

实验研究

幽门螺杆菌相关性慢性萎缩性胃炎生物信息学分析及安胃汤对其核心蛋白表达的影响

徐杉^{1,2} 周瑞东¹ 龚纯¹ 蒙毅¹ 张帆¹ 郑景辉¹ 唐友明³ 朱永苹³

(1 广西中医药大学, 南宁, 530200; 2 湖北中医药大学附属公安中医医院, 荆州, 434300;

3 广西中医药大学附属瑞康医院消化内科, 南宁, 530011)

摘要 目的: 基于生物医学大数据筛选幽门螺杆菌(Hp)相关性慢性萎缩性胃炎的关键基因, 探索其发病机制及安胃汤对其的影响。方法: 从数据库 Gene Expression Omnibus(GEO)下载 Hp 相关性慢性萎缩性胃炎相关芯片数据, 利用 GEO₂R 软件筛选出 Hp 相关性慢性萎缩性胃炎差异基因, 进行生物信息学分析, 根据蛋白参与通路数量确定核心蛋白, 建立 Hp 阳性慢性萎缩性胃炎大鼠模型, 用 PCR 和蛋白质印迹法(Western Blotting)进行检测并观察安胃汤对其表达的影响。结果: 经过检索分析 GSE13873 和 GSE27411 系列芯片数据被纳入, 取 2 个芯片交集的 20 个差异基因进行生物信息学分析, 发现载脂蛋白 A1、CD36、囊性纤维化穿膜传导调节蛋白(CFTR)可能是信号通路的核心蛋白。Western Blotting 及 PCR 结果显示 Hp 相关性慢性萎缩性胃炎大鼠胃组织中, CD36 蛋白表达下调($P < 0.05$), 载脂蛋白 A1 和 CFTR 蛋白表达上调($P < 0.05$); 与模型组比较, 实验观察高剂量组、实验观察中剂量组和实验观察低剂量组胃组织中 CD36 蛋白表达上调, 载脂蛋白 A1 和 CFTR 表达下调($P < 0.05$), 其与 Hp 相关性慢性萎缩性胃炎发病关系密切。结论: 通过对 GEO 中 Hp 相关性慢性萎缩性胃炎芯片生物信息学分析结合 Western Blotting 及 PCR 进一步的验证发现载脂蛋白 A1、CD36、CFTR 作为信号通路的核心蛋白实验结果与生物信息学分析结果一致。

关键词 慢性萎缩性胃炎; 幽门螺旋杆菌; 生物信息学; 基因芯片; 安胃汤; 载脂蛋白 A1; CD36; 囊性纤维化穿膜传导调节蛋白

Bioinformatics Analysis of HP-related Chronic Atrophic Gastritis and Effect of Anwei Decoction on Core Protein Expression Against Gastritis

XU Shan^{1,2}, ZHOU Ruidong¹, GONG Chun¹, MENG Yi¹, ZHANG Fan¹, ZHENG Jinghui¹, TANG Youming³, ZHU Yongping³

(1 Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2 Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Hubei Public Security University, Jingzhou 434300, China; 3 Department of Gastroenterology, Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

Abstract Objective: To screen key genes of Helicobacter pylori(Hp)-related chronic atrophic gastritis based on biomedical big data and explore its pathogenesis and the influence of Anwei Decoction. **Methods:** The chip data of Hp-related chronic atrophic gastritis were downloaded from Gene Expression Omnibus(GEO), and the differential genes of HP-related chronic atrophic gastritis were screened out by GEO2R. Bioinformatics analysis was conducted, and the core proteins were determined according to the number of protein-participating pathways. The Hp(+) chronic atrophic gastritis model was induced in rats. PCR and Western blot were used to detect the effect of Anwei Decoction on the expression. **Results:** After retrieval and analysis of GSE13873 and GSE27411 series chip data, 20 common differential genes of the two chips were taken for bioinformatics analysis, and the results showed that apolipoprotein A1(APOA1), CD36, and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR) might be the core proteins of the signaling pathway. Western blot and PCR results showed that the expression of CD36 protein was down-regulated($P < 0.05$), and the expression of APOA1 and CFTR was up-regulated($P < 0.05$) in the gastric tissues of rats with HP-related chronic atrophic gastritis. Compared with the model group, the high-, medium- and low-dose Anwei Decoction groups showed up-regulated expression of CD36 and down-regulated expression of APOA1 and CFTR($P < 0.05$), which was closely related to the incidence of HP-related chronic atrophic gastritis. **Conclusion:** As revealed by the bioinformatics analysis of HP-related chronic atrophic gastritis in GEO microarray and verification by Western blot and PCR, the experimental results of APOA1, CD36, and CFTR as the core proteins of the signaling pathway were consistent with the results of bioinformatics analysis.

Keywords Chronic atrophic gastritis; Helicobacter pylori; Bioinformatics; Gene chip; Anwei Decoction; APOA1; CD36; Cystic

基金项目: 国家自然科学基金(81860843); 广西自然科学基金(2017GXNSFAA198111, 2018GXNSFAA281063); 广西一流学科建设开放课题自然科学基金项目(2019XK165); 广西研究生教育创新计划项目(XYJ20054)

作者简介: 徐杉(1993.03—), 女, 硕士研究生在读, 研究方向: 脾胃病的中西医结合诊疗研究, E-mail: 1007249721@qq.com

通信作者: 唐友明(1964.10—), 男, 医学硕士, 主任医师, 研究方向: 消化系统疾病的防治研究, E-mail: tang530011@163.com; 朱永苹

