

· 经典名方 ·

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

纪万里^{1,2}, 王婷婷¹, 安睿¹, 梁琨^{1*}, 王新宏^{1*}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海健康医学院, 上海 201318)

[摘要] 目的:应用定量蛋白质组学探究半夏泻心汤抗慢性胃炎的生物学基础。方法:实验大鼠分为正常组、慢性胃炎模型组、半夏泻心汤组,采用56%乙醇灌胃法,4周建立慢性胃炎模型,给药治疗后,取胃组织进行苏木素-伊红(HE)染色,观察各组大鼠胃组织病理损伤及改善情况,提取胃组织蛋白质,运用串联质谱标签(TMT)定量蛋白质组学研究各组之间的差异蛋白情况,采用蛋白免疫印迹法(Western blot)验证关键的差异表达蛋白。结果:从大鼠胃组织中鉴定出4 452个蛋白,其中模型组与正常组差异蛋白为318个。经半夏泻心汤干预后,与模型组相比,共有258个差异蛋白,这些差异蛋白主要富集于 cell killing, nucleoid 及 hijacked molecular function 等。京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集发现,作用涉及到三羧酸循环, steroid hormone biosynthesis, retrograde endocannabinoid 等信号通路,同时还涉及磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)和核转录因子(NF)- κ B 信号通路。Western blot 验证发现 14-3-3 theta, 干细胞因子(SCF), 肌腱蛋白C(TN-C), 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 细胞间黏附分子-1(ICAM-1), 线粒体丙酮酸载体(Mpc1)和免疫相关蛋白GTP酶4(GIMAP4)可能是该方治疗慢性胃炎的关键蛋白。结论:半夏泻心汤治疗慢性胃炎的作用机制涉及到能量代谢、激素调节、炎症反应及免疫过程,利用差异蛋白质组学寻找的靶点蛋白及其涉及的信号通路可能是半夏泻心汤治疗慢性胃炎的生物学基础。

[关键词] 半夏泻心汤; 慢性胃炎; 蛋白质组学; 作用机制

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)09-0001-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210518

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210302.1007.001.html>

[网络出版日期] 2021-3-2 12:50

Mechanism of Banxia Xiexintang on Rats with Chronic Gastritis Based on Quantitative Proteomics

Ji Wan-li^{1,2}, Wang Ting-ting¹, An Rui¹, Liang Kun^{1*}, Wang Xin-hong^{1*}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai University of Medicine and Health Sciences, Shanghai 201318, China)

[Abstract] **Objective:** To study the biological basis of Banxia Xiexintang against chronic gastritis by using quantitative proteomics. **Method:** The experimental rats were divided into normal group, chronic gastritis model group, and Banxia Xiexintang group. The chronic gastritis model was established four weeks later by gavage with 56% ethanol. After treatment, the stomach tissues were stained with hematoxylin and eosin (HE) to observe the histopathological damage and improvement of gastric tissue in each group. The protein in gastric tissue was extracted. The differential proteins among different groups were studied by quantitative proteomics using tandem mass spectrometry tag(TMT), and the key differentially expressed proteins(DEPs) were verified

[收稿日期] 20201203(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774183);上海中医药大学研究生创新培养专项科研项目(Y2019087)

[第一作者] 纪万里,博士,讲师,从事中药药物分析研究,E-mail:snjiwanli@shutcm.edu.cn

[通信作者] *梁琨,博士,讲师,从事中药质量控制研究,Tel:021-51322184,E-mail:dolphin000000@163.com;

*王新宏,博士,教授,博士生导师,从事药物分析与体内过程研究,Tel:021-51322183,E-mail:wangxinh6020@126.com

by Western blot. **Result:** A total of 4 452 proteins were identified from rat stomach tissues, of which 318 proteins were different between the model and the normal group. After the intervention of Banxia Xiexintang, compared with the model group, there were a total of 258 differential proteins, which were mainly enriched in cell killing, nucleoid and hijacked molecular function. Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment included tricarboxylic acid (TCA) cycle, steroid hormone biosynthesis, and Retrograde endocannabinoid signaling, as well as phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt), nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B) signal pathways. Western blot verification found that 14-3-3 theta, Tenascin-C, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), stem cell factor (SCF), Caspase-3, GTPase of the Immunity-associated protein 4 (GIMAP4) and mitochondrial pyruvate carrier 1 (Mpc1) might be the crucial proteins for the treatment of chronic gastritis. **Conclusion:** The mechanism of Banxia Xiexintang in the treatment of chronic gastritis involves energy metabolism, hormone regulation, inflammation and immune processes. The target proteins found by differential proteomics and the signaling pathways may be the biological basis of Banxia Xiexintang in the treatment of chronic gastritis.

