

基于网络药理学及实验验证瑞巴派特对慢性萎缩性胃炎的作用机制

王笑晗, 杨冰心, 于泳*

郑州大学第五附属医院, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 运用网络药理学和实验探究瑞巴派特改善慢性萎缩性胃炎小鼠的作用靶点及通路。**方法** 通过 PubChem 中进行检索得到瑞巴派特的详细信息, 并分别导入 Targetnet、SwissTarget Prediction、Super-PRED、PharmMapper 数据库进行检索得到与瑞巴派特作用相关的靶点。通过在 Pharmgkb、OMIM、GeneCards、Disgnet、CTD 数据库筛选出慢性萎缩性胃炎相关的疾病靶点。利用韦恩图获取药物与疾病的交集靶点, 将获得的交集靶点导入 STRING 数据库, 建立蛋白相互作用 (PPI) 网络图, 借助 DAVID 进行基因本体论 (GO) 功能、京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 最后对可能的核心靶点进行分子对接验证。采用幽门螺杆菌和亚硝酸盐建立慢性萎缩性胃炎小鼠模型, 通过苏木素-伊红 (HE) 染色、免疫组化染色法、实时荧光定量 (RT-qPCR) 法验证瑞巴派特对慢性萎缩性胃炎的炎症因子和部分关键靶点的调控作用。**结果** 通过数据库筛选出相关药物靶点 506 个, 疾病靶点 2 115 个, “药物-疾病”交集靶点 169 个, 共获得 20 个核心靶点、10 类生物过程, 凋亡及叉头转录因子 (FoxO) 信号通路等 20 条相关通路, 分子对接显示瑞巴派特与蛋白激酶 B1 (Akt1) 蛋白、FoxO 蛋白、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 蛋白亲和力良好。实验证实了瑞巴派特降低了促炎因子[白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、 γ 干扰素 (IFN- γ)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)]的 mRNA 表达, 升高抑炎因子[白细胞介素-4 (IL-4)、白细胞介素-10 (IL-10)]、胃泌素和 H⁺/K⁺-ATP 酶的 mRNA 表达, 并上调 FoxO 信号通路上的 PI3K、AKT mRNA 水平, 下调 FoxO 水平。**结论** 瑞巴派特可能通过调控 FoxO 通路, 调节凋亡过程、抑制炎症反应, 进而有效缓解慢性萎缩性胃炎小鼠胃黏膜损伤。

关键词: 瑞巴派特; 网络药理学; 实验验证; 慢性萎缩性胃炎; 凋亡; 叉头转录因子信号通路; 促炎因子

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2023)03-0531-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.03.006

Mechanism of rebamipide in treatment of chronic atrophic gastritis based on network pharmacology and experimental verification

WANG Xiao-han, YANG Bing-xin, YU Yong

The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China

Abstract: Objective To investigate the action targets and pathways of rebamipide in treatment of mice with chronic atrophic gastritis by using network pharmacology and experiments. **Methods** The detailed information of rebamipide was obtained through retrieval in PubChem, and the target related to rebamipide action was retrieved by importing Targetnet, SwissTarget Prediction, Super-PRED, and PharmMapper database respectively. Disease targets related to chronic atrophic gastritis were selected from Pharmgkb, OMIM, GeneCards, Disgnet, and CTD databases. The intersection targets of drugs and diseases were obtained using Venn diagram, which was imported into STRING database to establish the protein interaction (PPI) network map. The gene ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out with DAVID. Finally, the possible core targets were verified by molecular docking. *Helicobacter pylori* and nitrite were used to establish a mouse model of chronic atrophic gastritis. Hematoxylin-eosin (HE) staining, immunohistochemical staining, and real-time fluorescence quantization (RT-qPCR) were used to verify the regulatory effects of repaxide on inflammatory factors and some key targets of chronic atrophic gastritis. **Results** A total of 506 drug targets, 2 115 disease targets, and 169 drug-disease intersection targets were screened out through the database. A total of 20 core targets, 10 biological processes, and 20 related pathways including apoptosis and FoxO signaling pathway were

收稿日期: 2022-11-27

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (201702121)

作者简介: 王笑晗, 女, 硕士, 从事幽门螺杆菌相关胃炎的研究。E-mail: 1871060880@qq.com

*通信作者: 于泳, 男, 主任医师, 博士, 从事幽门螺杆菌相关胃炎的研究。E-mail: 13838290678@126.com

obtained. Molecular docking showed that rebamipide had good affinity with protein kinase B1 (Akt1) protein, FoxO protein, and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) protein. It was confirmed that rebamipide decreased the mRNA expression of pro-inflammatory factors [interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β)]. The mRNA expressions of anti-inflammatory factors [interleukin-4 (IL-4), interleukin-10 (IL-10)], gastrin, and H⁺/K⁺ -ATPase were increased, and the mRNA levels of PI3K and AKT in FoxO signaling pathway were up-regulated, while FoxO levels were down-regulated. **Conclusion** Rebamipide may regulate the apoptosis process and inhibit inflammatory response by regulating FoxO pathway, so as to effectively relieve the gastric mucosal injury of mice with chronic atrophic gastritis.