(1972.03—), 女, 医学学士, 教授, 主任医师, 研究方向: 消化系统疾病的中西医结合诊疗研究, E-mail: 529090217@qq.com

fibrosis transmembrane conductance regulator

中图分类号:R256;R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2022.10.006

慢性萎缩性胃炎(Chronic Atrophic Gastritis, CAG)是由于胃黏膜萎缩变薄,胃腺体减少,导致胃酸及胃蛋白酶分泌减少的慢性病变^[1]。近年的研究数据显示,全球大多数国家幽门螺旋杆菌(*Helicobacter Pylori*, Hp)感染率仍较高,约有33%成年人存在Hp感染^[2]。由中华医学会消化内镜学分会进行的一项横断面调查显示,CAG是我国最常见的一种慢性胃炎^[3]。CAG病因与吸烟、酗酒、药物及Hp感染等因素有关,Hp是主要危险因素,可促进CAG患者胃黏膜癌变^[4]。根除Hp可减少胃黏膜炎症、组织学损害的进展、消化性溃疡的复发,以及患胃癌的风险^[5]。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^[6-7]。本研究利用高通量基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中的基因芯片数据对,挖掘Hp感染CAG芯片数据的基础上进行了分子生物学验证。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 资料来源 生物信息学资料来源从GEO(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)数据库中检索所有与Hp阳性相关的CAG芯片数据。物种限定为哺乳动物,同时分组中含有Hp阳性的CAG与Hp阳性正常胃黏膜进行比较的表达谱的数据系列。

1.1.2 动物 SD雄性大鼠,体质量(100±20)g,72只,无特定病原体(Specific Pathogen Free, SPF)级,购于湖南莱克景达实验动物有限公司,实施地点在广西中医药大学实验动物中心,动物使用许可证号(SYXK桂2019-0001)。分笼饲养于广西中医药大学实验动物中心,环境为室温18~25℃、相对湿度50%~60%、人工12h昼/夜循环照明。隔日更换垫料、清洗笼舍,大鼠自由摄食及饮水。动物福利伦理委员会批准(伦理审批号:DW20190310-045)。

1.1.3 Hp菌株 采用悉尼标准菌株(SSI),含有细胞毒素相关基因(CagA+)和空泡细胞毒素(VavA+)(美国MTCC公司,美国,菌株编号:ATCC43504)。将Hp接种于琼脂培养基(OXOID公司,美国,货号:CM0331),配成650mL培养液,加30mL脱纤维羊血,高压灭菌,在微需氧的环境(二氧化碳体积分数0.10,氧气体积分数0.05,氮气体积分数0.85)下37℃培养3d备用。

1.1.4 药物 安胃汤:半夏13g、黄连5g、干姜5g、乌药7g、丹参15g、百合20g、白芍20g、薏苡仁10g、炙甘草5g,饮片购自广西中医药大学附属瑞康医院门诊中药房。将以上药物饮片煎汁至1g/mL备用,参照《药理实验方法学》^[8]中人和动物体表面积比值剂量表,给药剂量按照体质量60kg成人剂量的6.17倍计算为10.3g/kg,作为中剂量,以正常剂量的0.5倍及2倍作为安胃汤低、高剂量,按以上3种剂量对滤液进行剂量调整。阿莫西林250mg/粒(珠海联邦制药股份有限公司中山分公司,批号:9C050103),甲硝唑200mg/片[远大医药(中国)有限公司,批号:190322],吡哆美辛25mg/粒(山西云鹏制药有限公司,批号:D190101),碳酸氢钠片[上海玉瑞生物科技(安阳)有限公司,批号:181111],脱氧胆酸钠(北京索莱宝生物有限公司,货号:SLBZ6975),氨水(成都市科龙化工试剂厂,货号:2016040501)。

1.1.5 试剂与仪器 兔抗CD36抗体(abcam公司,英国,批号:GR243753-3);兔抗载脂蛋白A1抗体(abcam公司,英国,批号:GR3253377-4);兔抗囊性纤维化穿膜传导调节蛋白(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR)抗体(abcam公司,英国,批号:GR3208838-1);兔抗GAPDH抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:00078427);特超敏ECL化学发光即用型底物(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:7E341E9);BCA蛋白定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:14G08A460);SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:7E092H6)、RT Super Mix for qPCR(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:7E020C6)、RNA-easy TM Isolation Reagent(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号:7E303H9)均购自南京诺唯赞生物科技有限公司;胃幽门螺杆菌快速检测试纸(广州贝思奇诊断试剂有限公司,批号:201904136)。全波长多功能酶标仪(Tecan公司,瑞士,型号:Infinite M200 PRO);水平、垂直电泳、转膜装置(Bio-Rad公司,美国,型号:PROTEANi12IEF);Bio-Rad Image-Lab凝胶成像分析系统(Bio-Rad公司,美国,型号:Chemidoc CD touch);荧光定量PCR仪(Roche公司,瑞士,型号:罗氏Light cycler 96)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 通过 GEO2R 分析系统分析不同组织中基因的差异表达,通过在线交集分析软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 荟萃查找相关 3 个芯片中相互共有的差异基因,通过 David (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号转导通路分析,通过 STRING10.0 (<http://www.string-db.org/>) 进行蛋白质-蛋白质相互作用 (Protein-protein Interaction, PPI) 网络分析^[9]。

1.2.2 分组与模型制备 大鼠适应性喂养 1 周后,按照随机数字表法进行分组,正常对照组 10 只,造模组 50 只。参照唐旭东等^[10] 模型制备方法,予以 2% 阿莫西林 + 2.5% 甲硝唑混合液灌胃 3 d, 6.6 mL/kg, 1 次/d;再以 2% 吡啶美辛溶液灌胃 2 d, 3.3 mL/kg, 1 次/d;最后以 20% 碳酸氢钠溶液灌胃, 6.6 mL/kg, 15 min 后灌胃 Hp 菌悬液 1 mL/次,浓度 1×10^{12} CFU/L,隔日 1 次,共 6 次。灌胃前后禁食 12 h 及 4 h;Hp 种植完成后正常饲养 28 d 再给予 0.83% 脱氧胆酸钠和 0.05% 氨水代替饮用水交替饮用,饥饱失常饮食,持续 8 周。模型成功标准:苏木精-伊红 (Hematoxylin and Eosin, HE) 染色病理检测大鼠胃黏膜固有层腺体减少并萎缩,快速尿素酶试验检测 Hp 阳性提示造模成功。造模成功后对造模大鼠按照随机数字表法分为实验观察高剂量组、实验观察中剂量组、实验观察低剂量组、模型对照组、阴性对照组,每组 10 只。