[Key words] Banxia Xiexintang; chronic gastritis; proteomic; mechanism

慢性胃炎(CG)是以胃组织炎症细胞浸润为主要病理特征的胃肠道类疾病,常反复发作,以腹痛、乏力、胃痛、饱胀及泛酸等为主要临床症状^[1]。研究发现相关致病因素如服用非甾体抗炎药、饮酒、吸烟等^[2]。浅表性胃炎若不及时治疗,将恶化为萎缩性胃炎、肠化生、非典型增生病变、胃癌,其中胃癌的发病率约为5%^[3]。目前关于慢性胃炎的治疗手段较多,但大多采用胃酸抑制剂和胃黏膜保护药物改善其症状,治疗效果不显著,且复发率较高。因此,寻求有效的CG治疗靶点、药物具有现实意义。中药显示多途径、多靶点发挥作用的特点,具有良好的临床应用前景。

中医认为慢性胃炎属于“痞满”“胃脘痛”的范畴,脾胃素虚、气阴不足是慢性胃炎的主要病因,病机多为寒热、气血之间的相互转化不调,妨碍脾胃气机之升降。半夏泻心汤源于汉代张仲景《伤寒杂病论》,是治疗寒热错杂痞证的经典名方,全方由半夏、干姜、人参、黄连、甘草、黄芩和大枣共7味药组成,具有辛开苦降、寒热并用及补泻兼施的特点,广泛应用于各种因素所导致的寒热错杂、脾胃升降失调之脘腹痞满,在治疗急慢性胃肠炎、消化性溃疡及功能性消化不良方面具有良好的疗效。文献报道半夏泻心汤可抑制炎症细胞白细胞介素(IL)-1 β , 肿瘤坏死因子(TNF)- α 的转录与释放而发挥抗慢性胃炎的作用^[4]。此外,半夏泻心汤也可通过提高保护因子一氧化氮(NO)和血管内皮细胞生长因子(VEGF)表达水平而保护胃黏膜,NO及其合酶可能是半夏泻心汤发挥作用的靶点^[5]。课题组前期系统采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱

(UPLC-LTQ-Orbitrap-MS)技术分析了半夏泻心汤主要化学成分,研究了复方及不同配伍中有效成分在体内的吸收、分布及代谢排泄情况^[6-7],对半夏泻心汤化学成分的药代动力学性质进行了快速的评估。课题组前期研究还发现半夏泻心汤对于慢性胃炎大鼠具有良好的干预作用,这与文献报道半夏泻心汤在治疗CG方面显示良好的临床疗效^[8-9]一致。然而半夏泻心汤体内作用的靶点仍不清楚,其治疗慢性胃炎的作用机制尚不明确。

定量蛋白质组学技术是蛋白组学一个分支学科,可用于研究疾病发生、发展及治疗寻找新的作用靶标,明确疾病病理发展过程或药物干预的靶点蛋白变化^[10],能够全面、系统地研究生物体内或组织内所有蛋白质的表达情况,与中医辨证论治、中药方剂多靶点调节的方式相吻合,已应用于传统经典方及临床经验方的机制研究,为中医药复杂体系的研究带来新的思路与方法^[11-12]。本文采用串联质谱标签(TMT)定量蛋白质组学技术系统地研究半夏泻心汤治疗慢性胃炎大鼠调节的靶点蛋白,运用生物信息学分析差异蛋白的生物学功能,对差异明显的蛋白质进行蛋白免疫印迹法(Western blot)验证,以有助于比较全面地阐述半夏泻心汤治疗CG的作用机制,为半夏泻心汤的临床应用提供重要的科学依据。

1 材料

1.1 仪器 Neofuge 13R型冷冻离心机(Heal Force); MX-F型涡旋混合器(Service bio); Mini protean 3 cell型电泳仪(美国Bio-Rad); PS-9型电转仪(大连竞迈科技有限公司); JA2003型电子天平

(上海舜宇恒平科学仪器有限公司);ECLIPSE Ni型正置显微镜(NIKON公司);ACQUITY型UPLC(美国Waters);EASY-nLC1200型超高效液相色谱仪(美国Thermo),Q-Exactive型质谱仪(美国Thermo Scientific);数据采集软件Thermo Xcalibur 4.0。

1.2 试药 半夏(批号171128),干姜(批号171219),黄芩(批号170514-1),黄连(批号170429),人参(批号171120),大枣(批号171017),炙甘草(批号170522),以上饮片均购自上海康桥中药饮片有限公司。药材经上海虹桥饮片有限公司陈燕军药师鉴定,均符合2020年版《中华人民共和国药典》规定。石蜡、甲醛(上海国药,货号69018961,10010018);苏木素-伊红(珠海BASO,货号714094,BA4099);碘乙酰胺(美国Sigma,货号Q0048);Bond-Breaker™ TCEP Solution(美国Thermo Scientific,货号T2556);胰蛋白酶(美国PROMEGA,货号V5111);TMT 10PLEX(美国Thermo Fisher,货号90113);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗大鼠免疫球蛋白(Ig)G二抗(武汉Abclonal,货号AS028);电化学发光(ECL)显色液(武汉Servicebio,货号G2014);蛋白定量BCA法试剂盒(武汉Servicebio,货号G2026);十二烷基硫酸钠(SDS),三乙胺-碳酸缓冲液(TEAB)(美国Sigma,货号分别为L3771,T7408);蛋白酶抑制剂(美国Bimaker,货号410069);内参 β -微管蛋白(β -tubulin)抗体(批号s-20694R),14-3-3 theta抗体(批号bsm-52006R),生腱蛋白抗体(TN-c,批号bs-1327R),干细胞因子(SCF)抗体(批号bs-0545R),免疫相关蛋白GTP酶4(GIMAP4)抗体(批号bs-8270R),线粒体丙酮酸载体(Mpc1,批号bs-8428R)抗体,半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(批号bs-0081R)及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)抗体(批号bs-4615R),均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 实验动物 清洁级SD大鼠(160~180 g),购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2016-0006。SPF级环境为温度20~26℃,湿度60%~65%,明暗周期12 h,适应性喂养1周后开始实验。本动物实验方案经上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准(批准号SZY201712009)。