Key words: rebamipide; network pharmacology; experimental verification; chronic atrophic gastritis; apoptosis; FoxO signaling pathway; pro-inflammatory factors

慢性萎缩性胃炎为一种多步骤、进行性和终身性的炎症^[1],其特点是有胃腺细胞的丢失和肠型上皮、幽门型腺体或纤维组织的替代的慢性胃黏膜层炎症^[2]。慢性萎缩性胃炎通常被定义为一种重要的癌前疾病,及时有效地治疗慢性萎缩性胃炎可预防胃癌的发生^[3]。幽门螺杆菌感染是慢性萎缩性胃炎的主要致病因素^[4]。目前根除幽门螺旋杆菌感染的主要治疗方法是基于抗生素及抑酸药等的联合运用^[5]。然而,病原微生物会不断演变产生抗生素耐药性,并且抗生素的应用会导致严重的胃肠道副作用^[6]。因此,非抗生素类药物的使用在治疗慢性萎缩性胃炎中令人关注。

研究表明瑞巴派特是一种氨基酸衍生物,可用于治疗胃炎和胃溃疡^[7-8]。有研究表明,瑞巴派特在改善幽门螺旋杆菌所致胃炎的临床症状的同时可显著提高细菌根除率^[9],并且在根除幽门螺杆菌后长期给予瑞巴派特,可显著改善慢性炎症的同时改善粘膜萎缩。因此,长期给予瑞巴派特治疗可预防胃癌的发生^[10-11]。但是目前,瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎的分子机制尚未完全阐明。故本研究基于网络药理学方法和分子对接技术^[12],挖掘瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎的治疗靶点以及信号通路,并通过动物实验验证,为瑞巴派特的临床应用提供一定理论支持。

1 材料

1.1 实验药物

N-甲基-N 亚硝基脲(山东西亚化学生物有限公司,货号 684-93-5),瑞巴派特(质量分数 $\geq 98\%$,上海麦克林生化科技有限公司,批号 C11516529)。

1.2 动物

选用 40 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,4 周龄,体质量 13~16 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2020-0004]。饲养环境:装有独立通风系统 SPF 级动物房,温度维

持在 23~26 °C,湿度为 50%~60%,光照 12 h/黑暗 12 h 交替。动物实验已经郑州大学第五附属医院伦理委员会批准,伦理审查号 KY2022030。

1.3 菌株

幽门螺杆菌悉尼菌株,由南昌大学第一附属医院吕农华教授馈赠,郑州大学第五附属医院 Marshall 实验研究中心保存。

1.4 试剂及仪器

胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司,批号 2230184)、脑心液琼脂粉(美国 Thermo 公司,批号 2364916)、哥伦比亚琼脂培养皿(英国 OXOID 公司,批号 2223405)、幽门螺杆菌免疫组化抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 21096120)、DAB 显色剂(北京索莱宝科技有限公司,批号 20210401)、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(河南赛诺特生物技术有限公司,批号 20201214)。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-4(IL-4)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、胃泌素、H⁺-K⁺ATP 酶(H⁺-K⁺ATPase)、叉头转录因子(FoxO)、蛋白激酶 B1(Akt1)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)引物购于金唯智生物工程有限公司。

超净工作台(苏州净化设备有限公司)、LightCycler 480 II 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Roche 公司)、组织自动脱水机(徕卡显微系统有限公司)、石蜡包埋机(徕卡显微系统有限公司)、组织切片机(徕卡显微系统有限公司)。

2 方法

2.1 瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎的网络药理学分析

2.1.1 瑞巴派特相关作用靶点的筛选 以“rebamipide”为检索词,在 PubChem 中进行检索得到瑞巴派特的详细信息,将瑞巴派特的 Canonical

SMILES 分别导入 Targetnet、SwissTarget Prediction、Super-PRED、PharmMapper 数据库进行检索得到与瑞巴派特作用相关的靶点。

2.1.2 慢性萎缩性胃炎相关靶点筛选及药物-疾病交集靶点获取 以“chronic atrophic gastritis”为关键词在 Pharmgkb、OMIM、GeneCards、Disgnet、CTD 数据库进行检索,筛选出慢性萎缩性胃炎相关的疾病靶点,去除重复内容。通过 Venny 2.1 将获得的药物靶点与慢性萎缩性胃炎疾病相关靶点取交集提取交集靶基因,并绘制韦恩图,得到药物-疾病共同靶点。

2.1.3 构建蛋白质相互作用(PPI)网络图和拓扑学分析 将上述瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎的潜在靶点输入 STRING 数据库,将 minimum required interaction score 设置为 highest confidence (0.900) 构建 PPI 网络图,其他为默认设置,将结果导出为 tsv 文件。将上述结果导入 Cytoscape 3.9.0 中进行可视化。运用 Tools 中的 Analyze Network 进行计算后按照度(degree)值进行排列并优化图形。用 Cytoscape 3.9.0 中的 cytohubba,选择最大团中心性(maximal clique centrality, MCC)计算方法,筛选出前 20 个核心靶点并进行后续研究。

2.1.4 基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将交集靶标利用在线软件 DAVID 进行 GO 和 KEGG 富集分析并利用 Bioinformatics 将上述结果进行可视化处理。

2.1.5 药物-靶点-通路网络构建 将瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎潜在作用靶点、KEGG 通路导入 Cytoscape,构建药物-靶点-通路网络。

2.1.6 分子对接 本研究以“rebamipide”为检索词在 PubChem 数据库中检索瑞巴派特的分子结构,下载其 3D Structures 的 SDF 格式,将筛选的核心靶点基因通过 RCSB PDB 数据库筛选最佳蛋白结构,并下载 PDB 格式。借助 PyMOL 对核心基因蛋白结构进行除水、去配体等操作,通过 OpenBabel 将瑞巴派特的 SDF 格式转换为 mol2 格式。运行 AutoDockTools 1.5.6 软件进行分子对接,搜集结合能分值,最后利用 PyMOL 进行可视化分析。