1.2.3 干预方法 实验观察高剂量组 (安胃汤浓度 20.6 g/kg)、实验观察中剂量组 (安胃汤浓度 10.3 g/kg)、实验观察低剂量组 (安胃汤浓度 5.15 g/kg)、模型对照组 (常规饲养)、阴性对照组 (等量生理盐水) 共 5 组。灌胃干预 4 周,干预结束后予以麻醉处死取材。

1.2.4 检测指标与方法 1) 快速尿素酶法检测 Hp 感染:将造模大鼠胃黏膜组织放入快速尿素酶检测的反应区域,以及大鼠胃黏膜组织细菌培养 72 h,再行同样方法检测,5 min 内观察反应区域颜色变化情况,试剂颜色由黄色转变为红色说明检测结果为阳

性,提示 Hp 感染。2) 蛋白质印迹法 (Western Blotting) 检测大鼠胃黏膜组织相关蛋白的表达:取冲洗后胃组织 50 mg,加入 RIPA (含蛋白酶和磷酸酶抑制剂),冰上研磨 30 min,4 °C、12 000 × g 离心 15 min。取上清液,BCA 法测定蛋白浓度,将各组浓度调至一致,加入上样缓冲液,100 °C 变性 5 min。电泳 (80 V, 20 min, 120 V, 45 min),转膜 (4 °C, 300 MA 恒流, 60 min),5% BSA 室温封闭 15 min,加入一抗 CD36 (1:5 000)、CFTR (1:5 000)、载脂蛋白 A1 (1:5 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入二抗 IgG (1:10 000),室温摇床孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,最后用 ECL 化学发光剂显色, Bio-Rad Image-Lab 凝胶成像分析系统成像拍照,采用 Image J 软件进行分析。3) 实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR) 法检测大鼠胃黏膜组织相关 mRNA 的表达:使用 RNA-easy™ Isolation Reagent 试剂盒提取胃组织 Total RNA,紫外分光光度计测 RNA 含量及纯度。每组计算 1 μg RNA 逆转录为 cDNA。稀释后取 5 μL cDNA 进行 Real-time quantitative PCR,以 GAPDH 为内参,反应体系 20 μL。扩增条件为:95 °C 120 s;95 °C 15 s 55 °C 15 s 72 °C 60 s;95 °C 15 s 60 °C 60 s 95 °C 15 s;37 °C 30 s, 40 个循环。计算 Ct 值,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的表达水平。

1.3 统计学方法 所有数据采用 Graphpad Prism 软件进行处理与分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生物信息学分析结果

2.1.1 芯片数据基本信息 检索发现 GEO 数据库中有 19 个系列与 CAG 相关,经筛选分析,有 2 个系列符合纳入要求,分别是 GSE27411 和 GSE13873,其中 GSE27411 又分为胃窦组织和胃体黏膜两部分 2 组数据集分别有 20 589 个、45 101 个有效基因探针。见表 1。

2.1.2 分析的差异基因 结合 2 个 GEO 数据库芯片序列的 2 个系列的 3 组数据运用 GEO2R 分析系

表 1 GEO 数据库中符合要求芯片基本信息

收录号	注册时间	更新时间	国家	平台	探针数	样本数 (观察组/对照组)
GSE27411	2011.2	2011.2	美国	Illumina humanRef-8 v2.0 expression beadchip	20 589	6/6
GSE13873	2008.12	2017.2	瑞士	Affymetrix Mouse Genome 4302.0 Array	45 101	9/4

统,分析了基因在不同组织中的差异表达,GSE27411 共筛选出 2 981 个差异基因,其中 1 316 个上调基因、1 665 个下调基因;GSE13873 共筛选出 2 435 个差异基因,其中 1 002 个上调基因、1 433 个下调基因。并对 3 组数据进行了荟萃分析查找相互交集的差异基因,最终筛选到 20 个候选基因,其中 3 组芯片共表达的差异基因 3 个:APOA1、CLCA1 和 GPA33;芯片 GSE27411(胃窦组织)和芯片 GSE1387 共表达差异基因有 12 个:AQP4、ATP4B、CFTR、CKB、CLDN2、CLDN7、CLPS、CD37、GAST、KCNE2、LPL、REG3G。芯片 GSE27411(胃体黏膜)和芯片 GSE13873 共表达差异基因有 5 个:C3、CD36、CX-CL13、LTF、UBD。见表 2,图 1~2。

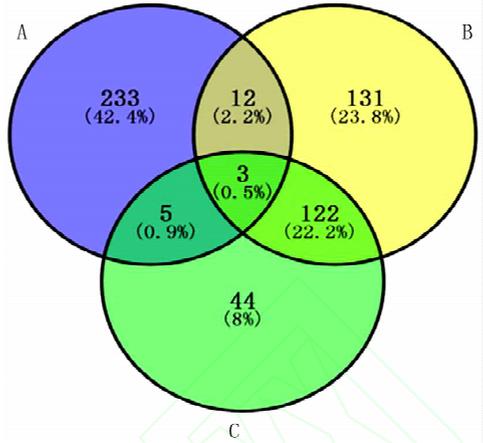


图 1 3 组芯片数据种差异基因共有数据的交集的韦恩图
注:A. GSE13873;B. GSE27411(胃窦组织);C. GSE27411(胃体黏膜)