2 方法

2.1 药物溶液的制备 按处方配比取半夏泻心汤各味药(半夏-干姜-黄芩-黄连-人参-炙甘草-大枣为

12:9:9:3:9:9:6),加10倍量水煎煮,煎煮2次,每次45 min,过滤,合并滤液,浓缩至1 g·mL⁻¹。

2.2 动物模型的制备 24只清洁级SD大鼠随机分为3组,正常组、模型组、半夏泻心汤组。均在灌胃前1 h撤去水源。除正常组外,其他各组大鼠灌胃56%乙醇溶液诱导慢性胃炎的发生^[13]。灌胃剂量8 g·kg⁻¹,正常组给予等量生理盐水。每周二、周五灌胃,持续4周。

2.3 给药方案 大鼠造模完成后给药,参考文献剂量^[14],半夏泻心汤组给药剂量为10 g·kg⁻¹;正常组和模型组大鼠每天给予等剂量的生理盐水,共给药7 d。

2.4 标本处理 各组大鼠麻醉处理后,分离全胃,沿胃大弯剪开,用生理盐水将胃内容物冲洗干净,滤纸吸干,一部分置于4%多聚甲醛中固定,固定后石蜡包埋,切片,脱蜡,苏木素-伊红(HE)染色,梯度乙醇脱水和透明,制备中性树胶封片,采用光学显微镜观察各组胃组织病理形态学变化。

2.5 胃组织蛋白质组学研究

2.5.1 组织蛋白提取及含量测定 将切取的胃组织进行液氮研磨成粉末,加入蛋白裂解液(8 mol·L⁻¹尿素,1% SDS,含蛋白酶抑制剂),冰上裂解30 min,期间每隔5 min涡旋混匀30 s,再将其置入冰上超声3 min,最终将样品置于4℃,12 000 r·min⁻¹(离心半径5 cm)离心20 min。采用蛋白定量BCA法试剂盒测定样品总蛋白浓度。

2.5.2 还原烷基化和酶解 取各组蛋白样品100 μ g,用裂解液补充体积到100 μ L;加终浓度10 mmol·L⁻¹三(2-羧乙基)膦(TCEP),37℃反应60 min,加终浓度40 mmol·L⁻¹碘乙酰胺室温下反应40 min;每管各加预冷的丙酮,在-20℃沉淀4 h;1万 r·min⁻¹(离心半径5 cm)离心20 min,取沉淀;用100 mmol·L⁻¹ TEAB 100 μ L充分溶解样品;按照酶-蛋白质量比1:50加入胰蛋白酶在37℃酶解过夜。

2.5.3 TMT试剂标记 分别取各组样品100 μ g,加入一管TMT试剂。不同样品的肽段采用不同标签标记(TMT-126, TMT-127N, TMT-127C, TMT-128N, TMT-128C, TMT-129N, TMT-129C, TMT-130N, TMT-130C, TMT-131),每组样品平行3份,室温孵育、加羟胺、反应,将等量标记产物混合于一管中,抽干,备用。

2.5.4 样品检测 为了保证胃组织蛋白肽段序列鉴定的准确性,首先对肽段进行分级分析,标记好

的多肽样品注入 Waters ACQUITY 超高效液相色谱 (UPLC) 进行分析, ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×150 mm, 1.7 μm), 流动相 A 为 2% 乙腈水 (用氨水调 pH 10), B 为 80% 乙腈水 (用氨水调 pH 10), 梯度洗脱^[15], 检测波长 214 nm, 流速 200 μL·min⁻¹。根据峰型和时间, 以及洗脱液的极性和紫外吸收强度, 收集洗脱液, 用流动相溶解, 备用。