2.2 瑞巴派特对慢性萎缩性胃炎小鼠胃黏膜保护作用的研究

2.2.1 幽门螺杆菌悬液的制备 每次 ig 前用分光光度计测定液体培养基中菌悬液的吸光度(A)值,取出上清,同时测量上清的 A 值,根据实验室前期

制备的幽门螺杆菌标准曲线计算出总菌落数,根据最终菌液浓度(1×10^9 CFU/mL),加入所需液体培养基(无抗生素)体积。

2.2.2 实验分组及模型建立^[13-17] 40 只 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为对照组($n=10$)、模型组($n=15$)、瑞巴派特组($n=15$)。对照组给予等量蒸馏水自由饮用;模型组和瑞巴派特组给予 *N*-甲基-*N* 亚硝基脲溶液自由饮用,每隔 1 周给药 1 次,未给药期间,对照组 ig 等量液体培养基(无抗生素);余组 ig 幽门螺杆菌悉尼菌株菌悬液(1×10^9 CFU/mL),0.3 mL/次,隔天 1 次。ig 前 8 h 及 ig 后 4 h 禁食不禁水。连续给药 6 周后,在继续单独 ig 幽门螺杆菌,持续 4 周。连续给药和菌液后,对照组及模型组给予蒸馏水自由饮用;瑞巴派特组给予瑞巴派特溶液 100 mg/(kg·d)自由饮用,瑞巴派特溶液每 2~3 天更换 1 次,持续 12 周。

2.2.3 HE 染色 小鼠解剖后取胃组织,4%多聚甲醛溶液固定后取出,脱水、包埋、切片后,分别使用苏木素溶液、伊红溶液染色,于 100、200 倍显微镜下观察小鼠胃组织的病理变化情况。

2.2.4 免疫组化染色 经过抗原修复、滴加一抗及二抗后加入 DAB 显色液,在 200、400 倍显微镜下观察显色情况。

2.2.5 RT-PCR 在 NCBI 网站中设计引物,引物序列如表 1 所示。取小鼠适量胃组织,提取 RNA 后逆转录为 cDNA,加入相应引物进行实时荧光定量 PCR 反应,按照 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明书提供的循环条件进行操作,待反应结束后,读取相应的 C_t 值, GAPDH 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、胃泌素、H⁺-K⁺ATPase、FoxO、Akt1、PI3K mRNA 的相对表达量。

2.2.6 数据处理分析 选用 SPSS 26.0 统计软件对数据处理分析。如果实验数据符合正态分布,组间比较采用单因素方差分析,若不符合正态分布采用 K-W 秩和检验, $P<0.05$ 代表差异有统计学意义。做图使用 GraphPad Prism 9.0 以及 Adobe Photoshop 软件。

3 结果

3.1 瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎的网络药理学分析

3.1.1 瑞巴派特靶点的筛选 通过对数据库进行检索得到与瑞巴派特作用相关的靶点,合并去重后

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 (5'→3')
GAPDH	正向: GCTGAGTATGTCGTGGAG 反向: TCTTCTGAGTGGCAGTGAT
IL-1 β	正向: GAAGAAGAGCCCATCCTCTG 反向: TCATCTCGGAGCCTGTAGTG
IL-4	正向: GGTCTCAACCCCCAGCTAGT 反向: GCCGATGATCTCTCTCAAGTGAT
IL-6	正向: TCCAGTTGCTTCTTGGGACTG 反向: AGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
IL-10	正向: CCAGGGAGATCCTTTGATGA 反向: AACTGGCCACAGTTTTTTCAGG
IFN- γ	正向: CAGGCCATCAGCAACAACATAAGC 反向: AGCTGGTGGACCACTCGGATG
TNF- α	正向: CCCAGGGACCTCTCTCTAATCA 反向: GCTACAGGCTTGTCACCTCGG
Gastrin	正向: AATGTAGACGGAAGTGGACAGC 反向: GCATCCTTGTTCAATTCTGTGC
H ⁺ -K ⁺ ATP ase	正向: CCGGTGGGTGTGGATCAG 反向: GCAAAGAGCCCGGTCATG
FoXO3a	正向: CCGCCAGCCAGTCTATGCAA 反向: AACCCGTCAGCATCCATGAGT
AKT1	正向: ACAGTCATTGAGCGCACCT 反向: CCTGATCGGAAGTCCATCGTCT
PI3K	正向: CTCTCCTGTGCTGGCTACTGT 反向: GCTCTCGGTTGATTCCAAACT

共得到 506 个药物作用靶基因。

3.1.2 慢性萎缩性胃炎相关靶点筛选及药物 - 疾病交集靶点获取 将 Pharmgkb、OMIM、Gene Cards、Disgnet、CTD 数据库检索的慢性萎缩性胃炎相关靶点结果合并, 去除重复数据, 共获得 2 115 个相关靶点。通过数据库整合共得到 169 个交集靶点并绘制韦恩图 (图 1), 即获得瑞巴派特对治疗慢性萎缩性胃炎的潜在靶点。

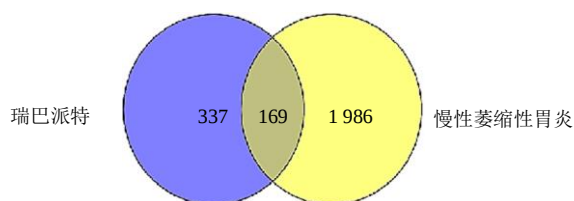


图 1 药物 - 疾病共同靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn Diagram of drug - disease common targets

3.1.3 构建 PPI 网络图和拓扑学分析 将上述潜在靶点输入 STRING 数据库, 得到 PPI 网络图, 将结果导入 Cytoscape 3.9.0。软件中的 “Network Analyzer” 可以用于分析靶点的 degree 值, 利用分析后的参数对 PPI 网络进行可视化, 节点的形状越大, 颜色越深, 表明该节点的 degree 值越大。优化

和整理后如图 2A 所示。用 Cytoscape 3.9.0 中的 cytohubba, 选择 MCC 计算方法, 按照分数排名得到核心靶点 20 个 (图 2B), 主要涉及信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、白细胞介素 2 (IL-2)、表皮生长因子受体 (EGFR)、胱天蛋白酶 3 (CASP3) 等。

