

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.14.013

香连化浊方对慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃黏膜 EGFR/MAPK/ERK 信号通路的影响

杨玥玮¹, 程楠¹, 刘丽然¹, 董佳琪¹, 柳亚杰¹, 姜建明², 杨倩³, 李博林³✉

1. 河北中医学院研究生院, 河北省石家庄市桥西区新石南路 326 号, 050091; 2. 河北中医学院; 3. 河北省中医院

[摘要] **目的** 探讨香连化浊方治疗慢性萎缩性胃炎(CAG)的可能作用机制。**方法** 利用 GEO 数据库筛选出基因芯片数据集, 基于 GEO2R 工具、GeneCards 数据库获得 CAG 增殖相关差异基因。采用 Metascape 平台对 CAG 增殖相关差异基因进行 GO 分析和 KEGG 富集分析, 寻找与 CAG 相关的生物过程及重要信号通路, 并进行动物实验验证。70 只 Wistar 大鼠, 随机抽取 14 只作为正常组进行常规饲养, 其余 56 只大鼠采用“N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍+饥饿失常+水杨酸钠”联合造模法制备 CAG 模型。造模成功的 50 只大鼠随机分为模型组、摩罗丹组和香连化浊方低、中、高剂量组, 每组 10 只。摩罗丹组大鼠给予摩罗丹溶液 1.4 g/(kg·d)灌胃, 香连化浊方高、中、低剂量组大鼠分别给予香连化浊方溶液 36、18、9 g/(kg·d)灌胃, 正常组和模型组大鼠给予生理盐水 0.01 ml/g 灌胃, 各组均每日 1 次, 连续 60 天。HE 法观察大鼠胃黏膜组织病理学变化, 透射电镜观察大鼠胃黏膜细胞超微结构, Western-blot 法检测胃黏膜组织中表皮生长因子受体(EGFR)、磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶 1(p-ERK1)、原癌基因(c-myc)蛋白表达水平, RT-PCR 法检测胃黏膜组织 EGFR、细胞外信号调节蛋白激酶 1(ERK1)、c-myc mRNA 表达。**结果** 最终得到 45 个 CAG 增殖相关差异基因。GO 和 KEGG 富集分析结果显示, 可影响正向调控细胞因子的产生、正向调控丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联反应、调节氧化应激诱导的细胞死亡等, 涉及与癌症通路、MAPK 信号通路、辅助性 T 细胞 17(Th17)细胞分化等多个信号通路。HE 染色可见各给药组大鼠胃黏膜厚度、固有层腺体排列状态、炎性细胞浸润情况等方面较模型组均有改善, 其中以香连化浊方高、中剂量组效果最佳。透射电镜结果显示, 与模型组比较, 各药物干预后, 线粒体结构恢复, 内质网肿胀减轻, 以香连化浊方高、中剂量组效果较为显著。与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜 EGFR、p-ERK1、c-myc 蛋白及 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 表达明显升高($P<0.05$); 与模型组比较, 香连化浊方高剂量组胃黏膜 EGFR 及 c-myc、摩罗丹组 c-myc、各给药组 p-ERK1 蛋白表达降低, 各给药组 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 表达亦明显降低($P<0.05$); 与摩罗丹组比较, 香连化浊方低剂量组 c-myc 蛋白表达明显升高, 香连化浊方高、中剂量组 EGFR、c-myc mRNA 表达降低, 香连化浊方高、低剂量组 ERK1 mRNA 表达降低($P<0.05$)。**结论** 香连化浊方治疗 CAG 可能机制是调控胃黏膜组织 EGFR/MAPK/ERK 信号通路, 阻断细胞异常分化、增殖, 从而减轻 CAG 胃黏膜组织损伤。

[关键词] 慢性萎缩性胃炎; 香连化浊方; 表皮生长因子受体; 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞外信号调节蛋白激酶

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是指胃黏膜上皮遭受反复损害导致固有腺体减少, 伴或不伴有肠腺化生和(或)假幽门腺化生的一种

病变状态^[1]。CAG 遵循正常胃黏膜→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→上皮内瘤变→胃癌的经典发展模式^[2], 此“炎-癌转化”过程受到学者的广泛关注^[3]。胃黏膜组织长期遭受慢性非可控性炎症的刺激, 产生大量炎性介质, 进一步诱导正常细胞增殖, 最终导致细胞基因突变, 诱导胃癌的发生发展^[4]。CAG 是慢性炎症发展成胃癌的中心环节,

基金项目: 国家中医临床研究基地建设项目(国中医药科技函[2018]131号); 国家科技部重点研发课题(2018YFC1704102); 河北省重点研发计划(21377724D; 21377740D); 河北省中医药管理局科研计划(2022026)

✉ 通讯作者: libolin0313@163.com

因此早期干预 CAG 胃黏膜病变, 逆转萎缩状态是延缓、阻断胃癌发展的治疗关键。

国医大师李佃贵总结多年临证经验, 提出“浊毒内蕴”是 CAG 的基本病机, 创立“化浊解毒”为治疗 CAG 的主要大法^[5], 并组成治疗 CAG 的经验方香连化浊方。相关研究表明, 基于浊毒理论治疗 CAG 的组方在减轻患者临床症状、促进胃黏膜修复、改善胃镜下病理黏膜损伤和组织学病变、逆转胃黏膜萎缩、延缓肠上皮化生和异型增生等方面取得良好的疗效^[6-7]。本研究先运用生物信息学技术获得 CAG 与胃癌差异分析中的增殖相关基因, 通过对关键差异基因进行功能富集分析 (GO) 和通路富集分析 (KEGG), 筛选获得 CAG 潜在治疗通路, 再采用动物实验验证通路上的关键基因, 探索香连化浊方治疗 CAG 的可能作用机制, 以期为其临床运用提供依据。本研究获得河北中医学院动物伦理委员会批准 (审批号: DWLL2019022)。

