

· 实验研究 ·

基于转录组学探讨复方胃炎合剂治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变的作用机制^{*}黄小燕 倪艺婧 黄铭涵[▲] 王 鑫

摘要 目的:采用转录组测序(RNA-seq)技术挖掘复方胃炎合剂治疗慢性萎缩性胃炎癌前病变(PLGC)的作用关键靶点,并验证其机制。**方法:**将21只SPF级Wistar雄性大鼠随机分为空白组(6只)与造模组(15只),采用复合造模法构建PLGC模型,处死3只验证模型成功后,造模组随机分为模型组(n=6)和CGM组(n=6)。CGM组给予复方胃炎合剂原液灌胃,空白组及模型组给予生理盐水灌胃,共灌胃30 d。末次给药12 h后,取胃组织,进行转录组测序;实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)进一步验证CGM对PLGC大鼠胃组织脂肪因子(Adiponectin、Leptin)和炎症因子(TNF- α 、IL-6)mRNA表达水平的影响。**结果:**通过对转录组数据进行分析发现,PLGC与Adipocytokine信号通路、Thyroid hormone信号途径、糖酵解/糖异生途径以及特定类型癌症相关的途径关系异常密切;RT-PCR结果表明模型组与CGM组中的Adiponectin、Leptin、TNF- α 和IL-6的mRNA表达水平存在显著差异,并且CGM能显著降低这四种因子的mRNA表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论:**CGM可通过下调Adiponectin、Leptin、TNF- α 和IL-6的mRNA以逆转PLGC相关的病理改变。

关键词 复方胃炎合剂;慢性萎缩性胃炎癌前病变;转录组学

胃癌(gastric cancer, GC)是全球范围内常见的恶性肿瘤之一,特别是在我国,其高发率和高致死率对人类健康和生命造成严重威胁,所带来的负担亦尤为沉重,2022年胃癌新发病例约为50.9万,死亡人数约为40万,居全球首位^[1]。GC的发展通常始于慢性萎缩性胃炎癌前病变(Precancerous lesions of gastric cancer, PLGC),这是一种在慢性萎缩性胃炎(Chronic Atrophic Gastritis, CAG)的基础上发生的异常变化,主要包括胃黏膜不完全型肠上皮化生和上皮内瘤变。

本课题组在国医大师杨春波教授指导下,对PLGC进行了系列研究:结合中医证候学调查,认为PLGC证候多以脾胃气虚为本,痰、湿、热、瘀为标^[2-3];在总结“胃炎1号”^[4]及“胃炎合剂”^[5]疗效基础上,进一步优化而成以健脾清化舒络为主要功效的协定方“复方胃炎合剂”(compound gastritis mixture, CGM)^[6]。在前期的基础和临床研究中,本课题组已明确CGM对

于逆转胃黏膜的肠上皮化生与上皮内瘤变疗效显著,但其具体机制尚待进一步明确。本研究基于转录组学的方法,对CGM逆转胃黏膜病理改变的作用机制展开研究,以期为临床应用该方剂提供科学依据。

1 材料

1.1 实验动物 SPF级wistar雄性大鼠21只,体质量(110 \pm 10)g,购自上海莱斯克实验动物有限公司,动物许可证编号:SYXK(闽)2020-0002。所有大鼠饲养于福建中医药大学SPF级动物实验中心,12/12 h昼夜交替,环境温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,湿度(55% \pm 5%)。研究已通过福建中医药大学动物实验伦理委员会审批,批准号2W2023036。

1.2 药物 ①复方胃炎合剂的制备来源于福建中医药大学附属第二人民医院药剂室。具体药物如下:炙黄芪150 g,党参100 g,炒白术100 g,茯苓150 g,枳壳60 g,白芍100 g,法半夏100 g,砂仁45 g,佩兰100 g,黄连30 g,陈皮60 g,地龙干150 g,莪术60 g,甘草30 g。药液制备方法:加水(药物的8倍量)浸泡0.5 h,煎煮3次,第1次、第2次、第3次的煎煮时长分别为1.5 h、1 h、0.5 h,最后合并3次煎液,过滤药渣。将滤液置于60~70 $^{\circ}$ C下减压浓缩至500 mL,以含生