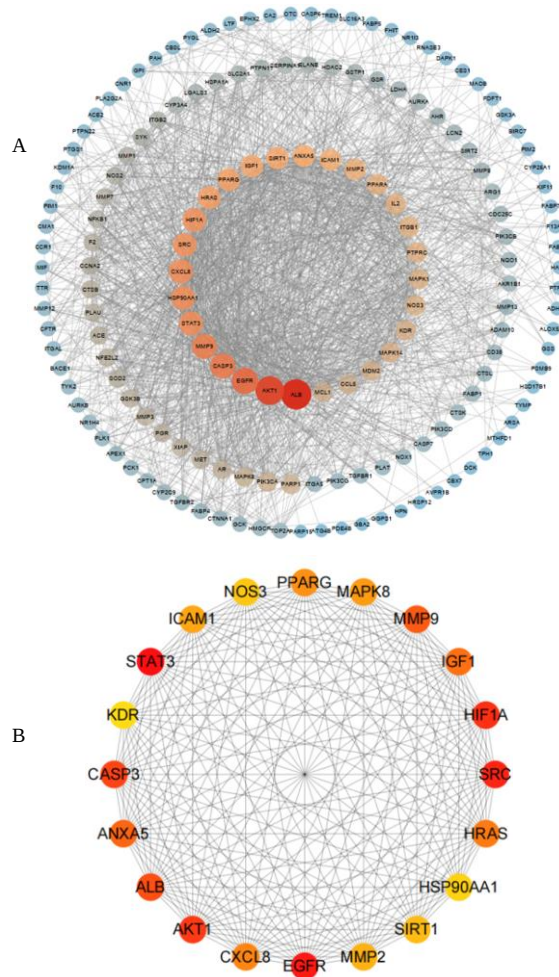


图 2 药物 - 疾病共同靶点 PPI 网络图 (A) 和前 20 个核心靶点 (B)

Fig. 2 PPI network diagram of drug-disease common targets (A) and top 20 core targets (B)

3.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 将潜在靶点导入 DAVID 进行 GO 与 KEGG 功能富集分析, 将通过 GO 功能富集分析获得的条目进行排序, 选取各类分析排名前 10 的条目在 Bioinformatics 中进行可视化处理 (图 3A)。瑞巴派特可以通过调节细胞凋亡过程、基因表达、蛋白水化、老化等生物学过程 (BP), 其活性主要通过同一蛋白结合、酶结合、丝氨酸型内肽酶活性、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶

活性等分子功能 (MF) 产生。将药物与疾病共同靶点进行 KEGG 通路富集分析, 并对排名前 30 的通路进行可视化分析 (图 3B), 富集表明癌症信号通路、FoxO 信号通路、凋亡等是慢性萎缩性胃炎的重要信号通路。

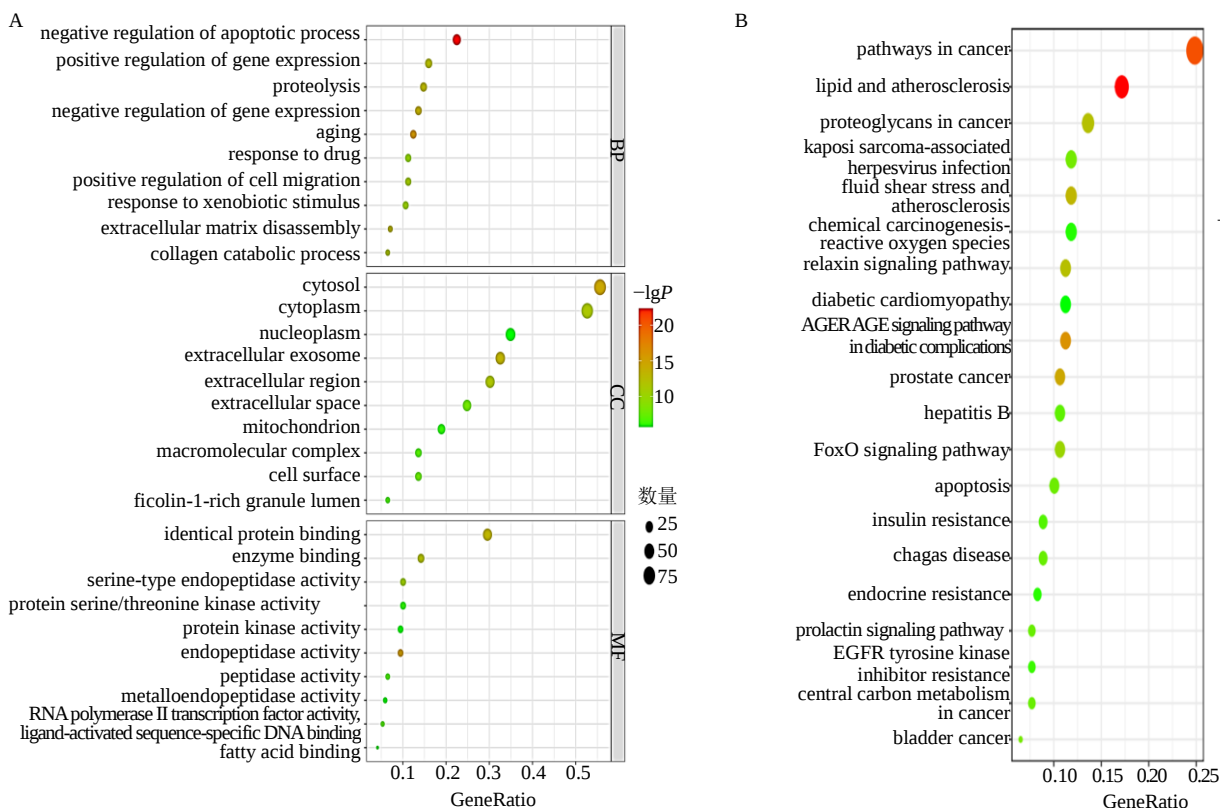


图 3 潜在靶点的 GO 富集分析 (A) 和 KEGG 富集分析 (B)

Fig. 3 GO enrichment analysis (A) and KEGG enrichment analysis (B) of potential targets