表 2 2 个系列芯片数据共有差异基因列表

基因标志	基因英文名称	基因中文名
CLPS	Colipase	辅脂肪酶
AQP4	Aquaporin 4	水通道蛋白 4
CKB	Creatine Kinase B	脑肌酸激酶
CD36	CD36 Molecule	CD36 分子
CXCL13	C-X-C Motif Chemokine Ligand 13	C-X-C 趋化因子配体 13
REG3G	Regenerating Family Member 3 Gamma	重组人胰岛再生源蛋白 3γ
LPL	Lipoprotein Lipase	脂蛋白酯酶
APOA1	Apolipo Protein A1	酶法测定载脂蛋白 A1
CLCA1	Chloride Channel Accessory 1	氯离子通道辅助蛋白 1
ATP4B	ATPase H ⁺ /K ⁺ Transporting Beta Subunit	ATP 酶 H/K 运输 β 亚基
GPA33	Glycoprotein A33	糖蛋白 A33
CD37	CD37 Molecule	CD3 分子
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	囊性纤维化跨膜转运调节体
LTF	Lactotransferrin	乳运铁蛋白
CLDN7	Claudin 7	密封蛋白 7
C3	Complement C3	补体 C3
CLDN2	Claudin 2	密封蛋白 2
UBD	Ubiquitin D	泛素样蛋白 D
KCNE2	Potassium Voltage-gated Channel Subfamily E Regulatory Subunit 2	钾离子通道蛋白家族成员 2
GAST	Gastrin	胃泌素

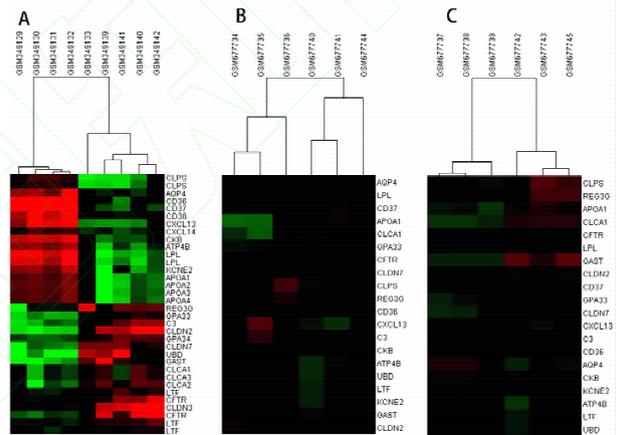


图 2 3 组芯片数据差共有差异基因聚类分析热图

注:A. GSE13873 数据;B. GSE27411 胃窦部分数据;C. GSE27411 胃体黏膜部分数据

2. 1. 3 差异基因 GO 富集分析

2. 1. 3. 1 差异蛋白基因生物过程 (Biological Processes, BP) 分析 对本实验获得的 20 种差异表达蛋白基因进行 BP 分析发现,这些蛋白主要参与 9 种生物学过程,生物过程分析差异蛋白主要涉及胆固醇内流、三酰甘油分解代谢过程、免疫应答、胆固醇生物合成过程、磷脂代谢过程等。见表 3。

表 3 差异蛋白基因生物学过程分析

英文名称	中文名称	蛋白基因数量	% *	P 值 [△]
Cholesterol Import	胆固醇的内流	2	0.1	4. 90E ⁻⁰³
Very-low-density Lipoprotein Particle Remodeling	极低密度脂蛋白颗粒重构	2	0.1	8. 60E ⁻⁰³
Cell Surface Receptor Signaling Pathway	细胞表面受体信号通路	3	0.1	1. 50E ⁻⁰²
Response to Food	食物反应	2	0.1	1. 80E ⁻⁰²
Triglyceride Homeostasis	三酰甘油稳态	2	0.1	2. 00E ⁻⁰²
Triglyceride Catabolic Process	三酰甘油分解代谢过程	2	0.1	2. 00E ⁻⁰²
Immune Response	免疫应答	3	0.1	2. 80E ⁻⁰²
Cholesterol Biosynthetic Process	胆固醇生物合成过程	2	0.1	2. 90E ⁻⁰²
Phospholipid Metabolic Process	磷脂代谢过程	2	0.1	4. 30E ⁻⁰²

注:此表仅列出小于 0.05 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

测及直接检测试剂由黄色变为红色,说明试验结果为阳性,提示 Hp 感染成功。见图 5。病理检测结果发现,造模组大鼠胃黏膜组织可见中性粒细胞、淋巴细胞浸润,固有腺体部分减少并萎缩,符合 CAG 的表现。见图 6。



图 5 快速尿素酶试验结果显示

注:A. 正常对照组;B. 模型对照组直接检测;C. 模型对照组培养后检测

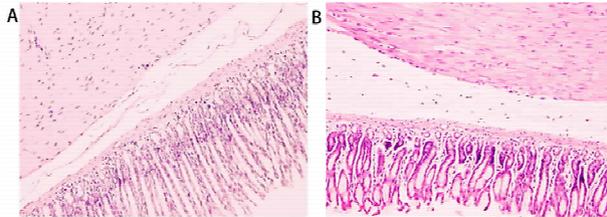


图 6 大鼠胃黏膜组织病理学检查结果(HE 染色, ×200)

注:A. 正常对照组;B. 模型对照组

2.2.2 载脂蛋白 A1、CD36、CFTRmRNA 在 CAG 大鼠胃组织中的表达 实时定量 PCR 结果中显示:与正常对照组比较,模型对照组 CD36 表达下调($P < 0.05$),载脂蛋白 A1 和 CFTR 表达上调($P < 0.05$)。CD36 和阴性对照组比较,在实验观察高剂量组、实验观察中剂量组和实验观察低剂量组胃组织中表达上调($P < 0.05$)。载脂蛋白 A1 和阴性对照组比较,在实验观察高剂量组、实验观察中剂量组和实验观察低剂量组表达下调($P < 0.05$)。与实验观察低剂量组比较,实验观察高剂量组表达下调($P < 0.05$)。CFTR 和阴性对照组比较,在实验观察高剂量组、实验观察中剂量组和实验观察低剂量组表达下调($P < 0.05$)。见图 7。