^{*}基金项目 国家自然科学基金项目(No.82174365);福建省自然科学基金项目(No.2021J01883)

[▲]通信作者 黄铭涵,男,主任医师,硕士研究生导师。研究方向:中医脾胃病的临床及基础研究。E-mail:huangminghan2010@163.com

• 作者单位 福建中医药大学附属第二人民医院(福建 福州 350003)

药 2.67 g/mL 为最终所取药液浓度,灭菌分装后置于 4 °C 冰箱保存备用。②盐酸雷尼替丁胶囊,0.15 g/片,赛诺菲(杭州)制药有限公司生产,批准文号:国药准字 H33021741。

1.3 试剂与仪器 总 RNA 提取试剂盒(DP424),产自北京天根生化科技有限公司;PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(RR047B),产自北京宝日医生物技术有限公司;SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus),ROX plus (RR82LR),产自北京宝日医生物技术有限公司;测序平台(北京奥维森科技有限公司);PCR 扩增仪、实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Nanodrop 2000 超微量分光光度计(美国 ThermoFisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 分组与模型构建 根据课题组既往造模方案进行模型分组与构建^[6-7]。按随机数字法将 21 只大鼠分为 2 组,空白组 6 只,PLGC 造模组 15 只。空白组大鼠予足量饮用水及饲料自由饮食。造模组大鼠于实验前适应喂养 1 w,随后予多因素复合造模:①浓度为 120 mg/L 的 1-Methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine 溶液自由饮用;②雷尼替丁 0.03 g/(kg·d)灌胃;③每周 45% 乙醇灌胃 2 次,灌胃前予空腹 12 h,每次 2 mL;④饥饱失常喂养法,每周禁食 1 次,24 h/次,连续造模 24 w。24 w 后,随机处死造模组大鼠 3 只,并取胃组织进行病理检查以验证 PLGC 造模是否成功。

2.2 药物干预 完成大鼠模型构建后,采用随机数字法将验证后的 12 只 PLGC 模型大鼠分为模型组、复方胃炎合剂组(CGM 组),每组各 6 只。CGM 的成人临床每日用量为:炙黄芪 15 g,党参 10 g,炒白术 10 g,茯苓 15 g,枳壳 6 g,白芍 10 g,法半夏 10 g,地龙干 15 g,砂仁 4.5 g,佩兰 10 g,黄连 3 g,陈皮 6 g,莪术 6 g,甘草 3 g。根据药物剂量等效换算,CGM 组给予复方胃炎合剂原液灌胃,给药剂量为 13.35 g/(kg·d),用生理盐水稀释至 4 mL;空白组及模型组给予 4 mL 生理盐水灌胃。各组均每日灌胃 1 次,共 30 d。

2.3 样本采集 取材前予禁食 12 h。大鼠予乙醚麻醉后,沿其腹部前正中中线剖开,分离胃,沿胃大弯剪开,用生理盐水将大鼠胃黏膜表面污物清洗干净,取胃窦部放入冻存管中,液氮速冻,随后 -80 °C 冻存备用。

2.4 转录组学测序 在本研究项目中,先采用核糖体 RNA 去除试剂盒从总 RNA 中除去 rRNA,进而使用离子打断技术将 RNA 断裂为长度约 300 bp 的片段。

选择此长度是因为接头长度是预设的;若片段过短,将导致接头序列在测序数据中占比过高,降低数据的有效性;若片段过长,则不利于测序过程中簇的形成。随后,采用六碱基随机引物和逆转录酶,以 RNA 为模板合成 cDNA 第一链,继而以此为模板合成第二链 cDNA。文库构建完毕后,通过聚合酶链反应(PCR)扩增文库片段,并依据片段大小筛选,优选长度为 450 bp 的文库片段。利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 对文库质量进行严格检验,并测定文库的总浓度及有效浓度。基于文库的有效浓度及所需数据量,将带有不同 Index 序列的文库按比例混合,便于在测序数据输出后根据 Index 区分不同样本。混合文库随后被均一化稀释至 2 nM,并进行碱变性处理,形成单链文库以供测序使用。在完成样品的 RNA 抽提、纯化及文库构建等一系列预处理步骤后,本研究采用基于 Illumina HiSeq 平台的第二代测序技术,对文库进行双末端测序分析。测序由北京奥维森科技有限公司协助完成。