胃组织蛋白肽段序列的鉴定采用 EASY-nLC1200 超高效液相色谱联用 Q-Exactive 质谱 (UPLC-MS/MS) 分析。色谱条件: PepMap RSLC C₁₈ 色谱柱 (75 μm×250 mm, 2 μm); 流动相 A 为 2% 乙腈 (含 0.1% 甲酸), B 为 80% 乙腈 (含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱 (0~1 min, 0%~5%B; 1~63 min, 5%~23%B; 63~88 min, 23%~48%B; 88~89 min, 48%~100%B; 89~95 min, 100%B; 95~100 min, 100%~0%B; 100~120 min, 0%B); 流速 300 nL·min⁻¹。质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子模式进行扫描, MS 扫描范围 (*m/z*) 350~1 300, 采集模式为 data dependent acquisition (DDA); 选择母离子中信号最强的 20 个进行二级碎裂; 一级质谱分辨率 70 000, 碎裂方式 high energy collision dissociation (HCD) 模式; 二级分辨率 35 000, 动态排除时间 18 s。

2.5.5 生物信息学分析 将质谱采集的数据文件导入 Proteome Discoverer 中, 进行搜索, 对蛋白质定量分析采用 ProGroup 算法。根据基因本体论 (GO, <http://www.geneontology.org/>) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg/>) 数据库分析对差异蛋白的生物功能及参与的信号通路进行富集。为研究差异蛋白之间的相互作用关系, 采用 STRING Database (<https://string-db.org/>) 构建靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。

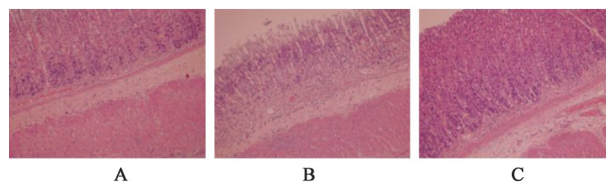
2.5.6 Western blot 测定相关蛋白的表达水平 根据蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 混匀, 95 °C 加热变性 5 min, 样本 -20 °C 保存。聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳: 在制备分离胶后, 每个泳道加样 20 μL, 在 80 V 恒定电压下开始电泳, 样品通过浓缩凝胶的上层后, 恒定电压从 130 V 开始。分离目标蛋白质后, 从去离子水中取胶。湿法转膜: PVDF 膜压住凝胶中目标蛋白, 装入转移槽中, 采用恒压进行转膜。封闭: 取出 PVDF 膜, 用 TBST 缓冲液摇动。洗去 PVDF 膜上的转移缓冲液, 后置于 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 中, 封闭加一抗 (稀释倍数

1: 1 000): 14-3-3 theta, Tenascin-C, SCF, Mpc1, Caspase-3, ICAM-1 和 GIMAP4, 取出 PVDF 膜, 于 TBST 缓冲液中在摇床上振摇, 第一抗体覆盖 PVDF 膜, 4 °C 过夜, 然后加二抗: 用 1% BSA 的 TBST 缓冲液稀释的含有辣根过氧化物酶偶联的二抗。洗膜, 经化学发光显影、拍照, 计算各组蛋白灰度值。

2.5.7 统计学处理 用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行统计学分析, 采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对慢性胃炎治疗作用的评价 胃组织 HE 病理分析发现, 模型组大鼠胃组织固有层-黏膜下-浆膜层出现淋巴细胞浸润; 肌层散在少量淋巴细胞; 同时黏膜下水肿; 固有层少许充血, 为慢性浅表性胃炎 (非萎缩性) 的典型症状, 表明慢性胃炎模型成功建立, 而半夏泻心汤可明显降低炎性细胞浸润、水肿及充血的程度, 见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 半夏泻心汤组

图 1 各组胃组织 HE 病理切片 (HE, ×200)

Fig. 1 HE pathological sections of stomach tissues in each group (HE, ×200)

3.2 胃组织蛋白数据质量评价 根据鉴定出的肽段序列信息, 结果发现蛋白质的相对分子质量大多集中于 21~40 kDa, 其蛋白质数量为 1 617 个, 占总鉴定出的蛋白比例为 26.83%。根据鉴定出来的蛋白质覆盖率, 以此来确定氨基酸序列的准确性。分析结果发现, 覆盖率 < 1% 的蛋白仅有 149 个, 说明本实验鉴定的蛋白质具有较高的准确性。

3.3 差异蛋白分析 从胃组织中鉴定出 4 452 个蛋白, 相对于正常组, 乙醇导致的慢性胃炎组织有 318 个差异蛋白, 其中上调蛋白有 216 个, 下调蛋白有 102 个。相对于模型组, 半夏泻心汤组出现 258 个差异表达蛋白, 其中 141 个表达上调, 117 个下调。正常组与模型组有 318 个差异蛋白, 半夏泻心汤组与模型组有 258 个差异蛋白, 其中交集有 58 个差异蛋白。

3.4 差异蛋白 GO 分析 根据 GO 蛋白数量富集分析发现, 在生物过程 (BP) 中, 半夏泻心汤调控的差异蛋白主要富集 cell killing, immune system

process, detoxification, rhythmic process 等, 在细胞组分(CC)分类中, 这些差异蛋白主要富集于 nucleoid, membrane-enclosed lumen, supramolecular complex, cell junction 等, 在分子功能(MF)分类中, 这些差异蛋白富集于 hijacked molecular function, transporter activity 等。见表1。