2.2.3 载脂蛋白 A1、CD36、CFTR 蛋白在 CAG 大鼠胃组织中的表达 与正常对照组比较,模型对照组 CD36 表达下调($P < 0.05$),载脂蛋白 A1 和 CFTR 表达上调($P < 0.05$)。CD36 和阴性对照组比较,在实验观察高剂量组、实验观察中剂量组胃组织中表达上调($P < 0.05$)。与实验观察低剂量组比较,实验观察高、中剂量组表达上调($P < 0.05$)。载脂蛋白 A1 和阴性对照组比较,在实验观察高剂量组、实验观察中剂量组和实验观察低剂量组表达下调($P < 0.05$)。与实验观察中剂量组比较,实验观察高剂量组表达上调($P < 0.05$)。CFTR 和阴性对照组比较,在实验观察高剂量组、实验观察中剂量组

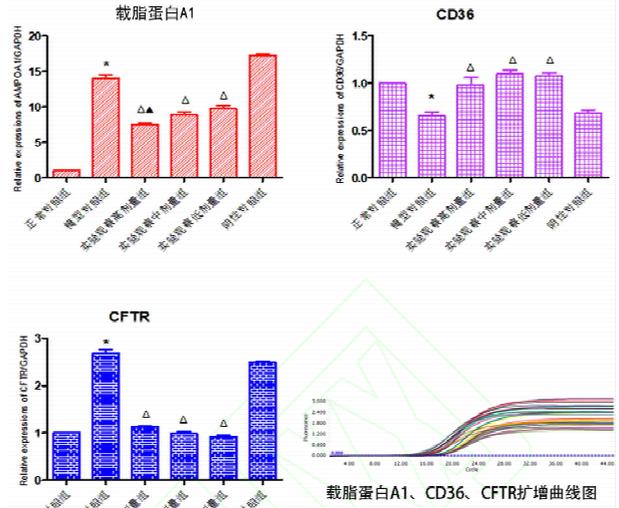


图 7 实时定量 PCR 检测 CD36、CFTR、APOA 载脂蛋白 A1 在 CAG 大鼠胃组织中基因的表达

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与阴性对照组比较, $\Delta P < 0.05$;与实验观察低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

和实验观察低剂量组表达下调($P < 0.05$)。与实验观察中剂量组比较,实验观察高剂量组表达上调($P < 0.05$)。见图 8。

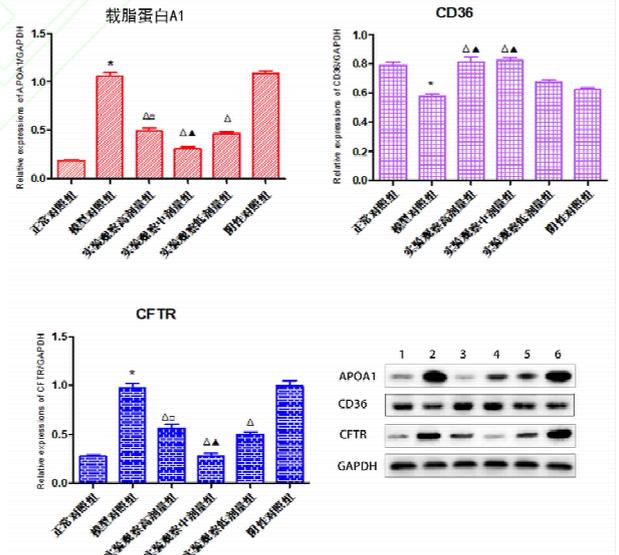


图 8 Western Blotting 检测 CD36、CFTR、载脂蛋白 A1 在 CAG 大鼠胃组织中蛋白的表达

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与阴性对照组比较, $\Delta P < 0.05$;与实验观察低剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$;与实验观察中剂量组比较, $\square P < 0.05$;1. 正常对照组;2. 模型对照组;3. 实验观察高剂量组;4. 实验观察中剂量组;5. 实验观察低剂量组;6. 阴性对照组

3 讨论

CAG 疾病常常反复发作,迁延难愈,在中医学中属于“胃脘痛”“痞证”等范畴,与肝脾密切相关^[11]。安胃汤是已故名老中医林沛湘教授治疗慢性胃病总结的经验方。由《伤寒论》中“半夏泻

心汤”加减而来,制定了“顺五脏、安胃腑”的治疗方法。本方中以制半夏为君药,具有“燥胃湿,益脾胃气,散结”之用;《伤寒论》中半夏用量为半升,参照全小林等^[12]研究中的换算单位约为 48 g,在治疗萎缩性胃炎时临床常用剂量为 10 ~ 15 g^[13],故本方中半夏的用量为 13 g。白芍柔肝健脾止痛,配以乌药疏肝解郁止痛,薏苡仁健脾除湿;少佐黄连泻火解毒,干姜温中逐寒,寒热同施,辛开苦降;丹参;凉血祛瘀,配合百合、炙甘草,则养津护胃,酸甘化阴以生津液。本方组方严谨,疏肝理脾,平调寒热,祛湿化瘀,主治寒热错杂、痰瘀内结之证。方中半夏具有抑制胃酸分泌、止吐、抗消化性溃疡、保护胃黏膜的现代药理学作用^[14];丹参为调理血分要药,具有“一味丹参,功同四物”的美誉,周庆华和王红梅^[15]研究显示丹参能够通过抑制胃酸分泌对胃黏膜损伤具有保护作用。临床研究都证实安胃汤加味治疗 CAG 具有较好的临床疗效,能有效改善患者的中医证候^[16-17]。本研究的动物实验结果也显示,安胃汤干预治疗能有效改善 CAG,能够改善 CD36、CFTR、载脂蛋白 A1 在 CAG 胃组织中的表达。