表 2 KEGG 通路的详细信息

Table 2 Details of the KEGG pathway

ID	通路
hsa05417	lipids and atherosclerosis
hsa05200	pathways in cancer
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications
hsa05215	prostate cancer
hsa05418	fluid shear stress and atherosclerosis
hsa04926	relaxin signaling pathway
hsa05205	proteoglycans in cancer
hsa04068	FoxO signaling pathway
hsa05219	bladder cancer
hsa05167	Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection
hsa04210	apoptosis
hsa05230	central carbon metabolism in cancer
hsa04917	prolactin signaling pathway
hsa05142	chagas disease
hsa05161	hepatitis B
hsa04931	insulin resistance
hsa01521	EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance
hsa01522	endocrine resistance
hsa05208	chemical carcinogenesis-reactive oxygen species
hsa05415	diabetic cardiomyopathy

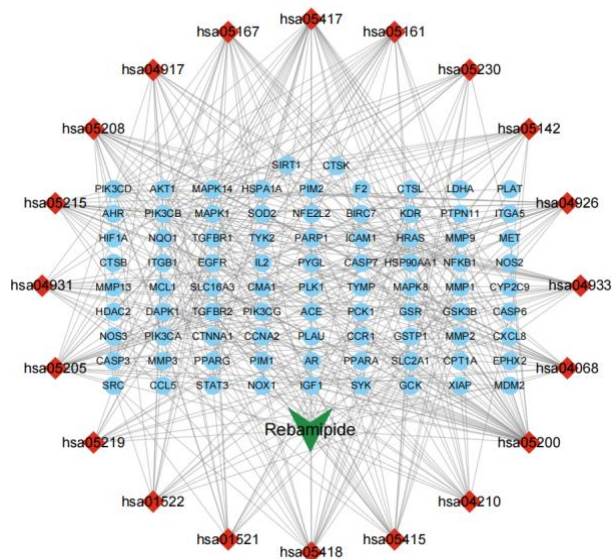


图 4 药物 - 共同靶点 - 通路网络图

Fig. 4 Drug - common target - pathway network diagram

3.1.6 分子对接 根据 PPI 及 KEGG 富集分析结果,将选取的核心基因所编码的靶蛋白 PI3K、Akt1、FoxO 与瑞巴派特进行分子对接。分子对接构象的结合能越低,则结合构象越稳定,反映受体分子与配体之间结合的可能性越大,搜集对接的结合能数值(表 3)。这 3 个核心靶点与瑞巴派特的结合能均小于 0,这提示瑞巴派特可与核心靶点自发结合,能量越低结合能力越强,进一步验证了上述网络药理学结果,并对其进行可视化分析,见图 5。

表 3 瑞巴派特与靶蛋白分子对接基本信息

Table 3 Basic information of docking between rebabapide and target protein molecules

名称	相对分子质量	靶蛋白	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
瑞巴派特	370.8	PI3K	-4.68
		Akt1	-6.12
		FoxO	-7.62

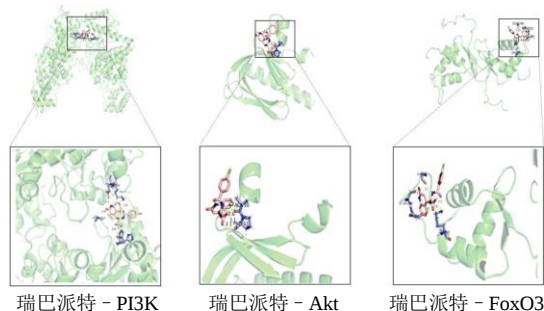


图 5 分子对接构象图

Fig. 5 Molecular docking conformation

3.2 瑞巴派特对慢性萎缩性胃炎小鼠胃黏膜保护作用的研究

3.2.1 小鼠一般情况 入组的所有小鼠一般状况尚可,毛发发黑光泽、行动有力,体质量呈增长趋势。对照组小鼠表现良好,模型组、瑞巴派特组小鼠表现出不同程度的体型偏瘦、毛发稀疏无光泽、活动减少、挣扎力减弱等。瑞巴派特组小鼠状态较模型组表现转好。实验期间,对照组小鼠死亡 3 只。

3.2.2 小鼠胃黏膜组织学变化 显微镜下可观察到,对照组小鼠胃黏膜上皮细胞排列整齐,腺体排列规律、整齐,腺体整体厚度无明显变薄,黏膜固有层可见少量炎性细胞散在分布。模型组小鼠胃黏膜上皮排列不连续,腺体分布不规则、杂乱稀疏,腺管扩大,可见炎性细胞浸润,淋巴细胞和浆细胞分布于固有层中。瑞巴派特组小鼠胃黏膜上皮可见破损,腺体分布紊乱,厚度变薄、排列紊乱,固有层可见少量炎性细胞(图 6)。

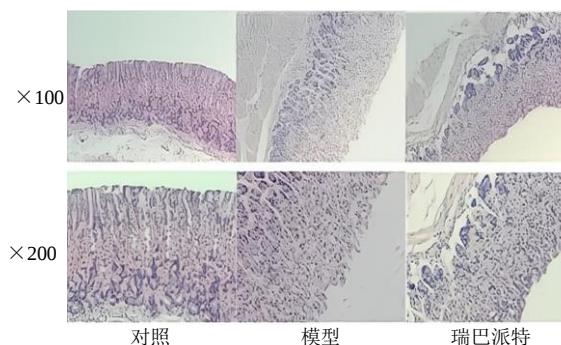


图 6 HE 染色(×100, 200)

Fig. 6 HE staining (×100, 200)

3.2.3 幽门螺杆菌定植 通过免疫组化染色观察胃组织中幽门螺杆菌的定植,模型组和瑞巴派特组可见在小鼠胃黏液层或腺腔内分布着黄褐色短棒状颗粒,为幽门螺杆菌成功定植于小鼠胃内(图 7)。