2.5 差异基因筛选及功能富集分析 在进行原始数据质量控制时,首先去除含有接头序列和低质量碱基部分,以得到用于转录组分析的高质量序列。随后,使用 HISAT2 软件将过滤后的高质量序列与小鼠参考基因组进行比对,而后用 RSEM 软件对基因表达水平进行定量分析,以准确地估计基因的转录本丰度。采用 R 语言 ggplots2 软件包绘制差异表达基因的火山图,使用 R 语言 Pheatmap 软件包对 CGM 组差异表达基因的交集和样品进行双向聚类分析。最后,利用 Metascape 网站对筛选出的核心基因进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,所采用的检验方法为 Fisher 精确检验。

2.6 RT-PCR 检测基因表达 实时荧光定量 RT-PCR 检测基因表达根据总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,采用 Nanodrop 2000 超微量分光光度计检测 RNA 纯度,采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行反转录实验予合成 cDNA 模板。在 96 孔板中加入 1 μL 的 cDNA 和 19 μL 的 Real-time PCR 反应液(10 μL 的 2×SYBR Green qPCR Master Mix,1 μL 前引物,1 μL 后引物,7 μL 的 DEPC 水),置于 PCR 仪扩增,反应条件为:95 °C,30 s 预变性;95 °C 变性 15s,60 °C 退火延伸 30 s,共 40 个循环。GAPDH 作为内参校正,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算各基因的相对表达量。基因引物序列如表 1 所示。

表1 PCR引物序列

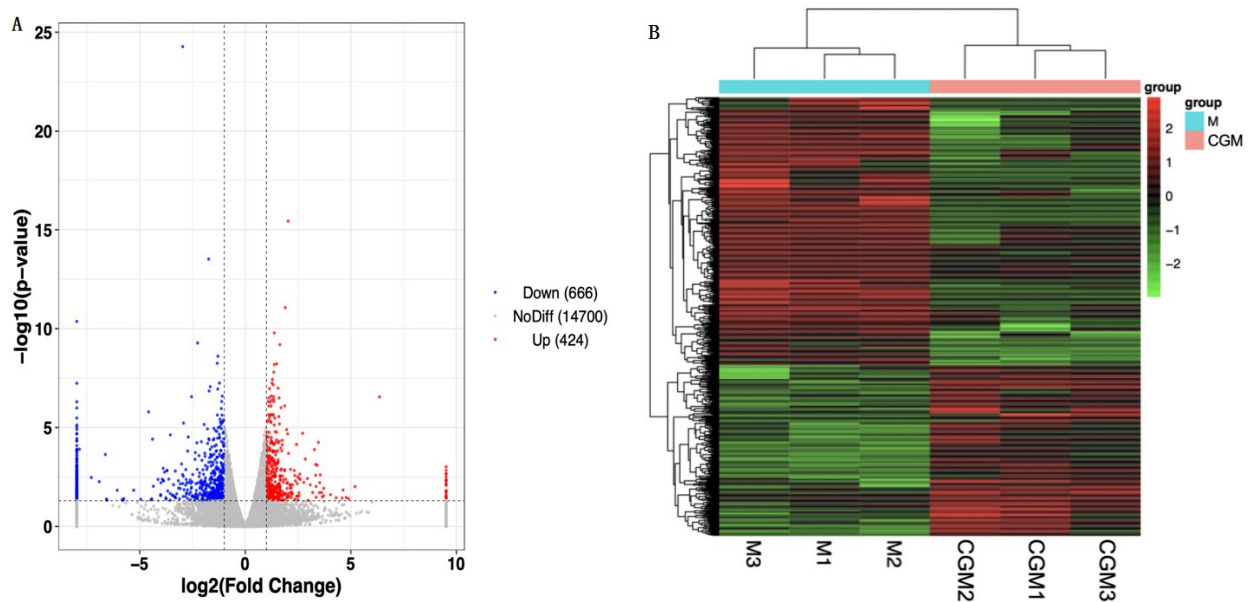
基因	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	产物长度
Adiponectin	CGCAGGTGTTCTTGCTCCTA	GTTGTCCCCTTCCCATAACA	454 bp
Leptin	GACACCCTTAGAGGGGCTA	AACCCAAGCCCCTTTGTTC	402 bp
TNF- α	ATCCGAGATGTGGAAGTGGC	AAATGGCAAATCGGCTGACG	472 bp
IL-6	CCACCCACAACAGACCAGTA	GTCTTGGTCCCTTAGCCACTCC	451 bp
GAPDH	GACTCTACCCACGGCAAGTT	GATGCATGGACTGTGGTCA	396 bp