1 材料

1.1 动物

70 只健康雄性 Wistar 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 (150±20) g, 购买于北京维通利华实验技术有限公司, 实验动物合格证编号: SCXK (京) 2016-0006。所有大鼠于河北中医学院 SPF 级实验动物中心饲养, 环境温度 20~25℃, 相对湿度 50%~70%, 自然光照, 普通饲料喂养, 予自由进食及饮水。

1.2 药物

香连化浊方药物组成: 藿香 10 g, 黄连 6 g, 白术 12 g, 豆蔻 6 g, 白花蛇舌草 15 g, 半枝莲 15 g, 当归 12 g, 川芎 9 g, 全蝎 3 g, 三七粉 2 g, 枳实 10 g, 木香 6 g, 香附 9 g, 茯苓 15 g, 白芍 15 g, 百合 12 g, 砂仁 6 g, 延胡索 10 g。药物由河北省中医院药房提供, 将药物浸泡 30 min 后加水煎煮 2 次, 各 50 min, 合并煎液, 浓缩成含生药 3.6、1.8、0.9 g/ml 的中药液, 4℃冰箱保存备用。摩罗丹浓缩丸 (批号: Z20090013, 邯郸制药股份有限公司), 用蒸馏水配制成浓度为 1.4 g/ml 的摩罗丹混悬液。

1.3 主要试剂及仪器

苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (珠海贝索生物技术有限公司, 批号 BA4025); Primers (上海生工生物工程有限公司, 货号: 260064816); Micro-Amp Optical 8-Cap Strip (美国 Life technologies 公司, 货号: REF4323032); 焦碳酸二乙酯 (DEPC,

美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号: D5758); Eastep Super Total RNA Extraction 试剂盒 (美国 Promega 公司, 货号: LS1040); 表皮生长因子受体 (EGFR) 抗体、磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶 1 (p-ERK1) 抗体、 β 肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号分别为: bs-0165R、bs-3292R、bs-0061R); 原癌基因 (c-myc) 抗体 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: PB9092); 山羊抗兔的二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: ZB2301); NC 膜 (Pall Corporation 公司, 批号: T22740); RIPA 裂解液 (碧云天生物技术有限公司, 批号: P0013E); 发光试剂盒 (美国 Millipore 公司, 批号: WBKLS0500); 水杨酸钠 (批号: 20210302, 天津市百世化工有限公司); N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍 (MNNG, 批号: M105583, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 3% 醋酸铀 (批号: 1005, 德国默克公司)。

SHA-B 型恒温振荡器 [国华 (常州) 仪器制造有限公司]; 1-15K 型高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); MDF-382E 型超低温保存箱 (日本三洋公司); DYY 型电泳槽及电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); BX53 型显微镜 (上海第三分析仪器厂); H-7650 型透射电镜 (日本日立公司); Quantity one 分析软件 (Bio-Rad Technical Service Department 公司)。

2 方法

2.1 生物信息学方法

2.1.1 筛选 CAG 与胃癌的差异表达基因 采用 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), 以“chronic atrophic gastritis”“Homo sapiens”为关键词进行检索, 筛选样本来源为人胃黏膜组织, 筛选与 CAG 相关基因表达谱数据集。纳入标准如下: 1) 人胃黏膜组织样本; 2) 包括慢性萎缩性胃炎、低级别上皮内瘤变、高级别上皮内瘤变、胃早期癌等微阵列数据集。使用 GEO2R 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) 进行差异基因的分析筛选, 调整 $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| \geq 1$ 为筛选差异基因的标准, 获得 CAG 与胃癌的差异表达基因。

2.1.2 获取 CAG 增殖相关差异基因 使用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>), 分别以“chronic atrophic gastritis”“proliferation”为关键词进行检索, 取两个相关基因的交集, 即为

CAG 的增殖相关基因。将 GEO2R 工具分析所得的 CAG 差异基因与 GeneCards 数据库筛选所得的 CAG 增殖相关基因取交集, 获得 CAG 增殖相关差异基因。

2.1.3 CAG 增殖相关差异基因的生物信息学分析 采用 Metascape 平台 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 对 CAG 增殖相关差异基因进行 GO 和 KEGG 分析, 筛选出有效组分相关性排名前 20 的分子功能及 KEGG 通路, 寻找与 CAG 相关的生物过程及重要信号通路。

