buffer 裂解液，冰上静置 10 min， $6\ 000\times g$ 低温离心 5 min，获取上清液，采用 BCA 法进行蛋白定量。计算出含 50 μg 蛋白的溶液体积作为上样量，取上样样品至 200 μL 的 EP 管中，加入 $5\times\text{SDS}$ 。上样前将样品置于 PCR 仪中

100 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min 使蛋白变性。10% SDS-PAGE 电泳，60 V 恒压电泳至溴酚蓝指示剂跑出底部即可终止电泳。转膜：1 600 mA，120 min。TBST 洗膜，每次 10 min，共 2 次。将 PVDF 膜浸泡于封闭液中，摇床封闭 2 h。一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(β -actin 按 1 : 1 500 稀释，Akt1、Jak1、Jak2、Plcb3, Adrb2、Stat2、Prkcg、Plcb4 及 Ptpn2 按 1 : 3 000 稀释)。TBST 洗膜 3~5 次，每次 10 min。二抗室温下摇床孵育 3 h (按 1 : 50 000 稀释)。TBST 洗膜 3~5 次，每次 10 min。ECL 显色曝光，采用 BIO-RAD GC-800 型光密度扫描仪对胶片进行扫描并保存；采用 BIO-RAD 分析软件对蛋白表达进行灰度值分析，计算目的蛋白的相对表达量。

1.11 统计学处理方法 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用独立样本 t 检验；以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 安胃汤含药血清 TC₀ 计算结果 当含药血清浓度在 12.5% 时，24、48、72 h 等 3 个时间段的细胞破坏率均大于 5%，含药血清浓度低于 3.13% 的 3 个时间段细胞破坏率均小于 5%。72 h 时间段各个浓度的细胞破坏率总体偏高，故本研究采用 72 h 时间段进行浓度和细胞破坏率的二次曲线回归： $Y = -6.237\ 06 + 1.733\ 57X - 0.020\ 82X^2$ (Y 为细胞破坏率， X 为含药血清浓度， $R^2 = 0.932\ 67$)，以破坏率 5% 为最大无毒浓度，根据计算结果选用 7.08% 作为药物干预浓度。见表 1、图 1。

表 1 不同浓度安胃汤含药血清对胃黏膜细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of different concentrations of the serum containing Anwei decoction on proliferation of gastric mucosal cells

孔号	含药血清浓度/%	24 h		48 h		72 h	
		吸光度值	细胞破坏率/%	吸光度值	细胞破坏率/%	吸光度值	细胞破坏率/%
1	50.00	0.941 \pm 0.090*	29.29	0.869 \pm 0.082*	37.61	0.876 \pm 0.039*	28.45
2	25.00	1.002 \pm 0.110*	22.17	0.881 \pm 0.104*	36.24	0.935 \pm 0.101*	22.98
3	12.50	1.102 \pm 0.099*	10.55	1.007 \pm 0.090*	21.62	1.007 \pm 0.012*	16.31
4	6.25	1.244 \pm 0.110	-5.93	1.194 \pm 0.113	-0.19	1.141 \pm 0.107	3.89
5	3.13	1.248 \pm 0.093	-6.42	1.262 \pm 0.087	-8.13	1.289 \pm 0.185*	-9.82
6	1.56	1.272 \pm 0.100	-9.20	1.272 \pm 0.089	-9.22	1.231 \pm 0.139	-4.45
7	0.78	1.331 \pm 0.095	-16.14	1.283 \pm 0.100	-10.56	1.230 \pm 0.121	-4.36
8	0.39	1.341 \pm 0.103	-17.28	1.309 \pm 0.094	-13.56	1.225 \pm 0.098	-3.89
9	0.19	1.342 \pm 0.109	-17.38	1.377 \pm 0.090	-21.50	1.217 \pm 0.152	-3.15

(上接表 1)