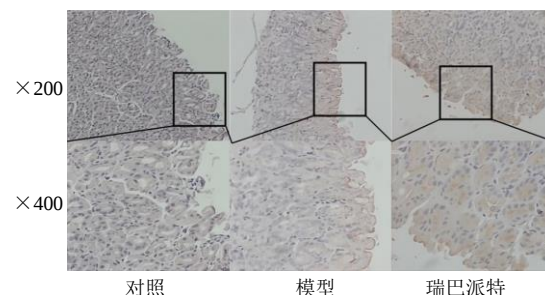
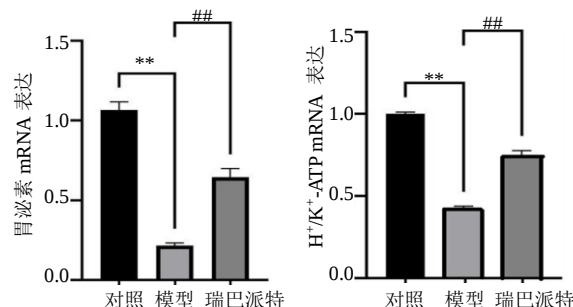


图 7 免疫染色观察幽门螺杆菌定植情况(×200, 400)

Fig. 7 Observation of Hp colonization by immunostaining (×200, 400)

3.2.4 胃黏膜功能改变 与对照组相比,模型组小鼠胃黏膜组织中胃泌素和 H⁺/K⁺-ATP 酶在 mRNA 水平表达明显下降(P<0.01);与模型组相比,瑞巴派特组中胃泌素和 H⁺/K⁺-ATP 酶 mRNA 表达量显著升高(P<0.01),见图 8。



与对照组比较: **P<0.01; 与模型组比较: ##P<0.01

**P<0.01 vs control group; ##P<0.01 vs model group

图 8 胃黏膜功能指标相关基因表达(̄x ± s, n = 10, 15)

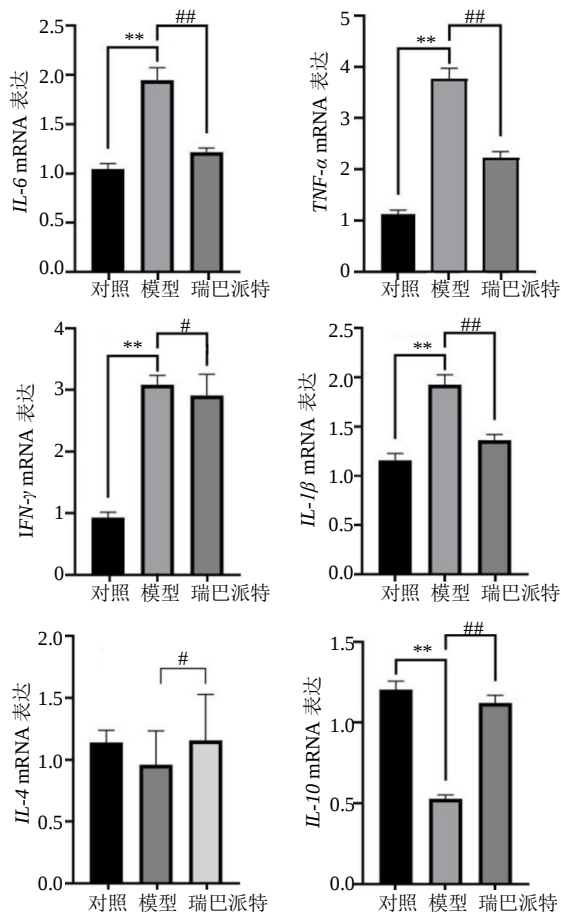
Fig. 8 Expression of genes related to functional indexes of gastric mucosa (̄x ± s, n = 10, 15)

3.2.5 胃黏膜炎症因子 mRNA 水平 与对照组相比, 模型组中促炎细胞因子 *IL-6*、*TNF- α* 、*IFN- γ* 、*IL-1 β* mRNA 表达显著升高, 抗炎因子 *IL-10* mRNA 表达下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 瑞巴派特组中促炎因子表达显著降低, 抗炎因子 *IL-4*、*IL-10* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 9。

3.2.6 小鼠胃组织中 PI3K/Akt/FoxO 通路的基因表达 与对照组相比, 模型组小鼠胃组织中 *FoxO* mRNA 表达水平显著升高, *PI3K*、*Akt* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 瑞巴派特组小鼠 *FoxO* mRNA 表达水平显著降低, *PI3K*、*Akt* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 10。

4 讨论

慢性萎缩性胃炎是一种临床上较为常见的胃肠道炎症性疾病, 典型症状包括食欲减退、恶心和

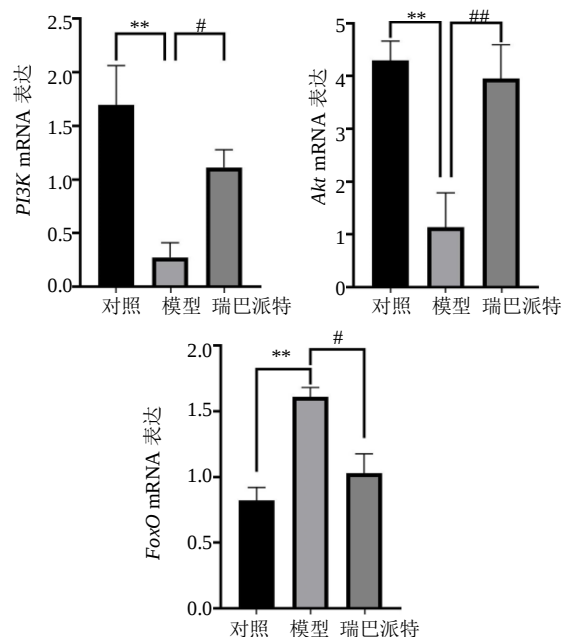


与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 9 胃黏膜相关炎症因子表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10, 15$)

Fig. 9 Expression of gastric mucosa-related inflammatory factors ($\bar{x} \pm s$, $n = 10, 15$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