2.2 实验验证

2.2.1 动物造模、分组及给药 70 只健康雄性 Wistar 大鼠, 采用随机数字表法抽取 14 只作为正常组, 进行常规饲养, 其余 56 只作为造模组用于制备 CAG 模型。造模参考相关文献^[8]应用复合造模法, 180 $\mu\text{g/ml}$ MNNG 溶液自由饮用, 每天更换。结合饥饱失常法: 2 天足食, 1 天禁食, 用 2% 水杨酸钠 1 ml/100 g 于大鼠饥饿时灌胃。造模至第 20 周, 采用随机数字表法抽取正常组和造模组大鼠各 2 只, 后续每 4 周每组随机抽取 2 只大鼠处死, 苏木素-伊红 (HE) 对胃黏膜染色处理, 观察胃黏膜组织病理情况, 造模成功标志为大鼠胃黏膜腺体萎缩、减少, 腺体上皮细胞排列紊乱, 胃黏膜层变薄, 可见炎性细胞浸润^[8-9], 为造模成功。于 24 周造模成功, 造模过程中模型组大鼠死亡 2 只, 解剖后发现大鼠胃肠胀气明显。最后成功复制 CAG 大鼠模型 50 只, 按照随机数字表法分为模型组、摩罗丹组以及香连化浊方低、中、高剂量组, 每组 10 只。

根据人与大鼠的体表面积折算等效剂量^[10], 摩罗丹组给予摩罗丹溶液 1.4 g/(kg·d) 灌胃, 香连化浊方高、中、低剂量组给予香连化浊方溶液 36、18、9 g/(kg·d) 灌胃, 中剂量为临床等效剂量, 正常组和模型组给予生理盐水 0.01 ml/g 灌胃, 各组均每日 1 次, 连续 60 天。

2.2.2 取材方法 大鼠末次给药后禁食不禁水 24 h, 3% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 腹腔注射麻醉处理大鼠后腹主动脉取血, 室温、2000 r/min、离心 10 min (离心半径 10 cm), 分离血清备用。分离大鼠胃组织, 垫置冰袋, 切取小于 1 mm³ 的新鲜胃窦组织块, 迅速放于电镜固定液中。切取病变最明显的组织, 一部分置于 4% 多聚甲醛溶液, 室温固定; 另一部分置于冻存管中, 先放于液氮罐, 随后转入 -80 °C 冰箱保存。

2.2.3 胃黏膜组织病理变化 胃组织进行固定、石蜡包埋、切片, HE 染色, 中性树胶封固, 光学

显微镜下观察大鼠胃黏膜组织病理结构变化。

2.2.4 胃黏膜细胞超微结构 将胃黏膜组织以 1% 锇酸固定, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 3 次, 丙酮逐步脱水; 纯丙酮+环氧树脂渗透包埋聚合; 超薄切片 (50~60 nm), 用 3% 醋酸铀和柠檬酸铅双染色, 透射电镜下观察拍照。

2.2.5 Western Blot 法检测胃组织 EGFR、p-ERK1、c-myc 蛋白表达 随机数字表法每组选取 3 只大鼠, 取大鼠胃黏膜组织, 液氮快速研磨, 放入离心管中, 加入 RIPA 裂解液, 4 °C 匀浆过夜裂解, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min (离心半径 7 cm), 取上清备用, 测定蛋白浓度。蛋白样本经 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转 NC 膜固定, 室温、摇床上封闭 2 h, 用封闭液稀释一抗 EGFR (1:700)、p-ERK1 (1:700)、c-myc (1:800)、内参 β -actin (1:5000), 4 °C 孵育过夜。洗膜后滴加稀释好的二抗 (1:5000), 室温孵育 90 min, 洗膜后显色, 实验均重复 3 次。灰度值分析使用 Quantity one 4.6.2 软件进行。以 β -actin 为内参, 目标蛋白/ β -actin 的灰度值比值为检测指标的半定量分析结果。

2.2.6 RT-qPCR 法检测胃组织 EGFR、细胞外信号调节激酶 1 (ERK1)、c-myc mRNA 表达 每组选取 8 只大鼠, 取 2~5 mg 大鼠胃黏膜组织, 加裂解液研磨, 匀浆裂解, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min (离心半径 7 cm), 提取总 RNA, 取少量溶解的 RNA, 稀释后用紫外分光光度计读取 OD 值。取总 RNA 2 μg , 加入反转录混合液。应用两步法反应程序, 预变性 95 °C 10 min, 进行 44 个循环反应, 即 95 °C 15 s、60 °C 60 s。扩增完毕后, 得到各样本目的基因及内参基因 (β -actin) 的 Cq 值, ΔCq =目的基因 Cq 值-内参基因 β -actin 的 Cq 值, 按照公式 $Q=2^{-\Delta\text{Cq}}$, 得到每个目的基因的 Q 值及 Q 均值, 再以每个目的基因的 Q 值/Q 均值, 即各目的基因表达的相对定量值 (RQ 值), 将 RQ 值用于统计分析。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列: EGFR 上游 ACCAGAAGGGCCAAAGATCC, 下游 TGTACGTTTTCGGACAAGCTG, 扩增片段长度 124 bp; ERK1 上游 CCAAACAAGCGCATCACAGT, 下游 CCACTGGTTCATCTGTCCGA, 扩增片段长度 82 bp; c-myc 上游 GGAAGGACTATCCAGCTGCC, 下游 TGGAGCATTTGCGGTTGTTG, 扩增片段长度 84 bp; β -actin 上游 GCAGGAGTACGATGAGTCCG, 下游 ACGCAGCTCAGTAACAGTCC, 扩增片段长度 74 bp。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)描述, 方差齐者多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 检验, 两两比较采用 Dunnett's t 检验。所有假设检验均采用双侧检验, 检验水准 α 为 0.05。