孔号	含药血清浓度/%	24 h		48 h		72 h	
		吸光度值	细胞破坏率/%	吸光度值	细胞破坏率/%	吸光度值	细胞破坏率/%
10	0.10	1.364 ± 0.094	-19.88	1.444 ± 0.092	-29.21	1.232 ± 0.132	-4.54
11	细胞对照组	1.193 ± 0.110	-	1.201 ± 0.121	-	1.183 ± 0.112	-
12	空白对照	0.107 ± 0.013	-	0.114 ± 0.017	-	0.104 ± 0.015	-

注：与细胞对照组比较，*P < 0.05。

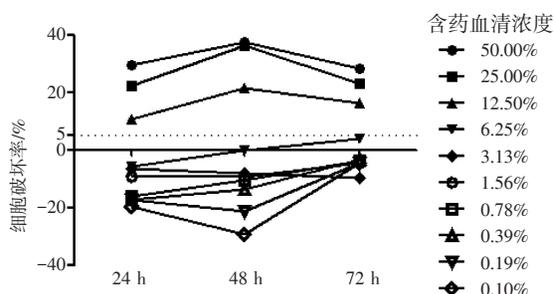


图 1 不同浓度安胃汤含药血清对胃黏膜细胞破坏率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 1 Effect of different concentrations of the serum containing *Anwei* decoction on the cell-damaging of gastric mucosa cells

2.2 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白鉴定结果 结果见图 2。质谱分析结果显示安胃汤组和对照组共筛选和鉴定出 430 个蛋白。除 33 种高丰度蛋白外，筛选同时符合 peptides (肽链) >

2, fold(差异倍数) < 0.8 或 fold > 1.2 的结果进行统计分析。结果表明：安胃汤组和对照组之间共存在 59 个差异表达蛋白，其中上调 43 个：Q9QXQ7、A0A0G2KAS0、A9LNM8、A0A0G2K2N3、P11275、A0A0G2KAL5、P30553、P20760、P55159、P13221、F1LSP6、A0A0G2K5Q7、D4A3N4、A0A0G2JUV8、Q99JE6、Q45QJ4、Q62689、P08483、P62161、M3ZCP6、Q8CIZ4、M0R933、Q5XIT9、Q5FVK3、P63319、P26897、R9PXY3、P10687、D4A206、Q05820、P26255、P47196、B0JYS4、P47197、A0A0G2K9C4、Q9R193、G3V8A8、Q9QW07、Q499R7、Q6AY18、F1M305、D3ZII1、Q5XIF3；下调 16 个：Q7H115、Q5X126、I6V4L9、Q6P6T3、E9PSX4、Q6IMY6、Q3HSE5、G3V9W2、P35233、P26431、M0RCR5、P25102、A0A0G2JT06、Q8VBU7、P21575、P10608。

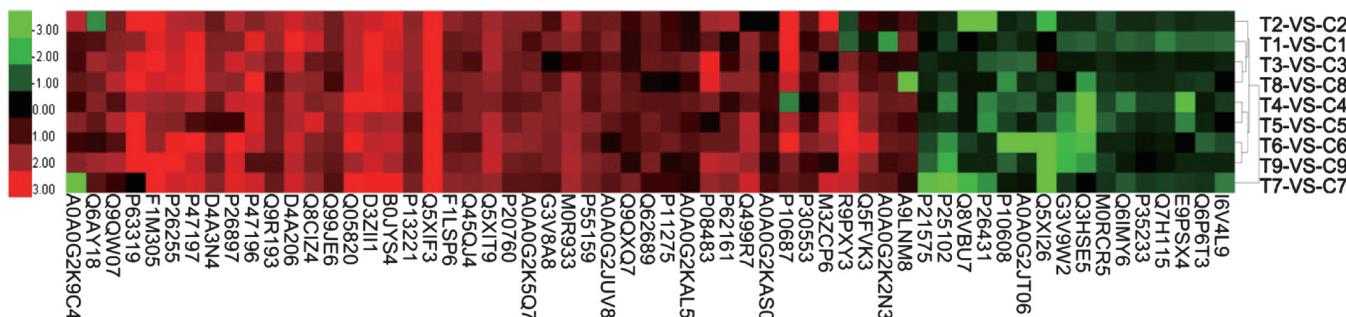


图 2 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白层次聚类树形结构

Figure 2 Hierarchical clustering tree structure diagram of differential protein in rat gastric mucosal cells with gastric ulcer of syndrome of liver-depression and spleen-deficiency intervened by *Anwei* decoction