本研究通过 GEO 数据库筛选得到 CAG 差异表达的基因有 20 个,在对这 20 个差异表达基因的生物信息学分析过程中发现,这些差异表达的基因参与了多个生物过程,主要分布在 8 条信号通路上,根据参与通路的多少确定 CD36、CFTR、载脂蛋白 A1 为 CAG 疾病关键靶点。经检索发现目前未见有人对其进行相关研究报道,故本研究通过动物实验进一步对其验证,探索其发病机制及安胃汤对其的影响,为 CAG 治疗提供新的思路。

CD36 作为 B 类清道夫受体,在脂质摄取、免疫学识别、炎症、分子黏附和细胞凋亡中起关键作用,它广泛存在于血小板、单核细胞、脂肪细胞、血管内皮细胞、小胶质细胞中,通过与多种配体相结合,从而介导先天性免疫和炎症等不同的生物过程。本研究预测出 CD36 主要存在于脂肪的消化吸收、PPAR 信号通路、AMPK 信号通路、吞噬体中。Wu 等^[18]研究发现 AMP 活化蛋白激酶可通过上调 CD36 的表达,促进胃肠道长链脂肪酸的摄取,而细胞长链脂肪酸摄取是调节细胞能量稳态的关键生理过程。Chen 等^[19]研究发现,巨噬细胞中氧化的 LDL/CD36 信号将脂肪酸代谢失调与线粒体的氧化应激联系在一起,从而驱动慢性炎症。Farokhzadian 等^[20]也发现 S100A12-CD36 通过与晚期糖基化终产物和 Toll

样受体 4 结合可促进细胞和免疫途径改变炎症。过氧化物酶体增植物激活受体 γ 也被认为是调控 CD36 表达的关键因子,Febbraio 等^[21]研究发现,在过氧化物酶体增植物激活受体 γ 缺失的细胞中,CD36 的表达相应下调。CD36 在脂肪酸代谢活跃的组织中具有很高的表达量,例如心脏、脂肪、小肠及肌肉组织等,而在无利用脂肪酸能力的肝细胞中表达极低^[22]。王毅群等^[23]研究显示胞质内的 CD36 转运脂肪酸的能力与 AMPK 信号通路有关。本研究显示,与正常对照组比较,模型组大鼠胃组织中 CD36 的表达下调,并具有显著性差异。本研究的预测结果和试验结果均提示,CD36 可能为 CAG 的关键靶点。与阴性对照组比较,实验观察组(安胃汤干预组)高、中、低剂量组中胃组织 CD36 蛋白表达上调,并具有显著性差异。实验结果提示,安胃汤能通过对 CD36 的调节改善 CAG,其机制可能与 CD36 调节脂肪的消化吸收、PPAR 信号通路、AMPK 信号通路有关。

CFTR 是一种囊性纤维化跨膜传导调节因子,属于 ATP 门控性氯离子通道,表达于气道、消化道及生殖道上皮细胞顶部质膜中,主要功能是参与膜内外氯离子运输,可影响消化道、呼吸道等上皮功能^[24]。本研究预测出 CFTR 是 CAG 的关键靶标,动物实验结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠胃组织中 CFTR 上调,与阴性对照组比较,实验观察组(安胃汤干预组)高、中、低剂量组中胃组织 CFTR 蛋白表达下调,并具有显著性差异。本研究预测出 CFTR 在 CAG 中的表达主要与胃酸分泌物、AMPK 信号通路、胆汁分泌物有关。Zhang 等^[25]研究发现,予以 CFTR 基因敲除后的细胞可明显减少白细胞介素-8、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、白细胞介素-10 和肿瘤坏死因子- α 等炎症介质表达。Wen 等^[26]研究发现 Hp 感染会损害十二指肠黏膜碳酸氢盐转运蛋白 CFTR 和 SLC26A6 的表达和功能活性。Liu 等^[27]研究显示,胃癌患者 CFTR 和 CA199 浓度有统计学意义的关联,且组合的 CFTR、CA199 和 CEA 作为胃癌诊断标志物产 ROC 曲线下面积 0.875,具有较高诊断价值。综上所述,CFTR 是可能是 CAG 的关键靶标,并具有较高的价值。

载脂蛋白 A1 是血浆脂蛋白部分,是高密度脂蛋白的主要蛋白组成,可以有效阻止 T 淋巴细胞和巨噬细胞之间的相互作用,抑制炎症介质的产生,从而改善炎症的“瀑布效应”^[28]。本研究显示载脂蛋白 A1 可能是 CAG 的关键靶点主要分布在脂肪的消

化吸收、PPAR 信号通路上。动物试验结果显示,与正常对照组比较,模型组大鼠胃组织中载脂蛋白 A1 的表达上调,并具有显著性差异;与阴性对照组比较,实验观察组(安胃汤干预组)高、中、低剂量组中胃组织 CFTR 蛋白表达下调,并具有显著性差异。载脂蛋白 A1 的表达对于 CAG 的脂肪的消化吸收具有重要作用。载脂蛋白 A1 的表达对于消化系统常见疾病也具有重要的意义。Stoye 等^[29]发现载脂蛋白 A1 的表达水平可改变阿尔茨海默病大鼠的胃肠道功能。周扬和田亚平^[30]研究发现载脂蛋白 A1 在胃癌和不典型增生的鉴别诊断中有着重要的意义。高艳红等^[31]研究显示胃癌组和结直肠癌组血清载脂蛋白 A1 水平显著低于正常对照组($P < 0.01$),结果提示载脂蛋白 A1 可能在肿瘤发展过程中有某种重要作用。载脂蛋白 A1 可能是胃癌新的潜在生物标志物,联合检测其他蛋白可能会提高胃癌诊断的特异度及灵敏度。综上所述,载脂蛋白 A1 可能是 CAG 疾病的关键靶点,并与脂肪的消化吸收有重要作用。