2.7 统计学分析 使用SPSS 20.0对数据进行统计学分析,计量资料采用S-W检验验证数据正态性,采用Levene检验验证数据方差齐性。符合正态分布数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,符合正态分布与方差齐性的多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。P<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

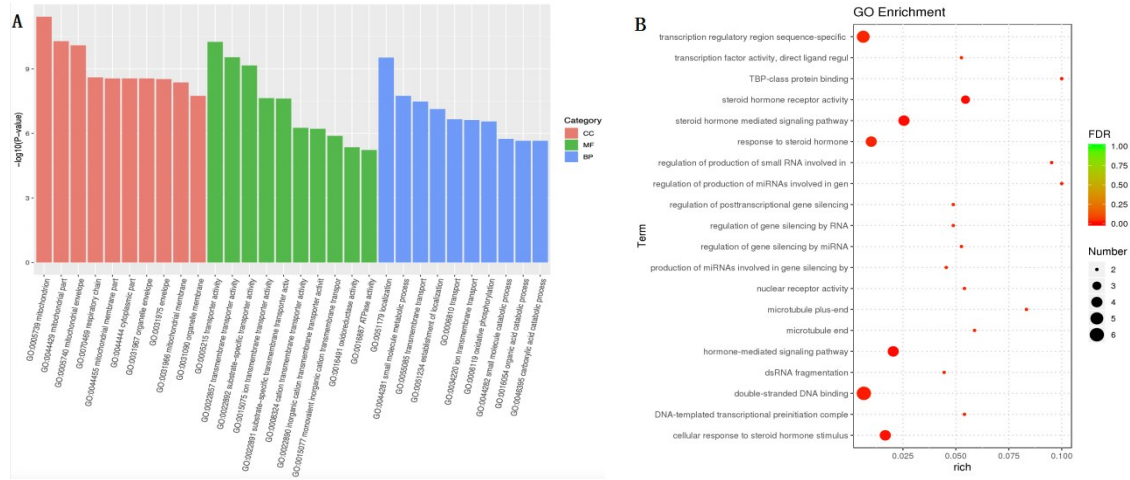
3.1 CGM组与模型组间胃组织的差异表达基因(DEGs) 采用转录组学技术对模型组与CGM组的胃组织基因表达差异进行了分析。在筛选标准 Fold Change \geq 2, P<0.01下,发现两组之间共有1090个DEGs。与模型组相比,CGM组中有424个基因明显上调,666个基因明显下调。这些结果通过火山图(见图1A)和分级聚类热图(见图1B)展示了整体的分布情况。