3 结果

3.1 生物信息学结果

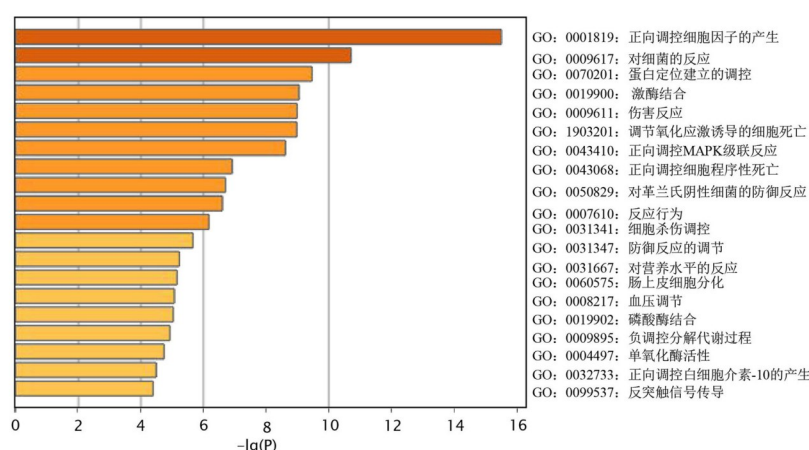
3.1.1 CAG 增殖相关差异基因 筛选出基因芯片数据集 GSE55696。通过 GEO2R 工具对 GSE55696 芯片数据集进行分析, 取得差异基因后再以标准“ $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ ”筛选, 最终共获得 CAG 与胃癌的差异基因 1260 个。使用 GeneCards 数据库获取 CAG 基因 733 个, 增殖相关基因 18163 个, 应

用 Venny 2.1.0 软件作图, 二者交集为 CAG 增殖基因 726 个。将芯片数据库差异基因与 CAG 增殖相关基因取交集, 最终得到 45 个 CAG 增殖相关差异基因。

3.1.2 CAG 增殖相关差异基因 GO 和 KEGG 分析结果 图 1 示, GO 富集功能分析主要涉及正向调控细胞因子的产生、对细菌的反应、蛋白定位建立的调控、激酶结合、伤害反应等。图 2 示, KEGG 通路富集分析主要涉及癌症信号通路、美洲锥虫病、Th17 细胞分化、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒感染等。

3.2 实验验证结果

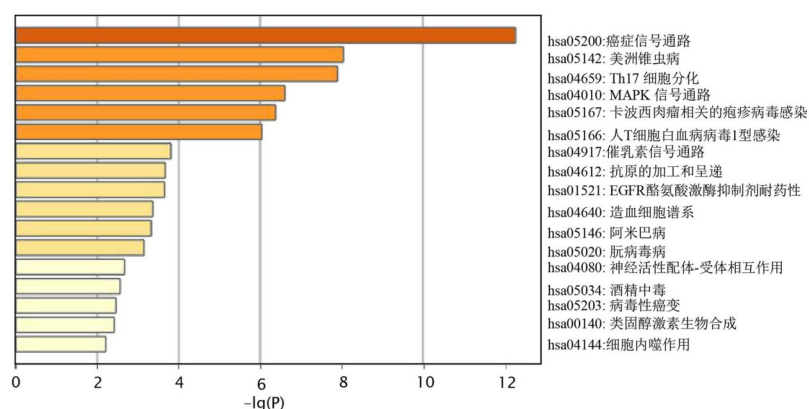
3.2.1 各组大鼠胃黏膜组织病理结果 图 3 示, 正常组大鼠胃组织层次清晰, 黏膜结构正常, 腺体排列整齐, 固有层腺体大小形态规则, 未见腺体减少, 无充血、水肿及炎性细胞浸润。模型组大鼠胃黏膜变薄, 腺体萎缩, 数量减少, 固有层腺体排列



注: MAPK, 丝裂原活化蛋白激酶; $-\lg(P)$, 表示排序相关性, 颜色越深代表相关性越强, 排名越靠前。

图1 慢性萎缩性胃炎增殖相关差异基因的GO功能富集分析结果

Figure 1 GO functional enrichment analysis of differential genes related to proliferation of chronic atrophic gastritis



注: Th17, 辅助性T细胞17; MAPK, 丝裂原活化蛋白激酶; $-\lg(P)$, 表示排序相关性, 颜色越深代表相关性越强, 排名越靠前。

图2 慢性萎缩性胃炎增殖相关差异基因的KEGG富集分析结果

Figure 2 KEGG enrichment analysis of differential genes related to proliferation of chronic atrophic gastritis