综上所述,本研究将生物芯片大数据,结合生物信息学分析,从一个整体的层面上发现载脂蛋白 A1、CD36、CFTR 是 CAG 发病的关键靶点和作用机制,并通过动物实验进行了验证,发现 CD36 在 CAG 胃组织中表达下调,载脂蛋白 A1 和 CFTR 的表达上调。并与胃酸分泌、脂肪的消化吸收、PPAR 信号通路、AMPK 信号通路有关。安胃汤干预能够显著改善 CAG 大鼠胃组织中 CD36、载脂蛋白 A1 和 CFTR 的表达。作为 CAG 的核心蛋白,是否也作为其他药物靶点值得进一步去研究。

本研究为单中心大鼠的小样本研究也存在不足。亟待进行多中心、大样本的临床研究。

参考文献

- [1] Marques-Silva L, Areia M, Elvas L, et al. Prevalence of gastric precancerous conditions: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014, 26(4): 378-387.
- [2] 罗晓明, 宋仙平, 秦威, 等. 幽门螺杆菌的感染现状和诊断治疗进展[J]. 江苏预防医学, 2019, 30(6): 646-649.
- [3] Du Y, Bai Y, Xie P, et al. Chronic gastritis in China: a national multi-center survey[J]. BMC Gastroenterol, 2014, 14: 21.
- [4] 留甜甜, 宋亚刚, 田硕, 等. 基于中西医临床病症特点的慢性萎缩性胃炎动物模型分析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(4): 777-781.
- [5] Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis[J]. Gut, 2015, 64(9): 1353-1367.
- [6] 吴承芳. 安胃汤联合四联疗法治疗幽门螺杆菌相关性胃炎寒热错杂证的临床观察[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2019.
- [7] 廖冬燕, 朱永革, 张学宁, 等. 安胃汤治疗慢性萎缩性胃炎疗效与安全性观察[J]. 广西中医药, 2015, 38(1): 12-15.
- [8] 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.
- [9] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药, 2021, 16(4): 527-532.
- [10] 唐旭东, 张翠萍, 张琪, 等. 改良式 Hp 感染萎缩性胃炎大鼠模型的建立[J]. 青岛大学医学院学报, 2012, 48(3): 247-249, 252.
- [11] 刘赓, 张声生. 调肝理脾法治疗慢性萎缩性胃炎[J]. 世界中医药, 2015, 10(5): 695-698.
- [12] 全小林, 吴义春, 穆兰澄, 等. 经方大剂量探索[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(1): 18-21.
- [13] 王晓燕. 半夏泻心汤常用剂量与经方本源剂量的比较[J]. 河南中医, 2011, 31(9): 958-961.
- [14] 纪万里, 王婷婷, 安靓, 等. 基于定量蛋白质组学技术探究半夏泻心汤对慢性胃炎大鼠影响的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 1-8.
- [15] 周庆华, 王红梅. 丹参对胃黏膜损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(5): 582-585.
- [16] 刘晨萍, 李毅平. 安胃汤加味治疗脾虚血瘀型慢性萎缩性胃炎的疗效及对患者血液流变学的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2019, 33(1): 28-31.
- [17] 朱健敏. 安胃汤加味治疗慢性萎缩性胃炎胃阴亏虚证的临床研究[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [18] Wu W, Wang S, Liu Q, et al. AMPK facilitates intestinal long-chain fatty acid uptake by manipulating CD36 expression and translocation[J]. FASEB J, 2020, 34(4): 4852-4869.
- [19] Chen Y, Yang M, Huang W, et al. Mitochondrial Metabolic Reprogramming by CD36 Signaling Drives Macrophage Inflammatory Responses[J]. Circ Res, 2019, 125(12): 1087-1102.
- [20] Farokhzadian J, Mangolian Shahrabaki P, Bagheri V. S100A12-CD36 axis: A novel player in the pathogenesis of atherosclerosis? [J]. Cytokine, 2019, 122: 154104.
- [21] Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism[J]. J Clin Invest, 2001, 108(6): 785-791.
- [22] Febbraio M, Guy E, Coburn C, et al. The impact of overexpression and deficiency of fatty acid translocase (FAT)/CD36[J]. Mol Cell Biochem, 2002, 239(1-2): 193-197.
- [23] 王毅群, 董怡, 涂治才, 等. 吡啶羧酸铬通过 AMPK 信号通路促进 3T3-L1 脂肪细胞脂肪酸转位酶 CD36 的转位[J]. 中国临床药理学杂志, 2011, 20(4): 193-197.
- [24] Linsdell P. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR): Making an ion channel out of an active transporter structure[J]. Channels (Austin), 2018, 12(1): 284-290.
- [25] Zhang S, Shrestha CL, Wisniewski BL, et al. Consequences of CRISPR-Cas9-Mediated CFTR Knockout in Human Macrophages[J]. Front Immunol, 2020, 11: 1871.
- [26] Wen G, Jin H, Deng S, et al. Effects of Helicobacter pylori Infection on the Expressions and Functional Activities of Human Duodenal Mucosal Bicarbonate Transport Proteins[J]. Helicobacter, 2016, 21(6): 536-547.