3.2 胃组织差异表达基因的GO富集分析 对经过CGM干预的PLGC大鼠出现的DEGs进行GO功能富集分析后发现,在细胞组分(CC)类别中,这些基因与线粒体、呼吸链、细胞膜这些组分的关联最为密切;在分子功能(MF)方面,转运蛋白活性、跨膜转运蛋白活性、底物特异性转运活性、底物特异性的跨膜转运活性、氧化还原酶活性、ATP酶活性等的富集度最为显著;在生物过程(BP)方面,这些基因主要与细胞内部或细胞之间特定分子或结构的位置调节、小分子代谢过程、跨膜转运、氧化磷酸化、糖酵解过程等过程密切相关(见图2A)。此外,GO富集分析气泡图(见图2B)显示,转录调控和类固醇激素响应等相关生物学过程显示出显著的富集。转录调控的富集可能反映了某些转录因子在基因调控网络中的活跃作用,这些因子可能是响应细胞外信号(如激素刺激)而激活或抑制靶基因表达的关键调控者。



A. 火山图(该图中每个点代表一个基因。红色点表示显著上调的基因,绿色点表示显著下调的基因,黑色点表示表达没有显著变化的基因。x轴测量基因表达倍数变化的对数,y轴显示p值的负对数,突出提示统计学意义);B. 分级聚类热图(该图提示两组之间基因表达的层次聚类。热图中的每个矩形对应于基因的表达水平;红色表示显著上调,绿色表示显著下调。这些矩形的排列显示了跨组基因表达的聚类模式)

图1 CGM组与模型组间胃组织差异表达基因的火山图与分级聚类热图

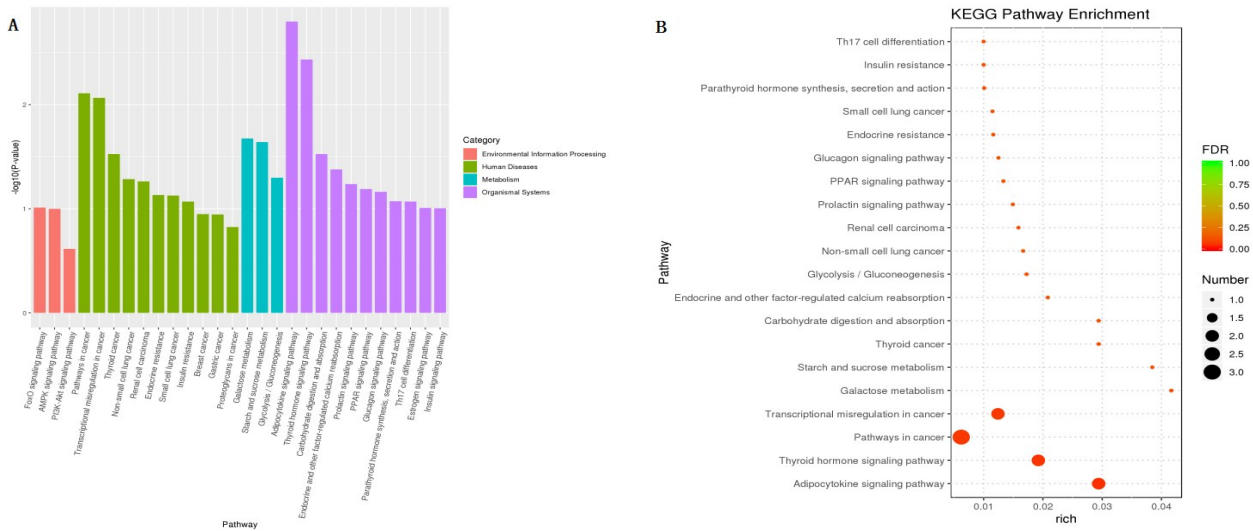


A. 模型组与CGM组之间DEGs的功能类别分析; B. 生物过程GO富集分析的气泡图

图2 胃组织差异表达基因的GO富集分析图

3.3 胃组织差异表达基因的KEGG通路富集分析
 对经过CGM干预的PLGC大鼠出现的DEGs进行KEGG通路富集分析后发现,遗传信息处理的人类疾病中的癌症通路、癌症中的转录失调,以及生物学途径类别中的脂肪细胞因子信号通路和甲状腺激素信号通路在PLGC的发生、发展中占据重要作用(见图3A);KEGG路径富集分析显示了一系列代谢途径和与疾病相关的途径,包括Adipocytokine信号通路、

