

· 药理与临床 ·

基于代谢组学和生物信息学的益胃饮干预胃癌前病变机制研究

董宇^{1,2}, 赵丽沙², 邱萍¹, 吴人照², 陈伟², 柴可群^{1,2*}

1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

2. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007

摘要: 目的 通过非靶向代谢组学技术结合生物通路分析 (ingenuity pathway analysis, IPA) 探讨益胃饮干预胃癌前病变的潜在作用机制。方法 采用 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍 (MNNG) 建立胃癌前病变大鼠模型, 采用超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 检测并表征大鼠血清代谢物, 筛选模型组和益胃饮组大鼠血清中具有显著变化的代谢物, 并通过 IPA 软件预测其潜在作用靶点与机制。结果 益胃饮可有效干预大鼠胃癌前病变进程; 胃癌前病变模型大鼠血清中有 23 个代谢物有显著变化 ($P < 0.05$), 益胃饮可显著回调其中 13 个代谢物趋于正常水平 ($P < 0.05$), 主要涉及不饱和脂肪酸的生物合成, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成, 鞘脂代谢, 花生四烯酸代谢, 类固醇激素合成等代谢途径; 益胃饮干预胃癌前病变与抑制体内皮素-1 (ET-1) 和白介素-8 (IL-8) 信号途径密切相关。结论 益胃饮可通过回调花生四烯酸代谢等代谢途径和抑制 ET-1、IL-8 信号传导途径改善炎症环境, 从而抑制胃癌前病变进程。

关键词: 益胃饮; 胃癌前病变; 代谢组学; 超高效液相色谱高分辨质谱; 生物通路分析

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)21-5478-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.21.011

Mechanism of Yiwei Decoction on intervening gastric precancerous lesions based on metabolomics and bioinformatics

DONG Yu^{1,2}, ZHAO Li-sha², QIU Ping¹, WU Ren-zhao², CHEN Wei², CHAI Ke-qun^{1,2}

1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

2. Zhejiang Academy of TCM, Hangzhou 310007, China

Abstract: Objective To study the potential mechanisms of Yiwei Decoction on intervening gastric precancerous lesions by using metabolomics technology combined with ingenuity pathway analysis (IPA). **Methods** Gastric precancerous lesion rat model induced by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (MNNG) was established and ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) was utilized to detect and characterize rat serum metabolites. Metabolites with significant changes in model group and Yiwei Decoction group were screened out; The IPA software was used to analyze the potential targets and mechanisms. **Results** Yiwei Decoction effectively interfered with the progress of gastric precancerous lesions. A total of 23 metabolites in the serum of gastric precancerous lesion rat model were significantly changed ($P < 0.05$), 13 metabolites were significantly regulated to normal level in Yiwei Decoction group ($P < 0.05$), the metabolic pathways mainly involved in the biosynthesis of unsaturated fatty acids, biosynthesis of valine, leucine and isoleucine, sphingolipid metabolism, arachidonic acid metabolism and steroid hormone synthesis, etc. The effect of Yiwei Decoction on intervening with the progression of gastric precancerous lesions was related to the inhibition of ET-1 and IL-8 signaling pathway. **Conclusion** Yiwei Decoction can inhibit the progress of gastric precancerous lesions and improve the inflammatory environment by regulating arachidonic acid metabolism and inhibiting ET-1 and IL-8 signaling pathways.

Key words: Yiwei Decoction; gastric precancerous lesions; metabolomics; ultra-performance liquid chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry; ingenuity pathway analysis

胃癌 (gastric cancer, GC) 是全球范围内发病率和死亡率极高的恶性肿瘤之一^[1]。胃癌前病变 (gastric precancerous lesions, GPL) 是胃癌炎癌转化的重要阶段, 包括慢性浅表性胃炎、萎缩性胃炎、

收稿日期: 2020-04-22

基金资助: 国家自然科学基金面上项目 (81973654); 浙江省基础公益研究计划项目 (LGD19C040005)

作者简介: 董宇 (1985—), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为中药分析和代谢组学。Tel: (0571)88849088 E-mail: dongyu04428@163.com

*通信作者 柴可群, 男, 教授, 研究方向为中西医结合肿瘤。Tel: (0571)89972001 E-mail: ckq3301@aliyun.com

肠上皮化生、异型增生、胃早癌等不同阶段^[2]。GPL 具有双向转化的特点, 早期干预和治疗可有效逆转胃癌的发生发展, 现已成为胃癌二级预防的重点研究领域^[3-4]。

益胃饮是浙江省名中医柴可群教授治疗胃癌前病变、胃癌的临床经验方, 此方取健脾益气、祛瘀化痰、清热解毒 3 法, 具有扶正气、调胃气、抗邪毒的功效。课题组前期研究表明益胃饮可诱导人胃癌细胞凋亡, 并显著抑制其增殖、迁移与侵袭^[5-6]; 也可显著抑制小鼠移植性前胃癌术后复发和肺转移瘤的形成^[7]。经多年基础研究与临床实践证实, 益胃饮可有效防治胃癌, 但具体作用机制尚不明确。