表1 半夏泻心汤调控的差异蛋白GO富集率分析

Table 1 GO enrichment analysis of DEPs regulated by Banxia Xiexintang

GO分类	生物学功能	富集率/%
BP	cell killing	23.08
	immune system process	10.92
	detoxification	7.55
	rhythmic process	7.02
	reproductive process	4.88
CC	nucleoid	20.00
	membrane-enclosed lumen	9.13
	supramolecular complex	4.25
	cell junction	4.02
	extracellular region	3.72
MF	hijacked molecular function	33.33
	transporter activity	8.00
	antioxidant activity	6.25
	transcription regulator activity	4.55
	structural molecule activity	4.00

3.5 差异蛋白KEGG富集分析 KEGG富集分析发现半夏泻心汤涉及信号通路有三羧酸(TCA) cycle, steroid hormone biosynthesis, retrograde endocannabinoid, carbon metabolism, cell cycle, nuclear factor-kappa B(NF-κB), 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)等, 见表2。

3.6 差异蛋白PPI网络分析 采用PPI网络可研究慢性胃炎和半夏泻心汤治疗后的差异蛋白之间相互关系, 见图2。从蛋白互作网络分析发现, 半夏泻心汤影响的差异蛋白互作网络涉及到防御机制、细

表2 半夏泻心汤调控的差异蛋白KEGG富集分析

Table 2 KEGG enrichment analysis of DEPs regulated by Banxia Xiexintang

No.	通路名称	富集率/%
rno:00020	citrate cycle (TCA cycle)	41.67
rno:00140	steroid hormone biosynthesis	35.71
rno:04723	retrograde endocannabinoid signaling	20.59
rno:01200	carbon metabolism	20.00
rno:04110	cell cycle	17.65
rno:05204	chemical carcinogenesis	14.71
rno:04064	NF-κB signaling pathway	9.09
rno:04151	PI3K/Akt signaling pathway	5.32
rno:03013	RNA transport	2.11
rno:04530	tight junction	1.37

胞周期、信号传导及能量代谢等生物学过程。PPI分析发现 Caspase-3 (P55213) 与 ICAM-1 (Q00238) 有着相互关系。Caspase-3 与蛋白质二硫键异构酶 A5 (Q5I0H9) 紧密连接。醌氧化还原酶和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶亚复合物参与能量产生和转化。其中, 醌氧化还原酶可能参与异生物素的解毒并干扰 mRNA 的结合, 这些能量代谢酶参与半夏泻心汤治疗慢性胃炎的过程。

3.7 差异蛋白验证分析 采用 Western blot 对一些潜在功能的差异蛋白进行验证, 从蛋白质组学结果发现有 7 个蛋白差异表达倍数明显, 包括 14-3-3theta, SCF, TN-C, Caspase-3, ICAM-1 和 GIMAP4, 这些差异蛋白在正常组、模型组及半夏泻心汤组均出现显著表达。结果发现, 模型组大鼠胃组织中的 14-3-3 theta, SCF, TN-C, Caspase-3, ICAM-1 和 GIMAP4 表达水平相对于正常组显著升高, 而半夏泻心汤可明显降低这些蛋白的表达水平。模型组大鼠的 Mpc1 表达水平明显低于正常组, 而半夏泻心汤可明显升高 Mpc1 的表达水平, 这表明 Western blot 验证的结果与蛋白质组学结果一致。见表3, 图3。

表3 Western blot测定各个差异蛋白的表达水平($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Expression level of DEPs was detected by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	14-3-3 theta	TN-C	SCF	Caspase-3	GIMAP4	Mpc1	ICAM-1
正常	0.25±0.04	0.29±0.05	0.56±0.05	0.28±0.03	0.49±0.04	0.51±0.05	0.57±0.07
模型	0.65±0.06 ²⁾	0.51±0.05 ²⁾	1.02±0.08 ¹⁾	1.02±0.05 ²⁾	0.86±0.06 ²⁾	0.11±0.03 ²⁾	0.85±0.05 ¹⁾
半夏泻心汤	0.47±0.07 ³⁾	0.27±0.06 ⁴⁾	0.63±0.03 ⁴⁾	0.34±0.04 ⁴⁾	0.50±0.03 ³⁾	0.33±0.04 ⁴⁾	0.43±0.06 ³⁾

注: 与正常组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; 与模型组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ 。