2.3 差异蛋白的 GO 分析结果 通过 DAVID 数据库对 59 个差异蛋白表达基因进行功能注释，得到注释的基因为 58 个，对这 58 个蛋白基因进行 GO 分析。

2.3.1 差异蛋白基因的生物学过程 (Biological Process, BP) 分析 结果见表 2。通过 DAVID 富集分析系统对本研究获得的差异表达蛋白基因进行 BP 分析，结果显示，这些蛋白主要在 53 种生物学过程中发挥作用。

2.3.2 差异蛋白基因的细胞组分 (Cellular Component, CC) 分析 结果见表 3。通过 DAVID 富集分析系统对本研究获得的 59 种差异表达蛋白基因进行 CC 分析，结果显示共有 10 种细胞组分被包含其中。

2.3.3 差异蛋白基因分子功能 (Molecular Function, MF) 分析 结果见表 4。通过 DAVID 富集分析系统对本研究获得的 59 种差异表达蛋白进行 MF 分析，结果显示差异蛋白与 16 类分子途径紧密相关。

表 2 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白生物学过程分析结果[△]

Table 2 Biological process analysis of differential protein in rat gastric mucosal cells with gastric ulcer of syndrome of liver-depression and spleen-deficiency intervened by *Anwei* decoction

名称	蛋白基因数量	占注释靶基因总数的比例/% [#]	P 值 [*]
cellular response to interleukin-3(细胞白细胞介素 3 反应)	3	6	1.00E-04
intracellular signal transduction(细胞内信号转导)	7	14	4.50E-04
lipid catabolic process(脂质代谢过程)	4	8	8.20E-04
activation of adenylate cyclase activity(腺苷酸环化酶活性的激活)	3	6	1.50E-03
positive regulation of sodium ion transport(钠离子转运的正调控)	3	6	2.30E-03
estrous cycle(动情期)	3	6	3.20E-03
cellular response to insulin stimulus(细胞胰岛素刺激反应)	4	8	4.10E-03
cytokine-mediated signaling pathway(细胞因子介导的信号通路)	4	8	5.70E-03
regulation of sensory perception of pain(痛觉感觉调节)	3	6	5.90E-03
positive regulation of nitric oxide biosynthetic process(一氧化氮生物合成过程的正调控)	3	6	6.20E-03
response to antibiotic(抗生素反应)	3	6	6.80E-03
interleukin-2-mediated signaling pathway(白细胞介素 2 介导的信号通路)	2	4	7.80E-03
interleukin-12-mediated signaling pathway(白细胞介素 12 介导的信号通路)	2	4	7.80E-03
vasodilation by norepinephrine-epinephrine involved in regulation of systemic arterial blood pressure(去甲肾上腺素参与的调节全身动脉血压的血管舒张)	2	4	7.80E-03
response to cold(寒冷反应)	3	6	8.20E-03
adenylate cyclase-activating G-protein coupled receptor signaling pathway(腺苷酸环化酶激活 G 蛋白偶联受体信号通路)	3	6	9.20E-03
insulin receptor signaling pathway(胰岛素受体信号通路)	3	6	9.80E-03
negative regulation of plasma membrane long-chain fatty acid transport(质膜长链脂肪酸转运的负调控)	2	4	1.00E-02
desensitization of G-protein coupled receptor protein signaling pathway by arrestin(G 蛋白偶联受体蛋白信号通路的抑制蛋白脱敏)	2	4	1.00E-02
heat generation(热量产生)	2	4	1.00E-02
phosphatidylinositol catabolic process(磷脂酰肌醇代谢过程)	2	4	1.00E-02