代谢组学是系统生物学的一个重要分支, 是继基因组学、转录组学和蛋白质组学之后发展起来的新兴“组学”, 其整体、宏观的指导思想与中药整体性作用一致, 适用于中药及复方整体性评价和复杂干预体系研究^[8-9]。本研究通过构建 *N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍 (MNNG) 诱导的胃癌前病变大鼠模型, 并采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱 (UPLC-Q/TOF-MS) 开展血清非靶向代谢组学研究, 寻找益胃饮防治胃癌前病变的关键代谢物, 并通过生物通路分析 (ingenuity pathway analysis, IPA) 结合 ELISA 法验证, 揭示益胃饮干预胃癌前病变的潜在作用靶点和机制, 为益胃饮防治胃癌前病变的临床应用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 药材

黄芪 (内蒙古)、浙麦冬 (浙江)、三叶青 (浙江)、姜半夏 (浙江)、蒲公英 (山东)、麸白芍 (浙江)、藤梨根 (浙江)、薏苡仁 (浙江) 和香茶菜 (浙江) 购自杭州华东中药饮片有限公司, 批号分别为 170824、170818、170830、170804、170901、170715、170819、170723、170823, 经浙江省中医药研究院高家鉴主任中药师鉴定, 分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsia 的干燥根、百合科植物麦冬 *Ophiopogon japonicus* (L. f) Ker-Gawl. 的干燥块根、葡萄科植物三叶崖爬藤 *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg 的干燥块根、天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎、菊科植物蒲公英 *Taraxacum mongolicum* Hand. -Mazz. 的干燥全草、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、猕猴桃科植物中华猕猴桃 *Actinidia*

chinensis Planch. 的干燥根、禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi* L. var. *ma-yuen* (Roman.) Stapf 的干燥成熟种仁、唇形科植物香茶菜 *Rabdosia amethystoides* (Benth.) Hara 的干燥根茎。

1.2 仪器

SCIEX X-500R 四级杆飞行时间质谱仪、ExionLC AD 高效液相色谱仪 (美国 AB SCIEX 公司); 20R 低温高速离心机 (美国 Beckman 公司); IKA 微型涡旋混合仪 (德国艾卡公司); AUW220D 电子天平 (日本岛津公司); CentriVap 低温真空离心浓缩仪 (美国 Labconco 公司)。

1.3 药品与试剂

MNNG (批号 75F71-TF) 购自上海蓝季生物公司; 色谱级甲醇、色谱级乙腈购自美国 Merck 公司; 质谱级甲酸购自美国 Fisher 公司; 超纯水购自屈臣氏集团有限公司; 内皮素-1 (ET-1) 试剂盒 (G20200326JZ)、白介素-8 (IL-8) 试剂盒 (批号 G20200308PW) 购自上海朗顿生物技术有限公司; 脱氧胆酸 (32-ADE-24-1)、甘氨酸去氧胆酸钠盐 (1-721-JJM-3)、牛黄胆酸钠盐 (1-WGS-26-1)、胆酸 (1-111-GXS-4)、甘氨酸脱氧胆酸钠盐 (05-SSG-070-67) 对照品 (质量分数均大于 98%) 购自上海谱芬生物科技有限公司; 亮氨酸 (140624-201506)、苯丙氨酸 (140624-201506) 对照品 (质量分数均大于 95%) 购自中国食品药品检定研究院。

1.4 动物

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 30 只, 10~12 周龄, 体质量约 200 g, 购自浙江维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号为 SCXK (浙) 2018-0001。

2 方法

2.1 益胃饮提取液制备

取黄芪 300 g、浙麦冬 150 g、三叶青 180 g、姜半夏 120 g、蒲公英 210 g、麸白芍 120 g、藤梨根 300 g、薏苡仁 300 g、香茶菜 300 g, 置于煎药机中加入 10 倍体积的纯水浸泡 30 min, 加热 (105 °C) 提取 2 次, 每次提取 1 h, 合并滤液浓缩, 制得药材质量浓度为 1.09 g/mL 的益胃饮提取液。

2.2 益胃饮成分表征

2.2.1 益胃饮提取物供试品溶液制备 取 1.0 mL 益胃饮提取液, 置 100 mL 量瓶中, 加入去离子水超声 30 min, 至浓缩液完全溶解, 加入去离子水定容, 以 14 000 r/min 离心 20 min, 取上清液即为益

胃饮提取物供试品溶液。

2.2.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相 A 为 0.1% 甲酸乙腈, 流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱: 0~2 min, 1% A; 2~5 min, 1%~20% A; 5~13 min, 20%~45% A; 13~17 min, 45%~99% A; 17~20 min, 99% A; 体积流量为 0.3 mL/min; 柱温为 40 °C; 进样室温度为 8 °C; 进样体积为 3 μL。