Thyroid hormone 信号途径、糖酵解/糖异生途径以及与特定类型癌症相关的途径,其中最显著的是Adipocytokine 信号通路(见图3B)。甲状腺激素信号途径的富集指出,受该激素调节的基因在样本中表现出差异性表达,这可能影响细胞代谢和生长。脂肪细胞因子和糖酵解/糖异生途径的富集则可能指示能量代谢的变化,这对于理解类固醇激素如何影响能量平衡引起PLGC的发生具有重要意义。



A. 模型组与CGM组中DEGs的KEGG通路分类比较分析; B. 气泡图描绘的前20个显著富集的途径

图3 胃组织差异表达基因的KEGG通路富集分析图

3.4 CGM对PLGC大鼠Adipocytokines mRNA表达的影响
 基于上述转录组学结果,进一步验证Adipocytokines在CGM组的表达差异。Adipocytokines参与了许多重要的生理过程,常见的Adipocytokines包括脂联素(Adiponectin)、瘦素(Leptin)、肿瘤坏死因

子(Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)。采用RT-PCR检测以上四种Adipocytokines,结果如表2所示。与空白组比较,模型组能明显升高Adiponectin、Leptin、TNF- α 、IL-6的mRNA表达量($P < 0.01$);与模型组比较,CGM组

Adiponectin、Leptin、TNF- α 、IL-6的 mRNA 表达量均出现显著下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组脂肪因子和炎症因子 mRNA 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	Adiponectin	Leptin	TNF- α	IL-6
空白组	1.005 \pm 0.146	1.066 \pm 0.132	0.942 \pm 0.102	0.976 \pm 0.156
模型组	1.442 \pm 0.187**	2.689 \pm 0.257**	2.201 \pm 0.133**	4.077 \pm 0.619**
CGM组	1.202 \pm 0.129*#	1.458 \pm 0.188**#	1.247 \pm 0.144**#	1.310 \pm 0.383**#

注:与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,** $P<0.01$

4 讨论

本研究结合既往研究结果,探索 CGM 对 PLGC 大鼠模型胃黏膜病变的影响及其潜在机制。研究结果显示,CGM 干预后的大鼠模型在多个与炎症和肿瘤发展相关的基因表达上发生了显著变化,这些变化可能反映了其潜在的治疗作用。考虑到 CGM 的多成分特性,这一结果可能反映了多种活性成分的协同作用,这与中药复方疗法的整体观和多靶点疗法的理念一致。然而,复合药物治疗的确切分子机制往往难以界定,需要进一步的研究去鉴定那些具有药理活性的特定成分,并揭示其如何共同作用于复杂的生物网络。

胃组织 DEGs 的 GO 富集分析以及 KEGG 通路富集分析结果表明,CGM 可能通过影响多个生物学过程和代谢通路发挥作用,如与线粒体功能、呼吸链、跨膜转运蛋白活性、氧化还原酶活性相关的基因的表达变化。特别是 Adipocytokine 信号通路的显著富集,可能反映了 CGM 对于代谢调节和炎症反应的调控作用。这方面的研究尚缺乏,但与现有文献中对脂肪细胞因子在酒精性胃炎中作用的描述是一致的^[8]。

RT-PCR 结果进一步验证了 CGM 能显著降低 PLGC 大鼠炎症相关因子 Adiponectin、Leptin、TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平,这强调了其作为一种潜在的抗炎疗法的价值。不过,值得注意的是,虽然 Adiponectin 通常被视为具有抗炎作用的脂联素^[9-10],其在模型组中的上调可能指示了一个补偿性反应,或是因为 PLGC 病理状态的复杂性而导致背景表达水平变化。此外,Adiponectin 和 Leptin 两种因子的上调,暗示了 CGM 可能对于调节脂肪组织和代谢状态有积极作用,这一点在胃肠道疾病和代谢症状中已日益受到重视^[11-14]。研究中 CGM 显著下调了包括 TNF- α 和 IL-6 在内的促炎细胞因子,这与传统中药对于炎症反应具有调节作用的描述相符合^[15-17]。炎症在 PLGC 的进展中扮演了核心角色,且长期的慢性炎症是许多消化道疾病癌变的已知风险因素。综上,本研究从转录组学