电流的改变能够调节心肌细胞平台期兴奋收缩耦联功能^[5]。当心肌细胞的钙离子循环发生紊乱时,往往会触发早后除极从而导致折返性心律失常的发生^[6]。临床上 IV 类抗心律失常药物正是通过抑制 ICa-L 来缓解心肌细胞 Ca²⁺ 超载,减少迟后除极,从而达到减慢心率的效果。

临床研究显示炙甘草汤不仅在治疗各种中医证型的心律失常时疗效显著^[7-8],还对持续性心房颤动能够达到转复复律而不出现血栓的效果^[9]。动物实验研究显示炙甘草汤可通过延长心室肌场电位时程进而逆转心房颤动诱发的家兔心肌纤维化^[10-11]。同时炙甘草汤还可对心肌缺血再灌注损伤诱发的室性心动过速和心室颤动起减轻或预防作用^[12]。近年来有关应用血清药理学方法结合膜片钳技术研究炙甘草汤对家兔心肌细胞各离子通道的实验已证实了炙甘草汤对心室肌细胞 ICa-L 具有浓度依赖性的抑制作用^[13]。同时在体实验研究表明炙甘草汤对家兔快速心房起搏导致的电重构有抑制和转复效果^[14]。

在以往研究的基础上,本实验主要应用全细胞膜片钳技术观察炙甘草汤对大鼠心房肌细胞 ICa-L 及其动力学特征的影响。实验结果表明低、中、高剂量的炙甘草汤对正常大鼠心房肌细胞 ICa-L 均具有抑制作用,均可使 I-V 曲线上移。而中剂量(2.25 g/mL)与高剂量(4.5 g/mL)相对 ICa-L 峰值密度的影响并无明显差异,这可能是由于 2.25 g/mL 的炙甘草汤是成人临床等效剂量经体表面积 1:1 换算得来,并且 4.5 g/mL 的炙甘草汤药液因过分浓稠在喂养过程中吸收欠佳的缘故,因此选取 2.25 g/mL 炙甘草汤药物组与对照组比较心房肌细胞 L 型钙通道的动力学特征。观察发现 L 型钙通道失活速度减慢及失活后恢复时间延长。由于心房肌细胞膜表面钙离子内流受到抑制时能够避免诱发钙离子超载和震荡,而钙通道动力学特征的改变会明显影响动作电位的形状,使心房肌细胞动作电位平台期延长,心肌收缩力下降,从而减慢心率,这可能也是炙甘草汤治

疗临床上房性快速型心律失常的重要机制。

参考文献

- [1] Vincenti A, Brambilla R, Fumagalli MG, et al. Onset mechanism of paroxysmal atrial fibrillation detected by ambulatory Holter monitoring [J]. *Europace*, 2006, 8(3): 204-210.
- [2] Al-Khatib SM, Stevenson WG, Ackerman MJ, et al. 2017 AHA/ACC/HRS Guideline for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society [J]. *Circulation*, 2018, 138(13): e272-e391.
- [3] Scardigli M, Cannazzaro S, Coppini R, et al. Arrhythmia susceptibility in a rat model of acute atrial dilation [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2020, 154: 21-29.
- [4] 黄从新, 张澍, 黄德嘉, 等. 心房颤动: 目前的认识和治疗建议-2018 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2018, 32(4): 315-368.
- [5] 王世强, 杨华乾. 心肌细胞兴奋收缩耦联的分子机制 [J]. *中国科学. 生命科学*, 2013, 43(10): 833-841.
- [6] 湛晶晶, 王丹丹, 黄从新. 钙循环紊乱与心力衰竭后心律失常 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2017, 31(3): 264-266.
- [7] 王永成, 马度芳, 李晓. 炙甘草汤对心律失常气阴两虚证患者心率变异性及炎症因子的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(11): 165-170.
- [8] 陶诗怡, 张瑾, 于林童, 等. 中西医结合治疗原发性高血压并发心房颤动有效性和安全性的 Meta 分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(20): 6336-6343.
- [9] 熊兴江. 基于现代病理生理及 CCU 急危重症病例的炙甘草汤方证溯源及其复律、转复、止血、升血小板、补虚临床运用 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(18): 3842-3860.
- [10] Sun J, Wugeti N, Mahemuti A. Reversal effect of Zhigancao decoction on myocardial fibrosis in a rapid pacing-induced atrial fibrillation model in New Zealand rabbits [J]. *J Int Med Res*, 2019, 47(2): 884-892.
- [11] Sun J, Lu Y, Yan H, et al. Application of the myocardial tissue/silicon substrate microelectrode array technology on detecting the effect of Zhigancao Decoction medicated serum on cardiac electrophysiology [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(2): 2017-2023.
- [12] 郑旭颖, 麻春杰, 陈永真, 等. 基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路探讨炙甘草汤抗大鼠 MIRI 致室速和室颤的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17): 1-8.
- [13] 周承志, 张道亮, 王腾, 等. 炙甘草汤含药血清对兔心肌细胞钙电流的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2007, 30(7): 468-471.
- [14] 周承志, 吴成云, 杨波, 等. 炙甘草汤对快速起搏心房电重构的影响 [J]. *中国中医急症*, 2014, 23(9): 1607-1609.

(2020-10-27 收稿 本文编辑:张雄杰)

(上接第 1384 页)

- [27] Liu H, Wu W, Liu Y, et al. Predictive value of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) in the diagnosis of gastric cancer [J]. *Clin Invest Med*, 2014, 37(4): E226-232.
- [28] Wu J, Wang Y, Li H, et al. Serum apolipoprotein B-to-apolipoprotein AI ratio is independently associated with disease severity in patients with acute pancreatitis. [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7764.
- [29] Stoye NM, Dos Santos Guilherme M, Endres K. Alzheimer's disease

in the gut-Major changes in the gut of 5xFAD model mice with ApoA1 as potential key player [J]. *FASEB J*, 2020, 34(9): 11883-11899.

- [30] 周扬, 田亚平. 血清学指标联合筛查对胃癌诊断的临床意义 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2014, 21(5): 520-524.
- [31] 高艳红, 张妍, 田亚平, 等. 不同类型肿瘤患者的血脂水平分析 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2010, 17(5): 277-280.

(2021-05-19 收稿 本文编辑:吴珊,徐颖)