图 10 胃黏膜通路相关基因的表达

Fig. 10 Expression of genes related to gastric mucosal pathways

反酸等^[18]。瑞巴派特为一种较为常见的胃黏膜保护药物, 越来越多的研究证明瑞巴派特其药理作用, 但是对慢性萎缩性胃炎的影响有待阐明。本研究利用网络药理学通过数据库整合, 结合实验验证深入挖掘瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎的潜在靶点和作用机制。

本研究通过网络药理学绘制了瑞巴派特治疗慢性萎缩性胃炎的 KEGG 信号通路关系网络。结果发现瑞巴派特主要通过癌症、FoxO 信号通路、凋亡信号通路治疗慢性萎缩性胃炎。STAT3、Akt1、VEGFA、IL-2、EGFR、CASP3、PI3K 是其主要作用靶点。基于 KEGG 富集分析结果表明 FoxO 信号通路在富集结果中占据重要地位, 核心靶点 Akt1、PI3K 与 FoxO 通路密切相关。分子对接结果显示, PI3K、Akt1、FoxO 与瑞巴派特具有较好的结合活性, 表明瑞巴派特可能通过 FoxO 信号通路发挥作用。幽门螺杆菌可通过壁细胞和其他腺体细胞的丢失引起的凋亡诱导胃黏膜萎缩性变化^[19], 扰乱细胞增殖与凋亡的动态平衡, 促进慢性萎缩性胃炎的发生^[20]。已有研究证明, 幽门螺杆菌可通过 PI3K/Akt 信号途径调节 FoxO 的活性进而诱导胃黏膜细胞凋亡^[21]。Ishihara 等^[22]的研究表明瑞巴派特可通过抑

制胃黏膜细胞凋亡来减轻塞来昔布引起的胃疾病。提示瑞巴派特可能通过 FoxO 通路调节凋亡信号传导,与幽门螺杆菌感染有高度的相关性。本研究利用动物实验对网络药理学预测结果进行了验证。

实验结果显示,慢性萎缩性胃炎模型小鼠经瑞巴派特干预后,胃炎的相关症状及一般情况明显减轻,胃组织中 FoxO mRNA 表达水平明显降低,PI3K、Akt mRNA 表达水平明显升高。说明瑞巴派特可通过 FoxO 信号通路调节幽门螺杆菌诱导的胃黏膜细胞凋亡进行发挥治疗慢性萎缩性胃炎的作用。FoxO 信号通路可参与众多细胞功能,包括细胞分化、细胞衰老、细胞凋亡、细胞增殖、DNA 损伤和修复,可调控细胞周期及细胞凋亡过程^[23]。已知 FoxO 调节通路是由 PI3K/Akt 通路所激发的,Coskun 等^[24]研究发现,在结肠癌细胞中,激活 PI3K 途径,可以将 PIP2 磷酸化,产生 PIP3 以激活下游 Akt,继而使 FoxO 磷酸化,磷酸化的 FoxO3a 与 14-3-3 蛋白结合形成复合物从细胞核转移至细胞质聚集,抑制其转录功能。因此 FoxO 通路可能为瑞巴派特抗凋亡作用的潜在靶点。

在幽门螺杆菌感染过程中,造成胃黏膜萎缩的同时,最严重的影响是造成炎症在胃黏膜内持续存在,如白细胞介素(IL)、趋化因子、环氧合酶-2(COX-2)和一氧化氮(NO)等^[25]。幽门螺杆菌感染引发宿主症状和损伤胃黏膜的机制部分是通过幽门螺杆菌本身或其分泌的毒力因子引发宿主炎症反应并且释放大量的炎症因子,从而导致黏膜损伤及修复困难所导致^[26]。在干预治疗的小鼠中发现,瑞巴派特可降低炎症因子水平。数据表明,瑞巴派特可调节 Th1 和 Th2 细胞因子水平,减轻黏膜炎症及改善胃底萎缩。Th1 细胞主要分泌 IFN- γ 、TNF- β 等促炎因子,其中促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6、IFN- α 、TNF- α 等常用于评估胃黏膜损伤的严重程度^[27],而 Th2 细胞产生 IL-4、IL-10 等抑炎因子,Th1/Th2 细胞的平衡是机体免疫调节的核心环节。瑞巴派特治疗的小鼠中,炎症的缓解与 Th1 细胞因子表达减弱有关,也与 Th2 细胞因子表达释放增加有关,如 IL-10。IL-10 是一种抗炎细胞因子,可保护宿主免受微生物群和病原体的过度反应,并作为对微生物抗原免疫反应的负调节因子发挥作用^[28]。基于上述结果,瑞巴派特还通过抑制炎症反应来减轻慢性萎缩性胃炎的胃黏膜损伤。幽门螺杆菌感染后会导致胃黏膜萎缩,胃分泌功能下降,胃酸浓度

降低^[29]。胃泌素是与胃酸分泌功能密切相关的激素,胃泌素由胃窦 G 细胞所分泌,可维持胃黏膜的完整性,是胃黏膜的主要保护因子之一^[30],并可维持胃黏膜上皮细胞增殖和凋亡的平衡。H⁺/K⁺-ATP 酶是壁细胞分泌胃酸所需的关键酶,与胃酸的分泌密切相关^[31]。两者的浓度一定程度上可反映萎缩程度,动物实验结果表明慢性萎缩性胃炎模型小鼠经瑞巴派特干预后,胃组织中胃泌素和 H⁺/K⁺-ATP 酶 mRNA 表达水平明显升高。本研究表明瑞巴派特可部分改善胃黏膜萎缩,延缓向胃癌的进展,同时改善胃黏膜的分泌功能。