2.2.3 质谱条件 雾化气和干燥气压力为 379.225 kPa (55 psi), 气帘气压力为 241.325 kPa (35 psi), 离子源温度为 600 °C, 喷雾电压为-4 500 V (负离子模式); 高分辨一级扫描范围为 m/z 50~1 500, 子离子扫描范围为 m/z 25~1 000, 一级质谱扫描累积时间为 0.15 s, 二级质谱扫描累积时间为 0.05 s; 二级质谱采用 IDA 模式获得, 去簇电压为-60 V, 碰撞能为 (-35±15) eV。

2.2.4 数据分析 原始数据采用 SCIEX OS 软件采集和处理。SCIEX OS 软件包含多重置信标准, 包括质量准确度、保留时间、同位素、化合物库的匹配使用。本研究根据化合物的一级精确质量数、同位素分布比和 MS/MS 搜索 SCIEX OS 配置的中药二级数据库 TCM MS/MS Library (包含 1 000 多种中药化合物二级数据), 即可在在无标准品的情况下完成对目标物的筛查。

2.3 GPL 大鼠模型的制备及给药

Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为对照组和造模组, 对照组 8 只, 造模组 22 只。对照组大鼠自由饮水, 造模组大鼠自由饮用 MNNG 溶液 (167 μg/mL)。分别于造模第 3、4 个月末随机取 2 只造模组大鼠和 1 只对照组大鼠, 取全胃进行苏木精-伊红 (HE) 染色法染色, 观察病理学变化, 以评估大鼠模型是否成功。造模第 4 个月末大鼠全胃出现异型增生病变, 将余下 18 只造模组大鼠随机分为模型组和益胃饮低、高剂量 (5、20 g/kg) 组, 每组 6 只, 继续造模 4 个月, 同时对照组和模型组大鼠 ig 蒸馏水, 益胃饮低、高剂量组 ig 设定剂量的药物, 连续 4 个月。益胃饮高剂量组采用 1.09 g/mL 的益胃饮提取液, 益胃饮低剂量组采用稀释 4 倍后的益胃饮提取液 (0.272 5 g/mL)。

大鼠麻醉后, 腹主动脉取血、全胃, 沿胃大弯剪开取 1 mm³ 胃小弯体-窦交界处的胃黏膜组织, 病灶部位每间隔 5 mm 取材, 用 10% 甲醛溶液固定, 脱水后石蜡包埋、切片, 厚度为 4 μm。采用 HE 和

阿利新蓝-过碘酸雪夫氏 (AB-PAS) 染色法观察大鼠胃黏膜组织的病理变化。根据胃黏膜组织病理结果, 筛选出合适样本进行代谢组学分析。

2.4 代谢组学分析

2.4.1 血清样本制备 取大鼠血清 200 μL, 加入 600 μL 预先于-20 °C 过夜放置的甲醇-乙腈 (1:1), 涡旋 30 s, 4 °C 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液于-20 °C 静置 60 min, 室温放置 120 min, 再于 4 °C 14 000 r/min 离心 15 min, 取上清液 4 μL 进样。

2.4.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸-乙腈, B 为 0.1% 甲酸溶液, 梯度洗脱: 0~1 min, 95% B; 1~20 min, 95~1% B; 20~23 min, 1% B; 体积流量为 0.4 mL/min; 柱温为 50 °C; 进样体积为 4 μL。

2.4.3 质谱条件 雾化气和干燥气压力为 379.225 kPa (55 psi), 气帘气压力为 241.325 kPa (35 psi), 离子源温度为 600 °C, 正离子模式下喷雾电压为+5 500 V, 负离子模式下喷雾电压为-4 500 V; 高分辨一级扫描范围为 m/z 25~1 000, 子离子扫描范围为 m/z 25~1 000, 一级质谱扫描累积时间为 0.15 s, 二级质谱扫描累积时间为 0.035 s; 二级质谱采用 IDA 模式获得, 一级质谱去簇电压为±60 V, 碰撞能为±10 eV; 二级质谱去簇电压为±60 V, 碰撞能为 (-35±15) eV。

2.4.4 数据分析和统计 原始数据经 ProteoWizard 软件转换成 mzXML 格式, 然后采用 off-line XCMS 软件进行峰对齐、保留时间校正、峰面积提取操作。采用 MetaboAnalyst 4.0 进行单变量统计分析, 包括变异倍数分析 (fold change, FC)、T 检验、火山图分析 (volcano plot, VP); 同时采用 SIMCA-P13.0 软件进行多元统计分析, 数据经 Pareto-scaling 预处理后, 进行模式识别分析, 包括主成分分析 (principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘法判别分析 (orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA)。通过 OPLS-DA 模型筛选出 VIP>1 的离子, 结合单变量统计分析 FC>1.5 且 P<0.05 的限制条件, 找到具有显著性差异的离子, 作为潜在生物标记物。

2.4.5 代谢物鉴定及代谢通路富集 差异离子鉴定表征可通过查询 HMDB (<http://www.hmdb.ca>)、Metlin (<http://www.metlin.scipps.edu>) 和 MetDNA (<http://metdna.zhulab.cn/metdna>) 等公共在线数据