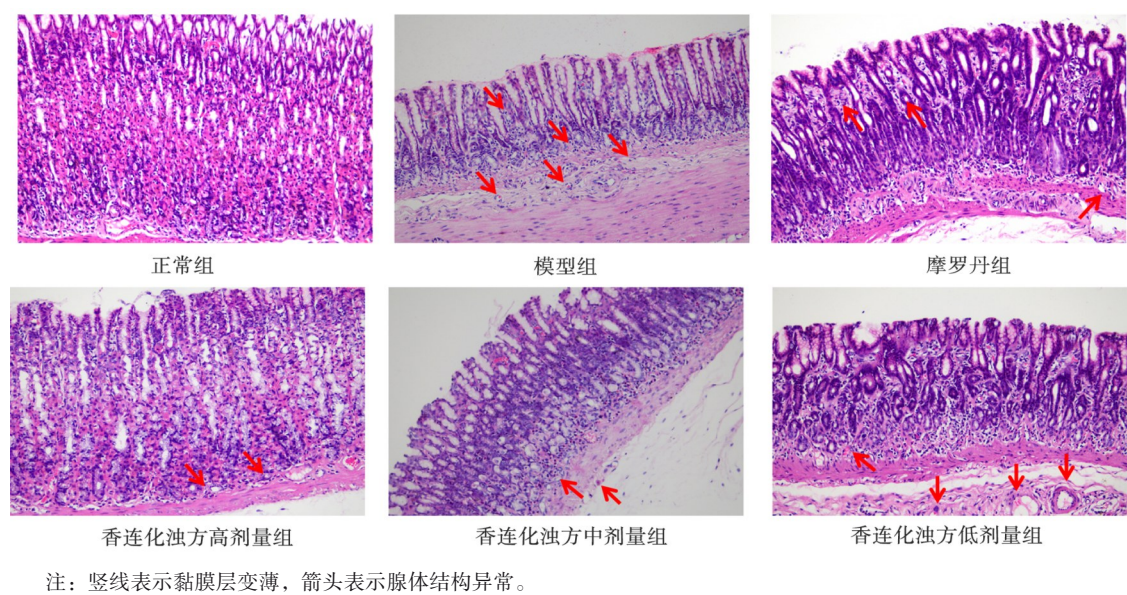


图3 各组大鼠胃黏膜病理学形态 (HE 染色, ×200)

Figure 3 Pathological morphology of gastric mucosa of rats in each group

疏松紊乱，可见炎性细胞浸润，黏膜基层增厚。与模型组比较，摩罗丹组及香连化浊方各剂量组大鼠胃组织腺体萎缩情况均有改善，其中以香连化浊方高、中剂量组效果最佳，表现在胃黏膜腺体排列紊乱轻微，数量较前明显增多，炎性细胞浸润数量减少。

3.2.2 各组大鼠胃黏膜细胞超微结构 图4示，正常组大鼠细胞核形态正常，呈卵圆形，胞质内可见大量线粒体，多数结构正常，形态规则，排列整齐，

嵴密，粗面内质网无肿胀。模型组大鼠细胞核固缩，胞质内线粒体数量减少，结构异常，嵴稀疏、断裂。摩罗丹组大鼠细胞核呈卵圆形或椭圆形，与模型组比较线粒体数量稍多，部分线粒体出现嵴断裂，多数结构正常。香连化浊方各剂量组大鼠细胞核呈椭圆形，与摩罗丹组比较，线粒体数量较多，大部分线粒体结构正常，排列整齐，粗面内质网基本整齐，以香连化浊方高、中剂量组效果较为显著。

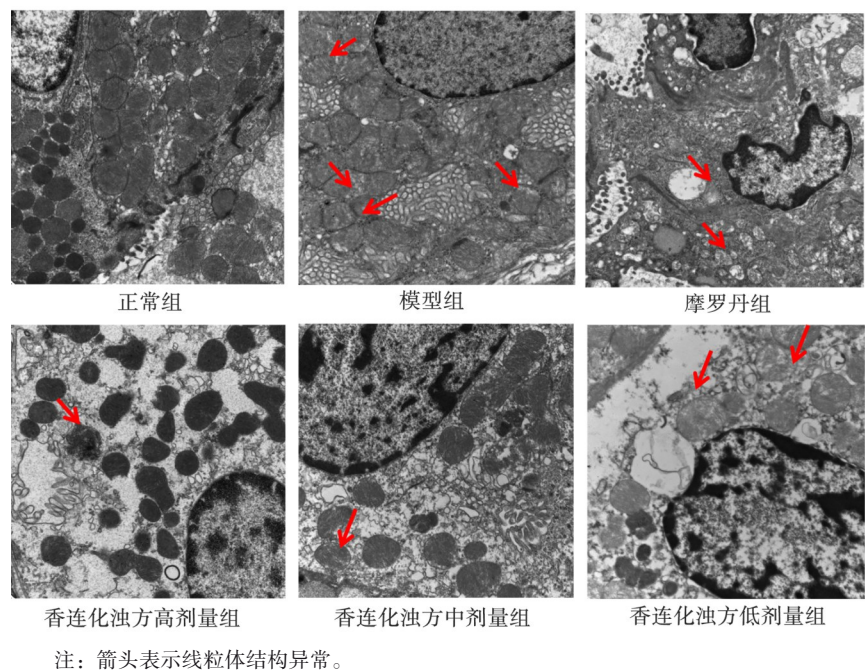


图4 各组大鼠胃黏膜细胞超微结构 (×20 000)

Figure 4 Ultrastructure of gastric mucosal cells in rats in each group

3.2.3 各组大鼠胃黏膜组织 EGFR、p-ERK1、c-myc 蛋白表达比较 表 1 示,与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜 EGFR、p-ERK1、c-myc 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,香连化浊方高剂量组胃黏膜 EGFR 及 c-myc、摩罗丹组 c-myc、各给药组 p-ERK1 蛋白表达均明显降低 ($P<0.05$);与摩罗丹组比较,香连化浊方低剂量组 c-myc 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)。