综上所述,瑞巴派特可能是通过作用于 FoxO 信号通路参与凋亡反应来发挥抗慢性萎缩性胃炎的作用并可改善胃黏膜的分泌功能,减轻胃黏膜炎症反应。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sipponen P, Maaroos H I. Chronic gastritis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2015, 50(6): 657-667.
- [2] Wang Y K, Shen L, Yun T, et al. Histopathological classification and follow-up analysis of chronic atrophic gastritis [J]. *World J Clin cases*, 2021, 9(16): 3838-3847.
- [3] Hou D, Yang M, Hu Z, et al. Effects of rebamipide for chronic atrophic gastritis: A protocol for systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(25): e20620.
- [4] Li W Q, Zhang J Y, Ma J L, et al. Effects of *Helicobacter pylori* treatment and vitamin and garlic supplementation on gastric cancer incidence and mortality: Follow-up of a randomized intervention trial [J]. *BMJ*, 2019, 366: 15016.
- [5] Zhou Y, Li T. Effects of quadruple therapy combined with probiotics on *Helicobacter pylori*-related peptic ulcer [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 1221190.
- [6] Xu H, Yun J, Li R, et al. Antibiotics resistance prevalence of *Helicobacter pylori* strains in northwest China [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 5519-5528.
- [7] Bae M, Jang S, Lim J W, et al. Protective effect of Korean red ginseng extract against *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation in Mongolian gerbils [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(1): 8-15.
- [8] 曹世红, 曾忠荣. 瑞巴派特联合三联疗法治疗老年消化性胃溃疡的临床效果分析 [J]. *药物评价研究*, 2019, 42(4): 730-733.
- [9] Kim H, Seo J Y, Kim K H. Inhibition of lipid peroxidation, NF-kappaB activation and IL-8 production by rebamipide

- in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells [J]. *Dig Dis Sci*, 2000, 45(3): 621-628.
- [10] Gobert A P, Verriere T, de Sablet T, *et al.* Haem oxygenase-1 inhibits phosphorylation of the *Helicobacter pylori* oncoprotein CagA in gastric epithelial cells [J]. *Cell Microbiol*, 2013, 15(1): 145-156.
- [11] Gobert A P, Verriere T, Asim M, *et al.* Heme oxygenase-1 dysregulates macrophage polarization and the immune response to *Helicobacter pylori* [J]. *J Immunol*, 2014, 193(6): 3013-3022.
- [12] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [13] Kwon H J, Won Y S, Nam K T, *et al.* Vitamin D₃ upregulated protein 1 deficiency promotes *N*-methyl-*N*-nitrosourea and *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis in mice [J]. *Gut*, 2012, 61(1): 53-63.
- [14] Sugiyama A, Maruta F, Ikeno T, *et al.* *Helicobacter pylori* infection enhances *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in the Mongolian gerbil [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(10): 2067-2069.
- [15] Cao X, Tsukamoto T, Nozaki K, *et al.* Earlier *Helicobacter pylori* infection increases the risk for the *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced stomach carcinogenesis in Mongolian gerbils [J]. *Jpn J Cancer Res*, 2002, 93(12): 1293-1298.
- [16] Lee J Y, Kim N, Choi Y J, *et al.* Effect of *N*-methyl-*N*-nitrosourea on *Helicobacter*-induced gastric carcinogenesis in C57BL/6 mice [J]. *J Cancer Prev*, 2016, 21(3): 182-186.
- [17] Yamachika T, Nakanishi H, Inada K, *et al.* *N*-methyl-*N*-nitrosourea concentration-dependent, rather than total intake-dependent, induction of adenocarcinomas in the glandular stomach of BALB/c mice [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1998, 89(4): 385-391.
- [18] Rodriguez-Castro K I, Franceschi M, Noto A, *et al.* Clinical manifestations of chronic atrophic gastritis [J]. *Acta Biomed*, 2018, 89(8-S): 88-92.
- [19] Malfertheiner P, Megraud F, O' Morain C A, *et al.* Management of *Helicobacter pylori* infection-the maastricht V/florence consensus report [J]. *Gut*, 2017, 66(1): 6-30.
- [20] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [21] Tabassam F H, Graham D Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori*-associated regulation of forkhead transcription factors FoxO1/3a in human gastric cells [J]. *Helicobacter*, 2012, 17(3): 193-202.
- [22] Ishihara T, Tanaka K I, Tashiro S, *et al.* Protective effect of rebamipide against celecoxib-induced gastric mucosal cell apoptosis [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(11): 1622-1633.
- [23] Eijkelenboom A, Burgering B M T. FOXOs: Signalling integrators for homeostasis maintenance [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013, 14(2): 83-97.
- [24] Coskun D, Obakan P, Arisan E D, *et al.* Epibrassinolide alters PI3K/MAPK signaling axis via activating Foxo3a-induced mitochondria-mediated apoptosis in colon cancer cells [J]. *Exp Cell Res*, 2015, 338(1): 10-21.
- [25] Gueron G, De Siervi A, Ferrando M, *et al.* Critical role of endogenous heme oxygenase 1 as a tuner of the invasive potential of prostate cancer cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(11): 1745-1755.
- [26] 敦泽, 郭立芳. 幽门螺杆菌致病机制的研究进展 [J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2020, 28(8): 645-648.
- [27] Michalkiewicz J, Helmin-Basa A, Grzywa R, *et al.* Innate immunity components and cytokines in gastric mucosa in children with *Helicobacter pylori* infection [J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 176726.
- [28] Zhao Y, Zhang J, Cheng A, *et al.* Gastric cancer: Genome damaged by bugs [J]. *Oncogene*, 2020, 39(17): 3427-3442.
- [29] Sipponen P, Maaroos H I. Chronic gastritis [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2015, 50(6): 657-667.
- [30] Schmassmann A, Reubi J C. Cholecystokinin-B/gastrin receptors enhance wound healing in the rat gastric mucosa [J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(8): 1021-1029.
- [31] Zanner R, Gratzl M, Prinz C. Circle of life of secretory vesicles in gastric enterochromaffin-like cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 971: 389-396.

[责任编辑 高源]