库，同时通过二级质谱数据进行确认，部分代谢物采用对照品确证，各鉴定表征离子需小于 5×10^{-6} 。将通过单因素统计分析和多元统计分析筛选出的差异代谢物输入 MetaboAnalyst 4.0 网站进行代谢通路分析，寻找相关代谢通路。

2.5 IPA 分析

IPA 是一款一体式综合在线分析软件，完全基于 Ingenuity 知识库收集的生命科学数据，以帮助了解各种分子的属性，如与基因、蛋白质、化学物质、药物活性成分途径相关的生物标记物和相互作用网络。将筛选得到的益胃饮显著回调的差异代谢物及其属性、相应变量通过 Excel 格式引入 IPA 软件，利用 IPA 软件中的 Core Analysis 模型进行分析，可以有效、直观地获取益胃饮干预胃癌前病变的潜在靶点和通路。

2.6 血清 ET-1 和 IL-8 检测

按 ELISA 试剂盒说明书检测大鼠血清中 ET-1 和 IL-8 水平。

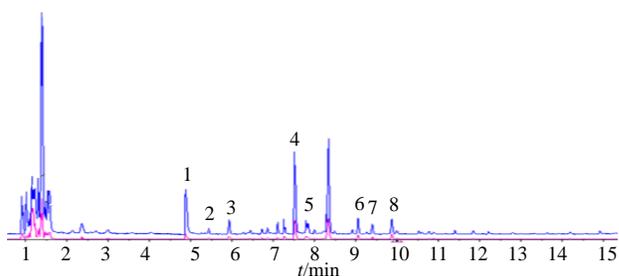
2.7 统计分析

采用 SPSS 25.0 统计软件对计量资料进行方差齐性检验，组间比较采用独立样本 *t* 检验分析方法。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示， $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为有统计学意义，差异显著。当各组样本成偏态分布，采用多样本秩和检验并进行两两分析。

3 结果

3.1 益胃饮提取物化学成分分析

益胃饮提取物经 UPLC-Q/TOF-MS 分析，如图 1 所示，益胃饮提取物中主要含原儿茶酸、鸟苷、绿原酸、芍药苷、毛蕊异黄酮苷、迷迭香酸、芍药



1-鸟苷 2-原儿茶酸 3-绿原酸 4-芍药苷 5-毛蕊异黄酮苷 6-迷迭香酸 7-芍药内酯苷 8-芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷
1-guanosine 2-protocatechuic acid 3-chlorogenic acid 4-paeoniflorin 5-monisoflavone glycoside 6-rosmarinic acid 7-paeoniflorin 8-apigenin-7-O-β-D-glucose aldehydic acid

图 1 负离子模式下益胃饮提取物总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of Yiwei Decoction extract in negative ion mode

苷内酯、芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷等成分。

3.2 GPL 大鼠胃黏膜组织病理学分析

如图 2 所示，对照组大鼠胃黏膜表面光滑、色泽淡红，黏膜皱襞完整且厚薄适中；HE 染色后光镜下可见胃黏膜组织腺体结构、形态、排列正常，细胞核位于基底部，呈椭圆形、嗜碱性，细胞质着色浅淡，无病理核分裂。与对照组相比，模型组大鼠胃壁弹性较差，胃黏膜不完整、变薄，且呈多灶性萎缩；HE 染色后光镜下可见腺体拥挤、形态不规则，并有复层、背靠背现象，细胞核深染、增大、极性消失、核分裂，重度非典型性增生明显。益胃饮低剂量组大鼠胃黏膜呈粉红色，腺体数量、腺体厚度、壁细胞有显著改善，腺体处于轻度异型增生。益胃饮高剂量组腺上皮主要停留在中、重度异型增生。AB-PAS 染色结果显示，对照组蓝色部分较少，基本无肠化生现象；模型组伴肠上皮化生胃黏膜组织较多，蓝色部分显著，肠化生明显；益胃饮低剂量组蓝色部分减轻，表明肠化生明显减轻；益胃饮高剂量组未见显著改变。因此，根据大鼠胃黏膜病理学结果，选取对照组、模型组和益胃饮低剂量组血清样本进行代谢组学分析。

3.3 代谢组学分析

3.3.1 质量控制 (QC) 分析 质谱总离子流图采用 X-500R 质谱仪采集，采用 QC 样本比对法对系统稳

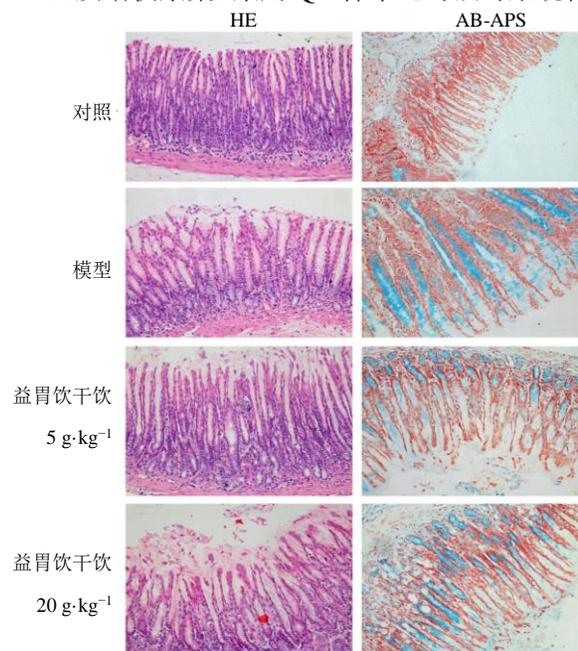


图 2 HE 和 AB-APS 染色观察各组大鼠胃黏膜病理学变化 (×200)