注：[△]仅列出 P 值小于 0.01 的类别；[#]靶基因在当前功能类的数量占当前有功能注释靶基因总数的百分比；^{*}经 Benjamining 法控制错误发现率来进行 P 值校正。

表 3 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白细胞组分分析结果

Table 3 Cellular component analysis of differential protein in rat gastric mucosal cells with gastric ulcer of syndrome of liver-depression and spleen-deficiency intervened by *Anwei* decoction

名称	蛋白基因数量	占注释靶基因总数的比例/% [#]	P 值 [*]
dendrite(树突)	7	14	1.30E-03
cytoplasm(细胞质)	23	46	5.10E-03
vesicle(囊泡)	4	8	7.90E-03
plasma membrane(质膜)	18	36	1.40E-02
cytosol(细胞质)	10	20	1.70E-02
postsynaptic density(突触后密度)	4	8	2.20E-02
sarcolemma(肌纤维膜)	3	6	3.60E-02
varicosity(膨体)	2	4	4.00E-02
nucleus(细胞核)	19	38	4.50E-02
axon(轴突)	4	8	6.40E-02

注：[#]靶基因在当前功能类的数量占当前有功能注释靶基因总数的百分比；^{*}经 Benjamining 法控制错误发现率来进行 P 值校正。

2.4 差异蛋白基因信号转导通路分析 结果见表 5。

差异蛋白基因的 KEGG 通路分析结果显示，本研究中所鉴定的差异蛋白主要集中在 80 条信号转导通路上，其中有 74 条 P < 0.05，表 5 仅列出排前 10 位的通路。

2.5 差异蛋白基因相互作用分析 结果见图 3。

差异蛋白之间的相互作用通过 VISANT 数据库分析发现，差异蛋白基因与多种蛋白在多条信号转导系统功能网络交叉点上交互作用，共发现节点(Nodes)355 个，路径映射(Pathway Mapped)22 个，节点的功能涵盖 27 个种类。

差异蛋白之间的作用通过 STRING 数据库分析表明，各差异蛋白之间在基因融合、共同表达、文本注释等方面均相互联系和作用，其中 Akt1 (P47196)、Jak1 (Q8CIZ4)、Jak2 (Q62689)、Prkcg (P63319)、Plcb4 (Q9QW07)、Plcb3 (Q99JE6)、

表 4 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白分子功能分析结果

Table 4 Molecular function analysis of differential protein in rat gastric mucosal cells with gastric ulcer of syndrome of liver-depression and spleen-deficiency intervened by *Anwei* decoction

名称	蛋白基因数量	占注释靶基因总数的比例/% [#]	P 值 [*]
protein binding(蛋白结合)	16	32	1.40E-05
phosphatidylinositol phospholipase C activity(磷脂酰肌醇磷脂酶 C 活性)	3	6	9.90E-04
signal transducer activity(信号转导活性)	4	8	8.50E-03
calmodulin binding(钙调素结合)	4	8	9.30E-03
norepinephrine binding(去甲肾上腺素结合)	2	4	1.10E-02
inorganic diphosphatase activity(无机焦磷酸酶活性)	2	4	1.40E-02
epinephrine binding(肾上腺素结合)	2	4	1.60E-02
growth hormone receptor binding(生长激素受体结合)	2	4	1.60E-02
nitric-oxide synthase regulator activity(一氧化氮合酶调节活性)	2	4	2.20E-02
identical protein binding(相同的蛋白结合)	6	12	3.20E-02
protein kinase binding(蛋白激酶结合)	5	10	3.20E-02
adenylate cyclase binding(腺苷酸环化酶结合)	2	4	3.80E-02
drug binding(药物结合)	3	6	3.90E-02
protein kinase activity(蛋白激酶活性)	4	8	4.10E-02
calcium ion binding(钙离子结合)	6	12	4.20E-02
GTPase activating protein binding(GTP 酶激活蛋白结合)	2	4	4.90E-02