角度探讨了 CGM 干预 PLGC 的微观机制,并指出了未来下一步研究的多个潜在方向,可为 CGM 的临床应用提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and united states, 2022: profiles, trends, and determinants [J]. Chin Med J (Engl), 2022, 135(5):584-590.
- [2] 郑进敏.慢性萎缩性胃炎中医证素及与胃黏膜病理改变相关性研究[D].福州:福建中医药大学,2015.
- [3] 林平,黄小燕,施婧瑶,等.慢性胃炎的证素特点[J].福建中医药大学学报,2013,23(2):7-9.
- [4] 王少明,林才经,杨春波,等.胃炎 1 号对胃黏膜癌前病变大鼠 P53 蛋白表达的影响[J].福建中医药,2006,37(6):50-51.
- [5] 潘秀珍,徐顺犹,杨春波,等.中药胃炎合剂治疗慢性萎缩性胃炎疗效观察[J].中医杂志,1984,25(2):27-28.
- [6] 李思汉,林秀明,田琳,等.健脾清化舒络中药对慢性萎缩性胃炎大鼠 Sonic Hedgehog 信号通路的影响[J].北京中医药大学学报,2021,44(2):143-151.
- [7] 李思汉,李书楠,周福,等.关于中医证候动物模型研究的思考[J].中华中医药杂志,2019,34(8):3357-3361.
- [8] YAMAMOTO S, WATABE K, ARAKI H, et al. Protective role of adiponectin against ethanol-induced gastric injury in mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 302(8):G773-G780.
- [9] TURER A T, SCHERER P E. Adiponectin: mechanistic insights and clinical implications [J]. Diabetologia, 2012, 55(9):2319-2326.
- [10] STRAUB L G, SCHERER P E. Metabolic Messengers: Adiponectin [J]. Nat Metab, 2019, 1(3):334-339.
- [11] YAMAMOTO S, WATABE K, TSUTSUI S, et al. Lower serum level of adiponectin is associated with increased risk of endoscopic erosive gastritis [J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(8):2354-2360.
- [12] ARITA S, KINOSHITA Y, USHIDA K, et al. High-fat diet feeding promotes stemness and precancerous changes in murine gastric mucosa mediated by leptin receptor signaling pathway [J]. Arch Biochem Biophys, 2016, 610:16-24.
- [13] INAGAKI-OHARA K, OKAMOTO S, TAKAGI K, et al. Leptin receptor signaling is required for high-fat diet-induced atrophic gastritis in mice [J]. Nutr Metab (Lond), 2016, 13:7.
- [14] NEUMANN E, LEPPER N, VASILE M, et al. Adipokine expression in systemic sclerosis lung and gastrointestinal organ involvement [J]. Cytokine, 2019, 117:41-49.
- [15] 黄铭涵,黄健,陈琴,等.健脾清化中药复方对大鼠慢性萎缩性胃炎 TLR4-MyD88 依赖途径蛋白表达及 TNF- α 的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(9):1321-1325.
- [16] SEKAI I, WATANABE T, YOSHIKAWA K, et al. A case with eosinophilic gastroenteritis exhibiting enhanced TNF- α and IL-6 responses [J]. Clin J Gastroenterol, 2021, 14(2):511-516.
- [17] NEGOVAN A, IANCU M, TRIPON F, et al. Cytokine TGF- β 1, TNF- α , IFN- γ and IL-6 gene polymorphisms and localization of premalignant gastric lesions in immunohistochemically *H. pylori*-negative patients [J]. Int J Med Sci, 2021, 18(12):2743-2751.

(收稿日期:2024-04-24)

(本文编辑:蒋艺芬)