Fig. 2 Pathological changes of gastric mucosa of rats observed by HE and AB-APS staining (×200)

定性进行分析评价,如图 3 所示,不同时期的样本中各色谱峰的响应强度和保留时间基本重叠,未见明显偏离,说明在整个实验过程中仪器检测稳定,在实验获得的代谢谱数据真实可靠,可以反应样本间的生物学差异。

3.3.2 峰提取 采用离线版 XCMS 软件进行峰提取,负离子模式下共提取离子峰 5 765 个,正离子模式下共提取离子峰 5 921 个。

3.3.3 单变量统计分析 如图 4 所示,红色点为差异离子,在负离子模式下共筛选得到 846 个差异离子,在正离子模式下共筛选得到 861 个差异离子。

3.3.4 多变量统计分析 PCA 用来观察对照组、模

型组和益胃饮低剂量组之间的总体分布趋势,观察给予益胃饮后的大鼠血清代谢物整体变化情况。PCA 模型参数中 R_2X 表示模型解释率, Q_2 表示模型预测能力。在本次 PCA 模型中负离子模式下 R_2X 为 0.282, Q_2 为 0.021 5,正离子模式下 R_2X 为 0.431, Q_2 为 0.005,说明本次 PCA 模型的解释能力较好而预测能力一般。如图 5 所示,对照组和模型组的血清代谢物在 PCA 得分图中完全分离,说明 MNNG 诱导的 GPL 模型大鼠血清代谢谱发生明显变化;益胃饮低剂量组与模型组产生明显区分,并向对照组方向偏移,说明益胃饮影响了 GPL 大鼠血清中的代谢物,对其体内的代谢紊乱进行调节。

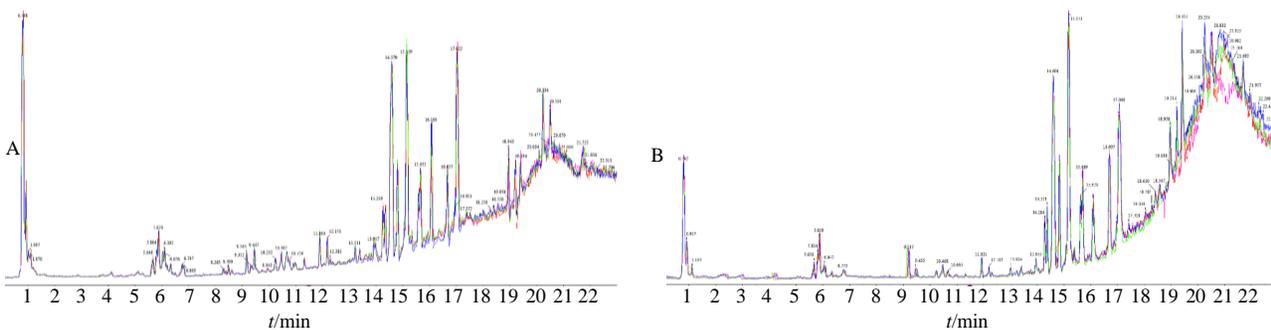


图 3 负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 下的 QC 样品 TIC 叠加图

Fig. 3 Superposition diagram of TIC of QC samples in negative ion mode (A) and positive ion mode (B)

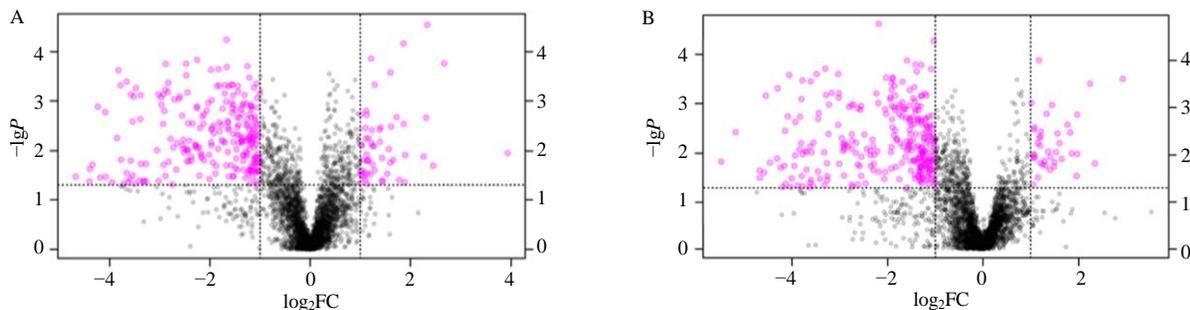


图 4 负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 下对照组与模型组差异的火山图

Fig. 4 Volcano map of difference of control group and model group in negative ion mode (A) and positive ion mode (B)