表 1 各组大鼠胃黏膜组织 EGFR、p-ERK1、c-myc 蛋白表达比较

Table 1 Comparison of EGFR, p-ERK1, c-myc protein expression in gastric mucosal tissue of rats in each group ($/\beta$ -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	EGFR	p-ERK1	c-myc
正常组	3	0.40±0.07	0.34±0.04	0.25±0.05
模型组	3	0.79±0.15 ^{a)}	0.74±0.06 ^{a)}	0.62±0.07 ^{a)}
摩罗丹组	3	0.64±0.12	0.52±0.10 ^{b)}	0.38±0.06 ^{b)}
香连化浊方高剂量组	3	0.51±0.20 ^{b)}	0.51±0.10 ^{b)}	0.32±0.04 ^{b)}
香连化浊方中剂量组	3	0.62±0.12	0.61±0.05 ^{b)}	0.49±0.12
香连化浊方低剂量组	3	0.71±0.07	0.60±0.04 ^{b)}	0.53±0.08 ^{c)}

注:EGFR,表皮生长因子受体;p-ERK1,磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶1;c-myc,原癌基因。

a)与正常组比较, $P<0.05$;b)与模型组比较, $P<0.05$;c)与摩罗丹组比较, $P<0.05$ 。

3.2.4 各组大鼠胃黏膜组织 ERGR、ERK1、c-myc mRNA 表达比较 表 2 示,与正常组比较,模型组 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 表达明显升高 ($P<0.05$);与模型组比较,摩罗丹组及香连化浊方各剂量组 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 表达均明显降低 ($P<0.05$);与摩罗丹组比较,香连化浊方高、

表 2 各组大鼠胃黏膜组织 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 表达比较

Table 2 Comparison of EGFR, ERK1, c-myc mRNA expressions in gastric mucosal tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	EGFR	ERK1	c-myc
正常组	8	0.72±0.07	0.79±0.11	0.65±0.08
模型组	8	2.25±0.18 ^{a)}	2.22±0.15 ^{a)}	2.38±0.16 ^{a)}
摩罗丹组	8	1.52±0.11 ^{b)}	1.50±0.11 ^{b)}	1.73±0.07 ^{b)}
香连化浊方高剂量组	8	1.08±0.09 ^{b)c)}	1.08±0.08 ^{b)c)}	1.03±0.16 ^{b)c)}
香连化浊方中剂量组	8	1.25±0.15 ^{b)c)}	1.40±0.11 ^{b)}	1.37±0.13 ^{b)c)}
香连化浊方低剂量组	8	1.59±0.10 ^{b)}	1.71±0.14 ^{b)c)}	1.67±0.10 ^{b)}

注:EGFR,表皮生长因子受体;ERK1,细胞外信号调节蛋白激酶1;c-myc,原癌基因。

a)与正常组比较, $P<0.05$;b)与模型组比较, $P<0.05$;c)与摩罗丹组比较, $P<0.05$ 。

中剂量组 EGFR、c-myc mRNA 表达降低,香连化浊方高、低剂量组 ERK1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)。

4 讨论

根据 CAG 临床症状,可将其归为中医学“胃痞”“胃脘痛”的范畴。国医大师李佃贵首创“浊毒理论”,认为嗜食肥甘厚味,饮食内伤、肝胃不和,酿湿生浊,湿浊中阻,郁而不解进而蕴积成热,热壅血瘀而成毒,胃络失于濡润滋养,致黏膜变薄,腺体萎缩,导致 CAG 发生^[11]。因此,CAG 属本虚标实,津液阴血耗伤为本,浊毒内壅、气滞络阻、胃失和降为标,浊毒之邪壅滞中焦脾胃是病机关键。李佃贵教授提出化浊解毒是治疗 CAG 的主要大法,并创立治疗 CAG 的经验方香连化浊方。方中藿香芳香化浊,和胃降逆;黄连清热解毒,善泄肠胃浊毒,共为君药。白术健脾益气,豆蔻健脾化浊和胃,半枝莲、白花蛇舌草清热解毒,共为臣药。川芎、白芍、当归、三七疏肝行气,活血止痛;香附、木香、枳实、砂仁行气和胃,消胀除痞;百合养阴安神,茯苓利水渗湿、健脾宁心;全蝎解毒散结,延胡索活血行气止痛,以上十二味俱为佐使药。本方将健脾运胃、燮理气机、通络化瘀等有机结合,使浊去毒化,清阳自升,浊阴自降,中州脾胃和顺,气行滞消,经络气血畅通,CAG 疾病乃愈。

依据目前生信分析与动物实验验证相结合的普遍思路,本研究依据生物信息学数据库筛选人胃黏膜 CAG 和胃癌差异基因,为实验提供靶点和研究方向。动物实验中复制 CAG 大鼠模型,对通路上关键靶点蛋白进行验证。本研究通过对 GSE55696 芯片数据集进行分析,辅助一系列相关生物信息学工具,筛选获得 45 个 CAG 增殖相关差异基因,通过 GO 富集分析和 KEGG 富集分析发现,CAG 增殖相关差异基因涉及调控多条途径及信号通路,如正向调控细胞因子的产生、蛋白定位建立的调控、激酶结合、正向调控 MAPK 级联反应、癌症信号通路、MAPK 信号通路等,其中 MAPK 通路是 CAG 潜在治疗通路,与 CAG 疾病发展转变有密切关系。有研究^[12-13]表明,EGFR/MAPK/ERK 信号转导通路的过度激活与调控细胞分化、增殖关系密切。EGFR 可以有效调节胃肠黏膜细胞的生长、分化和增殖。EGFR 的高表达往往存在于机体发生肿瘤时,且能促进肿瘤细胞的增殖,血管生成、黏附、侵袭和转移^[14]。EGFR 位于信号路上游,当