注: # 靶基因在当前功能类的数量占当前有功能注释靶基因总数的百分比; * 经 Benjamining 法控制错误发现率来进行 P 值校正。

表 5 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白 KEGG 通路分析结果

Table 5 Signal pathway analysis of differential protein in rat gastric mucosal cells with gastric ulcer of syndrome of liver-depression and spleen-deficiency intervened by *Anwei* decoction

名称	上调基因	下调基因	P 值 [*]
rno04970: Salivary secretion(唾液分泌)	Atp1b4; Adey1; Adrb3; Calm1; Chrm3; Lyz2; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg; Prkg1	Adrb2; Slc9a1	3.13E-16
rno04971: Gastric acid secretion(胃酸分泌)	Atp1b4; Adey1; Camk2a; Calm1; Cckbr; Chrm3; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg	Hrh2; Slc9a1;	1.13E-14
rno04020: Calcium signaling pathway(钙信号通路)	Adey1; Adrb3; Camk2a; Calm1; Cckbr; Chrm3; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg	Hrh2; Adrb2;	3.66E-10
rno04261: Adrenergic signaling in cardiomyocytes(心脏相关肾上腺素能信号通路)	Akt1; Atp1b4; Adey1; Camk2a; Calm1; Plcb1; Plcb3; Plcb4	Akt2; Adrb2; Slc9a1	6.66E-10
rno04725: Cholinergic synapse(胆碱能突触)	Akt1; Jak2; Adey1; Camk2a; Chrm3; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg	Akt2;	1.31E-09
rno04022: cGMP-PKG signaling pathway(cGMP PKG 信号通路)	Akt1; Atp1b4; Adey1; Adrb3; Calm1; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkg1	Akt2; Adrb2;	2.96E-09
rno04911: Insulin secretion(胰岛素分泌)	Atp1b4; Adey1; Camk2a; Chrm3; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg		1.01E-07
rno04972: Pancreatic secretion(胰腺分泌)	Atp1b4; Adey1; Chrm3; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg	Slc9a1	2.18E-07
rno04713: Circadian entrainment(昼夜周期)	Adey1; Camk2a; Calm1; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg; Prkg1		2.34E-07
rno04916: Melanogenesis(黑色素生成)	Adey1; Camk2a; Calm1; Plcb1; Plcb3; Plcb4; Prkcg; Wnt5a		3.66E-10

注: * 经 Benjamining 法控制错误发现率来进行 P 值校正。

Adrb2(P10608)、Chrm3(P08483)、Stat2(Q5XI26)、Ptpn2(P35233)、Ifngr1(Q6P6T3)蛋白位于相互作用节点的中心。

2.6 相互作用节点中心蛋白的验证结果 结果见图 4。通过 Western Blot 实验对相互作用节点中心蛋白进行

验证, 结果表明, 与对照组比较, Akt1(P47196)、Jak1(Q8CIZ4)、Jak2(Q62689)和 Plcb3(Q99JE6)表达上调($P < 0.01$), Adrb2(P10608)和 Stat2(Q5XI26)表达下调($P < 0.01$), 与蛋白质组学数据一致; 而 Prkcg(P63319)、Plcb4(Q9QW07)、Ptpn2(P35233)表达两