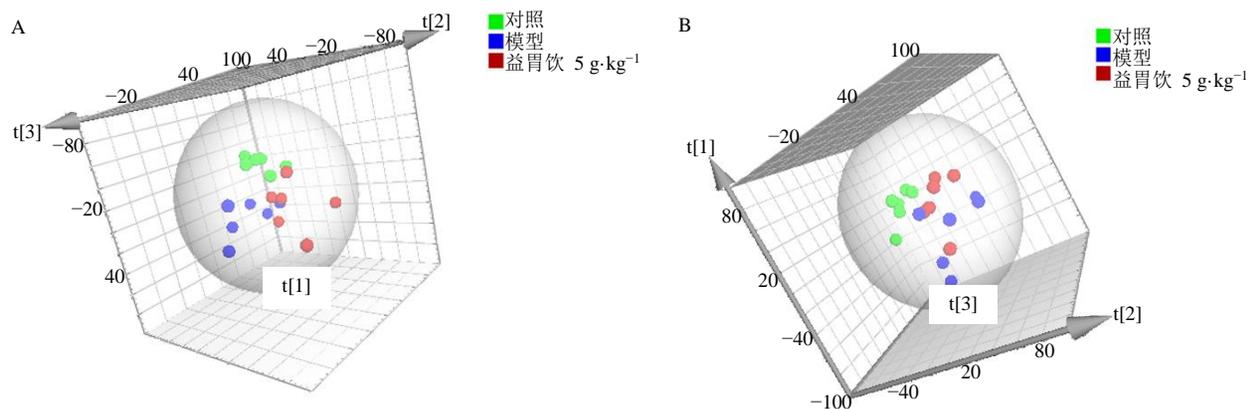


图 5 负离子模式 (A) 和正离子模式 (B) 下各组样本 PCA 得分图

Fig. 5 PCA scores of each group in negative ion mode (A) and positive ion mode (B)

采用 OPLS-DA 分析对照组和模型组样本，建立两者代谢物表达量与样品类别之间的关系模型。筛选 VIP>1 的离子，作为可以显著区分两组样本的潜在生物标记物。 R^2X 表示模型解释率， Q_2 表示模型预测能力。如图 6-A 和 6-C 所示，在对照组和模型组的 OPLS-DA 模型中，负离子模式下 R^2X 为 0.262、 R^2Y 为 0.879、 Q_2 为 0.604；正离子模式下 R^2X 为 0.266、 R^2Y 为 0.871、 Q_2 为 0.548，表明模型解释能力和预测能力较好。利用 7 折交叉验证对对照组和模型组样本的 OPLS-DA 建模结果进行质量验证，如图 6-B 和 6-D 所示，负离子模式下 R^2Y 为 0.678， Q_2 为 -0.12；正离子模式下 R^2Y 为 0.763， Q_2 为 -0.197，说明模型稳定。

3.3.5 代谢物鉴定与表征 如表 1、2 所示，负离子模式下共鉴定代谢物 9 个，正离子模式下共鉴定代谢物 16 个。如图 7 所示，与对照组大鼠相比，模型组大鼠血清中有 20 个代谢物显著上升，3 个代谢物显著下降；与模型组比较，益胃饮可显著回调其中的 13 个代谢物趋于正常水平，包括 22-羟基二十二碳六烯酸酯、焦谷氨酸、(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-二

十二碳六烯酸、L-亮氨酸、二十碳五烯酸、神经鞘氨醇、花生四烯酸、11 β -羟孕酮、鞘氨醇、前列腺素 E2、N-甲酰基甘氨酸、20 α -羟基-4-孕烯-3-酮、17 α ,21-二羟基孕烯醇酮。

3.3.6 代谢通路及网络分析 将上述筛选得到的差异代谢物输入 Metaboanalyst 4.0 网站进行代谢通路分析，得到益胃饮干预 GPL 所涉及的相关代谢通路，如图 8 所示，主要涉及不饱和脂肪酸的生物合成，缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成，鞘脂代谢，花生四烯酸代谢和类固醇激素合成代谢等代谢途径。

3.4 IPA 分析

将益胃饮显著回调的 13 个差异代谢物及其属性、相应变量导入 IPA 软件进行生物途径分析，结果如图 9 所示，13 个差异代谢物中有 5 个 (20 α -羟基-4-孕-3-酮、L-亮氨酸、鞘氨醇、前列腺素 E2、花生四烯酸) 被纳入构建分析预测网络，益胃饮干预 GPL 涉及 ET-1、IL-8 信号传导和组织因子在癌症中的作用等途径，指示益胃饮干预 GPL 与抑制 ET-1、IL-8 信号传导密切相关。