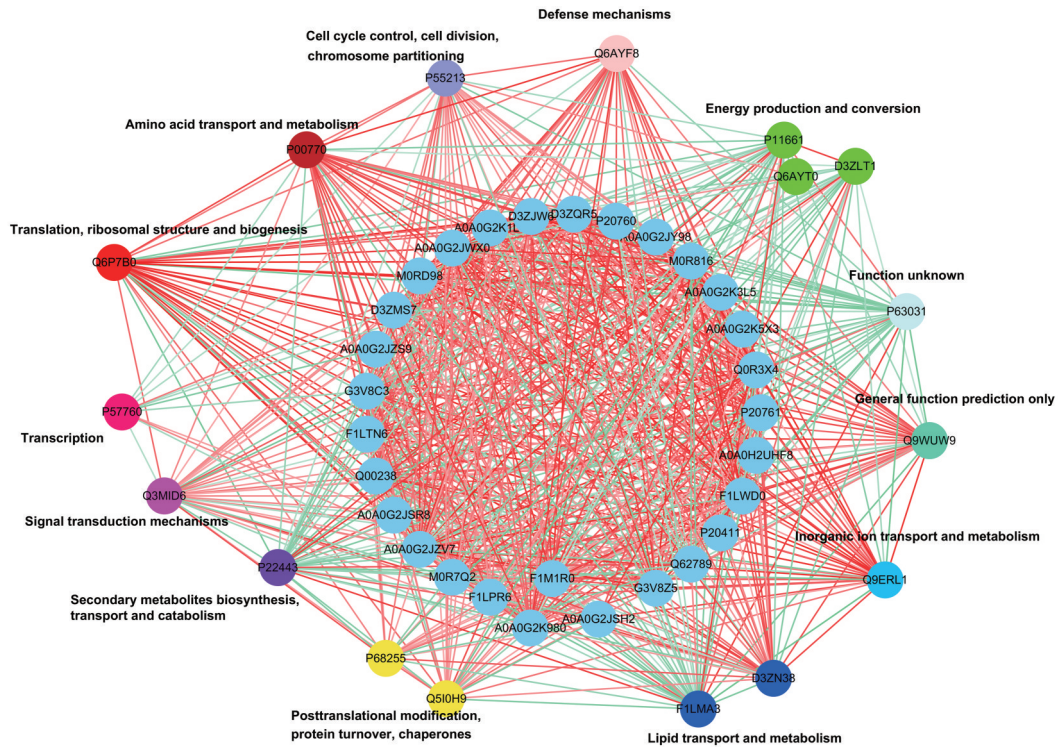
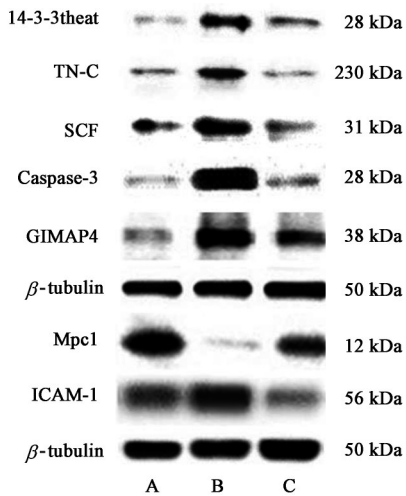


图2 半夏泻心汤调控的差异蛋白PPI网络

Fig. 2 PPI of DEPs regulated by Banxia Xiexintang



A. 正常组; B. 模型组; C. 半夏泻心汤组

图3 Western blot测定各个差异蛋白电泳

Fig.3 Level of DEPs was detected by Western blot

4 讨论

本文基于TMT标签和液相色谱质谱联用技术研究半夏泻心汤治疗CG大鼠的蛋白质组学变化,从胃组织中检测出4 452个蛋白质。差异蛋白分析结果发现半夏泻心汤共涉及到258个差异蛋白,其中与模型组共有58个差异蛋白,通过对这些差异蛋白的所富集的生物功能及信号通路分析,可以更好地从蛋白质组学的角度说明中药复方治疗CG的多

靶点的生物学基础,丰富了中药治疗疾病的现代科学内涵。

4.1 实验动物造模方法及给药剂量的确定 为模拟人长期酗酒引发的慢性胃炎病理状态,本研究采用56%乙醇给予大鼠灌胃法,4周成功建立慢性胃炎大鼠模型,表现为慢性浅表性胃炎(非萎缩性)的典型症状。课题组前期曾考察不同剂量的半夏泻心汤(5, 10, 20 g·kg⁻¹)对慢性胃炎大鼠的治疗作用,与5 g·kg⁻¹剂量组大鼠相比,10 g·kg⁻¹的剂量组的炎性细胞浸润程度减轻明显,而10 g·kg⁻¹剂量组与20 g·kg⁻¹组无显著性差异,故选择10 g·kg⁻¹剂量组的大鼠胃组织进行蛋白质组学研究。

4.2 半夏泻心汤调控的差异蛋白分析 Western blot的测定7个差异蛋白的表达趋势与蛋白质组学数据一致。14-3-3 theta调节的信号通路与细胞凋亡活性密切相关,可调控细胞凋亡通路上死亡信号的传导,直接干预凋亡通路中心线粒体凋亡^[16-17]。TN-C是胃炎过程中的关键介质,与胃癌的发生、发展、转移有紧密的相关性^[18],在胃炎发作时,TN-C蛋白在巨噬细胞中过表达,参与迁移凋亡、炎症反应等多种生理过程^[19-21]。本研究发现半夏泻心汤可下调14-3-3 theta和TN-C的表达水平,推测其可能通过抑制胃黏膜细胞的凋亡,而发挥抗炎作用。在