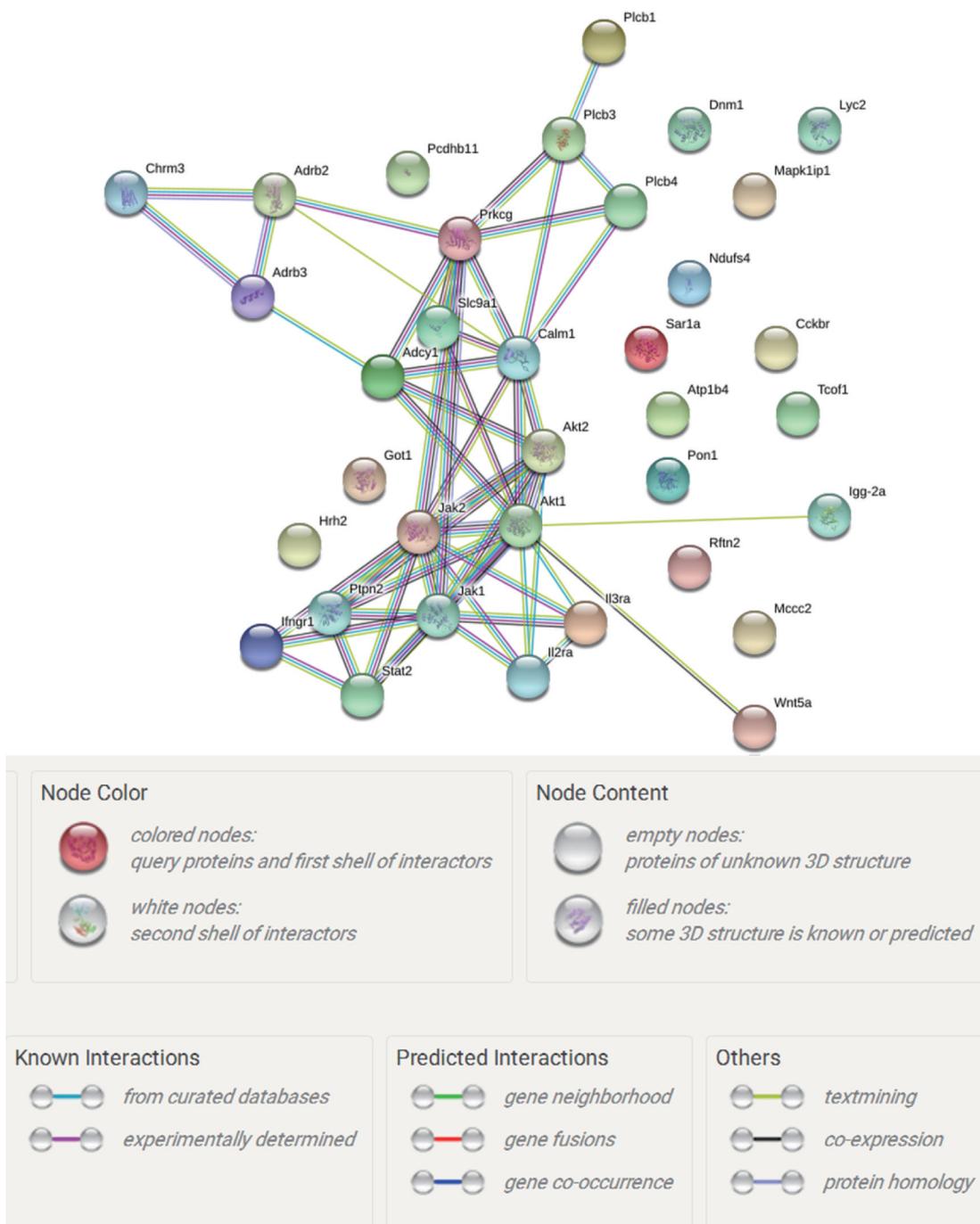


图 3 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞的差异蛋白相互作用分析结果

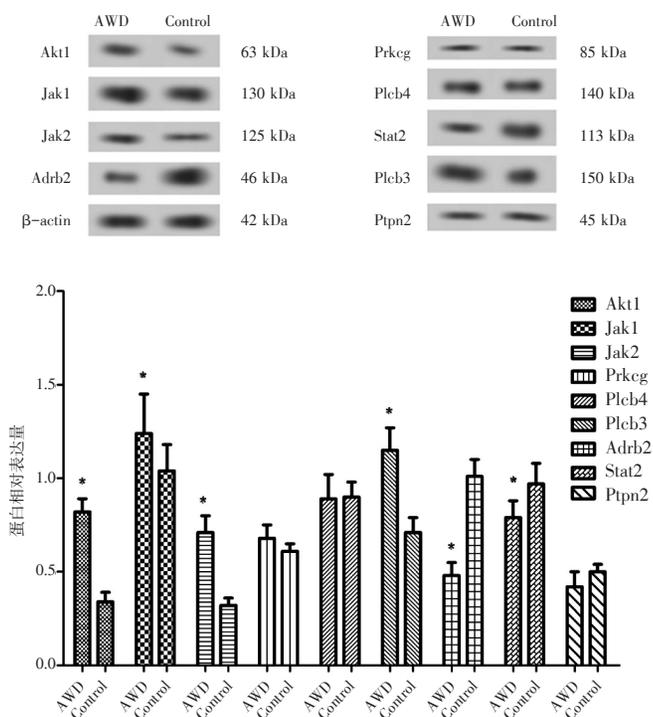
Figure 3 Schematic diagram of interaction in STRING database of differential protein in rat gastric mucosal cells with gastric ulcer of syndrome of liver-depression and spleen-deficiency intervened by *Anwei* decoction