EGFR 过度表达或基因扩增时, EGFR/MAPK/ERK 信号通路异常激活并向下游因子转导。ERK1 是其 MAPK 亚型之一, 经激活后活化为 p-ERK1, 使得处于上游的 EGFR 因子通过 EGFR/MAPK/ERK 信号通路转导进入细胞核, 继而通过下游效应分子调控细胞的增殖和分化, 因此 ERK1 是将信号从细胞表面受体传导至细胞核的关键。另有研究^[15]表明, 磷酸化后的 ERK1 及其异常表达能够促进胃癌细胞生长, 促进恶性肿瘤的增殖、侵袭和扩散。胃癌的发生与多种抑癌基因的失活及原癌基因异常激活密切相关, c-myc 基因是一种原癌基因, 参与调控细胞增殖-凋亡平衡。有研究^[16]发现, CAG 阶段即可出现 c-myc 高表达状态, 且随着“炎-癌转化”进程的演变发展, c-myc 表达不断升高, 提示 c-myc 蛋白的高表达与胃癌的发展有关。

对生物信息学分析结果采用复合造模法建立 CAG 大鼠模型进行验证, 通过 HE 染色观察大鼠胃黏膜组织病理结构变化, 结果发现模型组大鼠胃黏膜变薄, 腺体萎缩、数量减少, 固有层腺体排列疏松紊乱, 可见炎性细胞浸润, 黏膜基层增厚。药物干预后, 香连化浊方各剂量组大鼠胃黏膜萎缩情况均有改善, 其中以香连化浊方高、中剂量组效果最佳, 表明香连化浊方可有效缓解 CAG 大鼠胃黏膜萎缩状态。采用透射电镜观察大鼠胃黏膜细胞超微结构变化, 经香连化浊方干预后大鼠线粒体结构恢复, 内质网肿胀减轻, 以香连化浊方高、中剂量组效果较为显著, 表明香连化浊方可明显改善 CAG 大鼠胃黏膜细胞的超微结构。筛选 EGFR/MAPK/ERK 信号通路上的核心靶点, 采用 RT-qPCR 法检测各组大鼠胃黏膜组织 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 表达, Western Blot 法检测 EGFR、p-ERK1、c-myc 蛋白表达。结果显示, CAG 大鼠胃黏膜 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 及蛋白水平较正常组升高, 表明 EGFR/MAPK/ERK 信号通路处于激活状态, 提示 CAG 大鼠胃黏膜出现细胞异常活化及增殖。药物干预后, 香连化浊方可下调大鼠 EGFR、ERK1、c-myc mRNA 及蛋白表达, 以高剂量效果最为显著, 提示其作用机制可能是通过调控 EGFR/MAPK/ERK 信号通路, 抑制 EGFR、ERK1、c-myc 的高表达, 从而抑制细胞异常分化、增殖, 减轻 CAG 胃黏膜组织损伤, 部分逆转 CAG 胃黏膜萎缩, 促进胃黏膜损伤的修复, 最终发挥对胃黏膜的保护作用。除此之外, 本研究发现香连化浊方高剂量组在抑制 EGFR、ERK1、c-myc 异常表达方面效果优于摩罗丹组, 可初步推断香连化浊方在治疗 CAG 过程中

抑制细胞异常分化、增殖的作用优于摩罗丹。

综上, 本研究运用生物信息学方法, 发现 EGFR/MAPK/ERK 为 CAG 潜在治疗通路, 并结合实验验证发现香连化浊方对 CAG 有治疗作用, 能够明显改善 CAG 大鼠胃组织的病理变化, 其机制可能是通过调控 EGFR/MAPK/ERK 信号通路, 从而阻断细胞异常分化、增殖, 减轻 CAG 胃黏膜组织损伤, 从而发挥对胃黏膜的保护作用。本研究验证了炎症转化增殖调控通路, 但未探索 CAG 细胞增殖的周期变化特征及干预增殖周期的具体环节。今后将继续开展动物及细胞实验, 深入开展机制研究, 以更全面阐述香连化浊方治疗 CAG 的作用机制。

参考文献

- [1] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(2): 121-131.
- [2] CORREA P, PIAZUELO MB. The gastric precancerous cascade[J]. J Dig Dis, 2012, 13(1): 2-9.
- [3] 李奕, 刘福栋, 庞博, 等. 基于肿瘤能量代谢失衡探讨扶正解毒法在慢性结肠炎“炎癌转化”分期干预中的应用[J]. 中医杂志, 2022, 63(3): 234-239.
- [4] 吴中立, 姚辉华. 肿瘤相关炎症反应对胃癌影响的研究现状与进展[J]. 医学理论与实践, 2016, 29(6): 727-729.
- [5] 王思月, 李燕, 刘小发, 等. 基于浊毒理论对慢性萎缩性胃炎“炎-癌转化”的认识[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2023, 31(3): 233-236.
- [6] 杜艳茹, 李佃贵, 王春浩, 等. 化浊解毒方治疗慢性萎缩性胃炎胃癌前病变浊毒内蕴证患者 119 例临床观察[J]. 中医杂志, 2012, 53(1): 31-33, 37.
- [7] 白海燕, 郝旭蕊, 李娜, 等. 化浊解毒方治疗慢性萎缩性胃炎伴幽门螺杆菌感染患者的临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(3): 326-330.
- [8] 于春月, 刘婷, 刘凯歌, 等. 慢性萎缩性胃炎病证结合动物模型的建立与评价[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 2140-2144.
- [9] 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.
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1103.
- [11] 杨倩, 才艳茹, 刘建平, 等. 李佃贵教授从浊毒论治慢性萎缩性胃炎用药规律分析[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(9): 2270-2271.
- [12] ZHANG H, DENG T, GE S, et al. Exosome circRNA secreted from adipocytes promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting deubiquitination-related USP7[J]. Oncogene, 2019, 38(15): 2844-2859.
- [13] ZHANG X, WANG S, WANG H, et al. Circular RNA

circNRIPI acts as a mi-croRNA-149-5p sponge to promote gastric cancer progression via the AKT1/mT-OR pathway[J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 20.