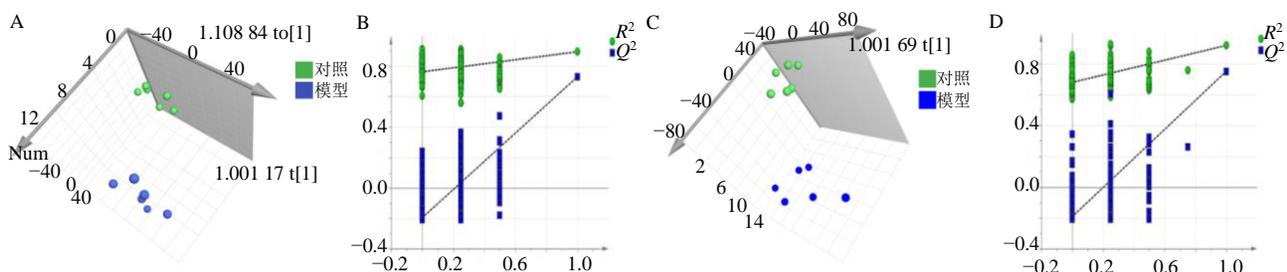


图 6 对照组样本和模型组样本负离子模式下的 OPLS-DA (A) 得分图和 permutation 检验图 (B)，正离子模式下的 OPLS-DA 得分图 (C) 和 permutation 检验图 (D)

Fig. 6 OPLS-DA score (A) and permutation test (B) of control group and model group in negative ion mode and OPLS-DA score (C) and permutation test (D) in positive ion mode

表 1 负离子模式下对照组与模型组的差异代谢物

Table 1 Different metabolites between control group and model group in negative ion mode

编号	名称	<i>t</i> _R /min	<i>m/z</i>	<i>P</i> 值	VIP	FC(CM)	离子模式	化学式	KEGG 编号	鉴定	趋势
1	22-羟基二十二碳六烯酸酯	15.94	343.227 2	0.000 393	2.497 28	0.319 46	[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₃₂ O ₃	C20855	HMDB	↑**
2	脱氧胆酸	12.19	391.284 9	0.002 237	2.086 78	0.365 19	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	C04483	Standard	↑**
3	3 α ,12 α -二羟基-5 β -胆固醇-6-烯酸酯	12.60	389.270 1	0.003 662	2.191 82	0.334 48	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	C11637	HMDB	↑**
4	甘氨酸脱氧胆酸	11.14	448.307 2	0.008 414	2.319 28	0.265 64	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	C05466	Standard	↑**
5	牛磺胆酸	11.39	482.295 3	0.010 646	2.357 13	0.223 91	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₄₅ NO ₅ S	C02592	Standard	↑*
6	焦谷氨酸	0.99	128.035 0	0.010 994	1.540 96	0.551 20	[M-H] ⁻	C ₅ H ₇ NO ₃	C01879	HMDB	↑**
7	胆酸	12.59	407.279 7	0.011 063	2.011 45	0.403 15	[M-H] ⁻	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	C00695	Standard	↑*
8	甘氨酸脱氧胆酸-7-硫酸盐	10.39	528.263 4	0.020 995	2.329 05	0.315 33	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₄₃ NO ₈ S	C15559	HMDB	↑*
9	甘氨酸胆酸盐	10.51	448.306 3	0.025 448	3.110 43	0.144 89	[M-H] ⁻	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	C05464	Standard	↑**

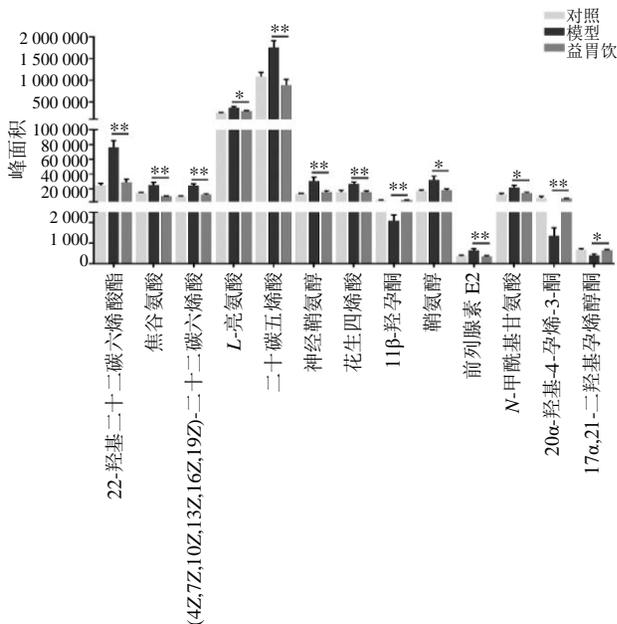
与对照组比较，↑表示升高，↓表示下降，下表同

Compared with control group, ↑ denotes higher than, ↓ denotes lower than, same as below

表 2 正离子模式下对照组与模型组的差异代谢物

Table 2 Different metabolites between control group and model group in positive ion mode