组之间比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，与蛋白质组学数据反映的 *Prkcg* (P63319)、*Plcb4* (Q9QW07) 上调及 *Ptpn2* (P35233) 下调的表达不一致。

3 讨论

胃溃疡是一种高发病率的消化道疾病，且癌变率约为 1% ~ 7%^[7-8]，中医认为肝郁脾虚证是其重要证

候之一。本研究以安胃汤含药血清干预胃溃疡肝郁脾虚证模型大鼠的胃黏膜细胞，并对其进行蛋白质组学分析。通过质谱分析，共鉴定出安胃汤组和对对照组之间共有上调差异蛋白 43 个，下调差异蛋白 16 个。这些蛋白主要参与 53 种生物学过程、10 种细胞组分和 16 类分子途径。主要功能集中在炎症反应负调控、胃酸分泌、细胞内信号转导、抗生素反应、



注：AWD-安胃汤组，Control-对照组；与对照组比较，**P* < 0.01。
 图4 安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞相互作用节点中心蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Figure 4 Protein expression of the interaction center in rat gastric mucosal cells with gastric ulcer of syndrome of liver-depression and spleen-deficiency intervened by *Anwei* decoction

周围神经系统髓鞘保护等方面。既往研究^[9-10]表明，胃酸分泌增加、黏膜防御能力减弱、服用非甾体抗炎药、幽门螺杆菌感染、神经内分泌水平等与胃溃疡的发生、发展密切相关，本研究发现的差异蛋白也都与上面的病理环节相关，提示安胃汤可能是通过调节以上相关蛋白的表达来发挥作用。

情志因素与胃肠道疾病的发生发展关系密切，调节消化系统运动及分泌的中枢、内分泌系统调节中枢与情感中枢的皮层下整合中心处于同一解剖位置，所以消化系统最易受内外环境刺激及情绪因素的影响，是心身相关最敏感的器官。郑小伟等^[4]对肝郁脾虚证胃溃疡大鼠胃窦组织蛋白质组学研究表明，模型组大鼠血清胃泌素、血清淀粉酶活性、血浆去甲肾上腺素和血浆5-羟色胺等指标出现紊乱。孙剑端等^[12]观察了电针对胃溃疡肝郁证的镇痛作用及作用机制，发现模型组大鼠海马组织的5-羟色胺、去甲肾上腺素含量较空白组均明显减少。孟永海等^[12]研究发现，应激性胃溃疡模型大鼠纹状体组织去甲肾上腺素、5-羟色胺和多巴胺的浓度均明显升高。

本研究分析发现差异蛋白的信号通路主要集中在钙信号通路、胃酸分泌、胆碱能突触、趋化因子信号转导通路、多巴胺能神经突触等。其中值得注意的是，本研究中的差异蛋白参与了多种与神经递质调节相关的通路，包括肾上腺素能信号转导、胆碱能突触、胰岛素分泌、胰腺分泌、甲状腺激素信号通路、多巴胺能神经突触、醛固酮合成与分泌等。通过差异蛋白组学分析提示，安胃汤可能参与了多种与神经分泌相关的蛋白通路，可以通过调节多种神经递质的分泌来发挥抗胃溃疡的作用。