吲哚美辛诱导的胃炎早期, ICAM-1 表达水平升高^[22]。有研究发现, 乙醇的摄入与 ICAM-1 的表达水平密切相关^[23]。文献报道幽门螺杆菌阳性胃炎中 SCF 阳性成纤维细胞数量明显增多, 在肥大细胞和成纤维细胞中 SCF 表达增加^[24]。本研究也证实半夏泻心汤可通过降低 ICAM-1 和 SCF 的蛋白表达水平, 发挥抑制炎症反应的作用。Caspase-3 作为终末剪切酶, 在细胞凋亡过程中发挥重要的作用, 本研究结果显示慢性胃炎模型中 Caspase-3 表达量增加, 说明 Caspase-3 参与胃细胞凋亡的过程, 而半夏泻心汤可能抑制 Caspase-3 的表达而发挥抗细胞凋亡的作用。GIMAP4 在细胞转运过程中表现出鸟苷三磷酸激酶(GTPase)活性和功能, 其过高的表达水平会影响干扰素(IFN)- γ 的水平^[25]。Mpc1 参与线粒体内膜限制丙酮酸转运的调节^[26]。此外, Mpc1 的过高表达抑制胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭性^[27]。半夏泻心汤可能通过降低 GIMAP4 的表达水平, 而提高 Mpc1 的表达水平, 恢复胃组织细胞的能量代谢, 起到修复受损的胃黏膜细胞的作用。

4.3 差异蛋白 KEGG 分析 KEGG 富集分析显示半夏泻心汤影响的差异蛋白参与 TCA 循环, 类固醇激素生物合成, 碳代谢, 细胞周期, PI3K-Akt, NF- κ B 等信号通路。PI3K-Akt 信号通路参与急性和慢性炎症过程, 涉及细胞代谢, 细胞调节和凋亡^[28-29]。Akt 是重要的节点蛋白, 使多个信号通路发生级联, 具有调节细胞的凋亡、分化和代谢等功能^[30]。NF- κ B 信号通路作为经典的炎症通路, 已被证实与炎症有着紧密的联系, 当受到 TNF- α , IL-6 及 IL-8 等炎症因子及物理、化学因素的刺激时, NF- κ B p65 被激活, 进入细胞核内, 与靶基因结合, 进而转录和翻译, 促使各种炎症反应的发生^[31]。类固醇激素的生物合成信号通路可以调节碳水化合物的代谢并控制血压的水平, 可以调节盐分的平衡并维持正常的血压水平^[32]。研究表明由乙醇导致的胃黏膜损伤再生, 与脂质、葡萄糖代谢有关^[33]。逆行内源性大麻素信号通路, 该通路与多巴胺神经能调节有关^[34]。细胞周期信号通路可能有助于区分胃炎的发病进程^[35]。

综上所述, 从蛋白质组学技术结合 Western blot 验证, 研究发现 14-3-3 theta, TN-C, CASP3, ICAM-1, SCF, GIMAP4 和 Mpc1 是半夏泻心汤抗 CG 的靶点蛋白, 可通过能量代谢、激素调节、炎症反应及免疫过程而发挥抗 CG 的作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 房静远, 杜奕奇, 刘文忠, 等. 中国慢性胃炎共识意见(2017年, 上海)[J]. 胃肠病学, 2017, 22(11): 670-687.
- [2] 吴焱. 慢性浅表性胃炎的治疗现状及进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(2): 42-43.
- [3] 邹思政, 赵梓芸, 易超, 等. 慢性萎缩性胃炎的中医药研究进展[J]. 内蒙古中医药, 2018, 37(12): 116-117.
- [4] 陈永灿, 杨汐茵, 陈宇, 等. 半夏泻心汤对慢性萎缩性胃炎大鼠炎症因子的影响[J]. 浙江中医杂志, 2019, 54(12): 876-877.
- [5] 徐斐翔, 龚振宇, 薛明明. 半夏泻心汤对大鼠乙酸型胃溃疡的保护作用[J]. 中国临床医学, 2020, 27(6): 978-982.
- [6] 纪万里, 周泽华, 王婷婷, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 方法分析半夏泻心汤化学成分[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(10): 1736-1750.
- [7] WANG Y, ZHANG Y F, XIAO J, et al. Simultaneous determination of baicalin, baicalein, wogonoside, wogonin, scutellarin, berberine, coptisine, ginsenoside Rb1 and ginsenoside Re of Banxia Xiexintang in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study[J]. Biomed Chromatogr, 2018, 32(2): 1-11.
- [8] 石富国. 半夏泻心汤加减治疗脾胃热型慢性胃炎的临床治疗作用及安全性分析[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(47): 168-170.
- [9] 柯俊铿. 半夏泻心汤加减治疗脾胃湿热型慢性浅表性胃炎的临床效果[J]. 中外医学研究, 2019, 17(27): 142-144.
- [10] 崔甄甄. 应用定量蛋白质组学技术对 IgA 肾病肾组织蛋白的鉴定和定量分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(20): 2804-2807.
- [11] 王红霞. 基于化学蛋白质组学的激酶组学研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(3): 259-267.
- [12] CHEN J, ZHAN L B, LU X G, et al. The alteration of zibupiyin recipe on proteomic profiling of forebrain postsynaptic density of db/db mice with diabetes-associated cognitive decline [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 56(2): 471-489.
- [13] NING J W, LIN G B, JI F, et al. Preventive effects of geranylgeranylacetone on rat ethanol-induced gastritis [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(18): 2262.
- [14] 王江. 基于半夏泻心汤及其拆方治疗胃溃疡的实验研究探讨寒热并用配伍规律[D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
- [15] YE S Q, ZOU Y, ZHENG Q W, et al. TMT-MS/MS proteomic analysis of the Carbohydrate-active enzymes