[14]韩雪,戴广海. 胃癌中 EGFR 相关研究及意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(2): 173-176.

[15]NAKATA W, HAYAKAWA Y, NAKAGAWA H, et al.

Anti-tumor activity of the proteasome inhibitor bortezomib in gastric cancer [J]. Int J Oncol, 2011, 39 (6) : 1529-1536.

[16]张英,方向明,何小谷,等. eIF4E、C-myc 及 CDK4 在胃癌及胃癌前情况中的表达及意义[J]. 临床消化病杂志, 2020, 32(2): 102-107.

Effect of *Xianglian Huazhuo Formula* (香连化浊方) on EGFR/MAPK/ERK Signaling Pathway in Gastric Mucosa in Chronic Atrophic Gastritis Model Rats

YANG Yuewei¹, CHENG Nan¹, LIU Liran¹, DONG Jiaqi¹, LIU Yajie¹, JIANG Jianming², YANG Qian³, LI Bolin³

1. Graduate School, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang, 050091; 2. Hebei University of Chinese Medicine;

3. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the potential mechanism of *Xianglian Huazhuo Formula* (香连化浊方, XHF) in the treatment of chronic atrophic gastritis (CAG). **Methods** The gene chip dataset was screened out by using the GEO database, and the CAG proliferation-related differential genes were obtained based on the GEO2R tool and GeneCards database. The Metascape platform was used to perform GO and KEGG enrichment of CAG proliferation-related differential genes so as to find biological processes and important signaling pathways related to CAG, and conduct animal experiments to verify. From 70 Wistar rats, 14 rats were randomly selected as the normal group for routine feeding, and the remaining 56 rats were given "N-methyl-N'-nitro-nitrosoguanidine plus disordered feeding plus sodium salicylate" to prepare the CAG model. The 50 successfully modeled rats were randomly divided into model group, morodan group, and XHF high-, medium- and low-dose groups, with 10 rats in each group. The rats in the morodan group were given 1.4 g/(kg·d) of morodan solution by gavage, while those in the high-, medium- and low-dose XHF groups were given 36, 18 and 9 g/(kg·d) of XHF solution by gavage, respectively, and the rats in the normal group and the model group were given 0.01 ml/g of normal saline by gavage, once a day, for 60 consecutive days. HE was used to observe the histopathological changes of the gastric mucosa of rats, and transmitted electron microscopy was taken to observe the ultrastructure of gastric mucosal cells. The protein expression levels of epidermal growth factor receptor (EGFR), phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinase 1 (p-ERK1) and proto-oncogene (c-myc) were detected by Western-blot, and the mRNA expression levels of EGFR, extracellular signal-regulated protein kinase 1 (EPK1) and c-myc were detected by RT-PCR method. **Results** Finally, 45 CAG proliferation-related differential genes were obtained. GO and KEGG enrichment analysis showed that it could affect the positive regulation of cytokine production, positive regulation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade, the regulation of establishment of protein localization, involving multiple signaling pathways such as cancer pathway, MAPK signaling pathway, and helper T cell 17 (Th17) cell differentiation. HE staining showed that the thickness of gastric mucosa, the arrangement of lamina propria, and the infiltration of inflammatory cells in each medication group were improved compared to the model group, especially the high- and medium-dose XHF groups. The transmission electron microscopy showed that compared to those in the model group, the mitochondrial structure was restored, and the swelling of the endoplasmic reticulum was reduced in the medication groups, and more improvements were seen in the high- and medium-dose XHF groups. Compared to the normal group, the model group had increased protein and mRNA expression levels of EGFR, p-ERK1 and c-myc in the gastric mucosa ($P < 0.05$). Compared to those in the model group, the protein expression levels of EGFR and c-myc in the high-dose XHF group, c-myc in the morodan group, p-ERK1 in all medication groups, as well as mRNA expression levels of EGFR, ERK1 and c-myc in all medication groups significantly decreased ($P < 0.05$). Compared to those in the morodan group, c-myc protein expression in the XHF low-dose group significantly increased, while the EGFR and c-myc mRNA expression levels in the XHF high- and medium-dose groups decreased, also the ERK1 mRNA expression level in the high- and low-dose XHF groups decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** XHF in the treatment of CAG may be related to the regulation of EGFR/MAPK/ERK signaling pathway, the blocking of abnormal differentiation and proliferation of gastric mucosal cells, and the reduction of gastric mucosal tissue damage in CAG.

Keywords chronic atrophic gastritis; *Xianglian Huazhuo Formula* (香连化浊方); epidermal growth factor receptor; mitogen-activated protein kinase; extracellular signal regulated protein kinase

(收稿日期: 2022-11-14; 修回日期: 2023-05-19)

[编辑: 王利芬]