通过 VISANT 和 STRING 数据库对差异蛋白基因的相互作用进行分析发现，这些差异蛋白位于多条通路的节点上，这些节点与上述的信号转导通路基本一致。通过 VISANT 软件检索发现差异蛋白的功能节点有 94 个为药物靶基因，这与中药“多因、多效、多靶点”的作用特点相符。进一步采用 Western Blot 方法对安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠模型胃黏膜细胞差异蛋白进行了验证，结果大部分节点中心的蛋白表达变化与蛋白组学的数据相一致。结果表明，iTRAQ 蛋白组学技术能够有效筛选安胃汤干预胃黏膜细胞的差异蛋白，数据库搜索是大规模基因组表达谱研究及功能分析的研究基础^[13-15]。本次研究从组学的角度对 59 个差异蛋白进行了生物信息学分析，进一步了解差异蛋白在安胃汤干预胃黏膜细胞中参与的生物学过程。而中药作用具有多位点、多种机制综合调节的整体效应等特点，本研究筛选出的安胃汤干预胃溃疡肝郁脾虚证大鼠胃黏膜细胞相关蛋白包括 Akt1、Jak1、Jak2、Plcb3、Adrb2、Stat2、Prkeg、Plcb4、Ptpn2、Chrm3 及 Ifngr1 等，具体作用机制有待进一步研究。

参考文献：

- [1] 杨健, 陈高红, 吴霞, 等. 消化性溃疡 2 168 例临床流行病学分析[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(2): 417-418.
- [2] 于长江. 安胃汤治疗胃溃疡的远期疗效[J]. 中医临床研究, 2017, 9(5): 28-29.
- [3] 马坤, 何晨, 何涛. 安胃汤与泮托拉唑治疗合并幽门螺旋杆菌感染胃溃疡临床观察[J]. 四川中医, 2016, 34(6): 157-158
- [4] 郑小伟, 王颖, 宋红. 肝郁脾虚证胃溃疡大鼠胃窦组织差异蛋白质表达及柴黄胃溃宁的干预研究[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(12): 2840-2843.
- [5] 魏伟, 吴希美, 李远见. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71.
- [6] 郑景辉, 黄龙坚, 吴新正, 等. 基于 iTRAQ 结合质谱技术的养心

- 通脉有效部位方对大鼠 BMSCs 作用蛋白的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20): 107-112
- [7] GRAHAM D Y. History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(18): 5191-5204.
- [8] LI Q, LIU J, GONG Y, et al. Association of CagA EPIYA-D or EPIYA-C phosphorylation sites with peptic ulcer and gastric cancer risks: A meta-analysis[J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(17): e6620.
- [9] 孙雪峰. 红细胞免疫、细胞免疫与胃溃疡患者 Hp 感染的关系[J]. 实用临床医药杂志, 2017, 21(3): 42-44.
- [10] 王璞, 王长宏, 刘明晖, 等. 自拟抑酸止痛方对胃溃疡大鼠胃酸及胃蛋白酶的影响[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(2): 311-312.
- [11] 孙剑端, 任路, 李静, 等. 电针对胃溃疡肝郁证模型大鼠镇痛作用研究[J]. 中国针灸, 2015, 35(4): 361-366.
- [12] 孟永海, 王秋红, 杨炳友, 等. 基于大鼠应激性胃溃疡寒症模型的吴茱萸各性味组分的药性研究[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(3): 498-502.
- [13] FENG X D, LI L W, ZHANG J H, et al. Using the entrapment sequence method as a standard to evaluate key steps of proteomics data analysis process[J]. BMC Genomics, 2017, 18(2): 143.
- [14] VERHEGGEN K, MARTENS L, BERVEN F S, et al. Database search engines: paradigms, challenges and solutions[J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 919: 147-156.
- [15] DI D F, DE M F, PERLUIGI M. Proteomics strategies to analyze HPV-transformed cells: relevance to cervical cancer[J]. Expert Rev Proteomics, 2013, 10(5): 461-472.

(编辑: 邹元平)