- (CAZymes) in the fruiting body of *Pleurotus tuoliensis* during storage [J]. *J Sci Food Agric*, 2020, doi: 10.1002/jsfa.10803.
- [16] XUE D M, XUE Y, NIU Z P, et al. Expression analysis on 14-3-3 proteins in regenerative liver following partial hepatectomy [J]. *Genet Mol Biol*, 2017, 40(4):855-859.
- [17] GARDINO A K, YAFFE M B. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2011, 22 (7) : 688-695.
- [18] WIKSTEN J P, LUNDIN J, NORDLING S, et al. Tenascin-C expression correlates with prognosis in gastric cancer [J]. *Oncology*, 2003, 64(3):245-250.
- [19] CHIQUET-EHRISMANN R, CHIQUET M. Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress [J]. *J Pathol*, 2003, 200 (4) : 488-499.
- [20] OREND G, CHIQUET-EHRISMANN R. Tenascin-C induced signaling in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2006, 244 (2):143-163.
- [21] SEKELJIC V, ANDJUS P R. Tenascin-C and its functions in neuronal plasticity [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(6):825-829.
- [22] LI Z W, TIAN M M, WU Y, et al. ICAM-1 469K/E gene polymorphisms increase the risk of gastric dysplasia [J]. *Chin J Oncol*, 2012, 34(3):192-195.
- [23] SACANELLA E, ESTRUCH R, BADIA E, et al. Chronic alcohol consumption increases serum levels of circulating endothelial cell/leucocyte adhesion molecules E-selectin and ICAM-1 [J]. *Alcohol Alcohol*, 1999, 34(5):678-684.
- [24] BAMBA N, NAKAJIMA S, ANDOH A, et al. Stem cell factor expressed in human gastric mucosa in relation to mast cell increase in helicobacter pylori-infected gastritis [J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47 (2) : 274-282.
- [25] HEINONEN M T, KANDURI K, LÄHDESMÄKI H J, et al. Tubulin- and actin-associating GIMAP4 is required for IFN- secretion during Th cell differentiation [J]. *Immunol Cell Biol*, 2015, 93 (2) : 158-166.
- [26] BRICKER D K, TAYLOR E B, SCHELL J C, et al. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, drosophila, and humans [J]. *Science*, 2012, 337(6090):96-100.
- [27] ZHOU X, XIONG Z J, XIAO S M, et al. Overexpression of MPC1 inhibits the proliferation, migration, invasion, and stem cell-like properties of gastric cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2017, 10 (24):5151-5163.
- [28] ZHOU W, YUAN G L, WANG Q S. Vitamin D attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in endothelial cells through inhibition of PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Pharmazie*, 2019, 74(7):412-417.
- [29] WANG X H, HAN Y, LIU J, et al. Exosomes play an important role in the progression of plasma cell mastitis via the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway [J]. *Mediat Inflamm*, 2019, 2019(9): 4312016.
- [30] QIU W, LEIBOWITZ B, ZHANG L, et al. Growth factors protect intestinal stem cells from radiation-induced apoptosis by suppressing PUMA through the PI3K/AKT/p53 axis [J]. *Oncogene*, 2010, 29 (11) : 1622-1632.
- [31] 李婷, 张宇, 张兆鹏, 等. 胁腹宁颗粒对慢性非萎缩性胃炎大鼠 NF- κ B 信号转导通路的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(11):2739-2741.
- [32] STOCO D M. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis [J]. *Annu Rev Phy*, 2001, 63: 193-213.
- [33] OLGUIN-MARTINEZ M, HERNANDEZ-ESPINOSA D R, HERNANDEZ-MUNOZ R. High alpha-tocopherol dosing increases lipid metabolism by changing redox state in damaged rat gastric mucosa and liver after ethanol treatment [J]. *Clin Sci(Lond)*, 2018, 132(12):1257-1272.
- [34] YIN H H, LOVINGER D M. Frequency-specific and D2 receptor-mediated inhibition of glutamate release by retrograde endocannabinoid signaling [J]. *P Natl Acda Sci USA*, 2006, 103(21):8251-8256.
- [35] POLAT A, CINEL L, DUSMEZ D, et al. Expression of cell-cycle related proteins in *Helicobacter pylori* gastritis and association with gastric carcinoma [J]. *Neoplasma*, 2002, 49(2):95-100.

[责任编辑 顾雪竹]