编号	名称	tr/min	m/z	P 值	VIP	FC(C/M)	离子模式	化学式	KEGG 编号	鉴定	趋势
1	(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)- 二十二碳六烯酸	16.36	329.247 6	0.000 394	2.136 22	0.399 97	[M+H] ⁺	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	C06429	HMDB	↑**
2	L-亮氨酸	1.10	132.101 0	0.000 833	1.497 14	0.653 51	[M+H] ⁺	C ₆ H ₁₃ NO ₂	C00123	Standard	↑*
3	二十碳五烯酸	16.09	303.231 0	0.003 422	1.321 45	0.616 56	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	C06428	HMDB	↑**
4	神经鞘氨醇	13.74	302.305 1	0.009 358	1.933 62	0.418 77	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	C00836	HMDB	↑**
5	2-喹啉羧酸	4.68	174.054 9	0.011 475	1.963 66	0.427 03	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₇ NO ₂	C06325	HMDB	↑**
6	花生四烯酸	16.53	305.247 6	0.012 297	1.509 96	0.593 71	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	C00219	HMDB	↑*
7	11β-羟孕酮	9.70	331.226 7	0.013 407	1.316 58	2.044 50	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	C05498	HMDB	↓**
8	L-苯丙氨酸	2.08	166.085 5	0.014 175	1.722 98	0.506 67	[M+H] ⁺	C ₉ H ₁₁ NO ₂	C00079	Standard	↑**
9	鞘氨醇	13.36	300.289 2	0.015 923	1.606 30	0.523 10	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	C00319	HMDB	↑*
10	前列腺素 E2	12.64	375.215 4	0.016 202	1.469 92	0.563 90	[M+Na] ⁺	C ₂₀ H ₃₂ O ₅	C00584	HMDB	↑*
11	N-甲酰基甘氨酸	2.08	103.053 7	0.017 943	1.622 50	0.550 08	[M+H] ⁺	C ₃ H ₆ N ₂ O ₂	C02718	HMDB	↑*
12	甘氨酸脱氧胆酸盐	10.54	450.322 0	0.019 578	3.036 12	0.127 93	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₄₃ NO ₅	C05464	Standard	↑**
13	牛磺胆酸	11.44	484.309 8	0.020 334	1.763 72	0.396 44	[M+H] ⁺	C ₂₆ H ₄₅ NO ₅ S	C02592	Standard	↑*
14	20α-羟基-4-孕烯-3-酮	13.48	317.247 3	0.021 020	2.494 88	5.617 10	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	C04042	HMDB	↓**
15	17α,21-二羟基孕烯醇酮	11.27	349.237 7	0.021 639	1.197 75	1.641 40	[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	C05487	HMDB	↓*
16	酪胺	2.23	160.075 2	0.022 229	1.509 03	0.637 16	[M+Na] ⁺	C ₈ H ₁₁ NO	C00483	HMDB	↑**



与模型组比较, *P<0.05 **P<0.01
*P < 0.05 **P < 0.01 vs model group

图 7 各组样本差异代谢物的相对峰面积

Fig. 7 Relative peak area of different metabolites in each group

3.5 ET-1 和 IL-8 含量测定

如表 3 所示, 与对照组相比, 模型组大鼠血清中 ET-1、IL-8 水平明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 益胃饮低剂量组能够显著降低大鼠血清中 ET-1 和 IL-8 水平 ($P < 0.01$ 、 0.05), 益胃饮高剂量组只降低大鼠血清中 ET-1 水平 ($P < 0.05$), 对 IL-8 水平无显著影响, 表明益胃饮低剂量组可显著抑制 GPL 大鼠 ET-1、IL-8 的高表达, 改善炎症环境。

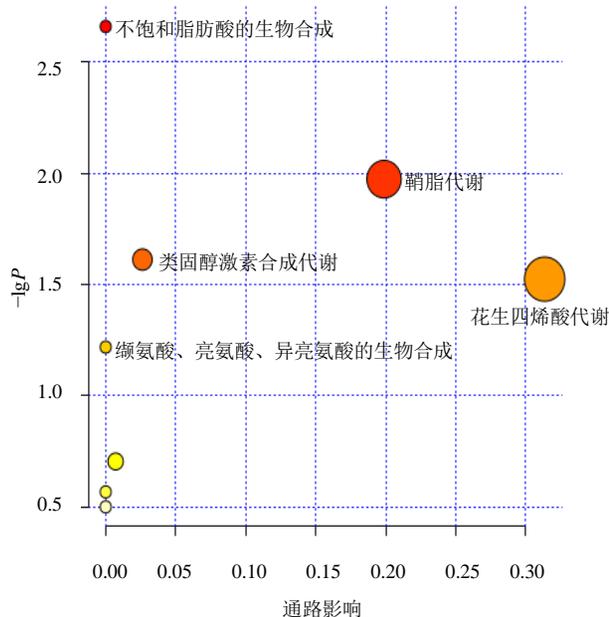
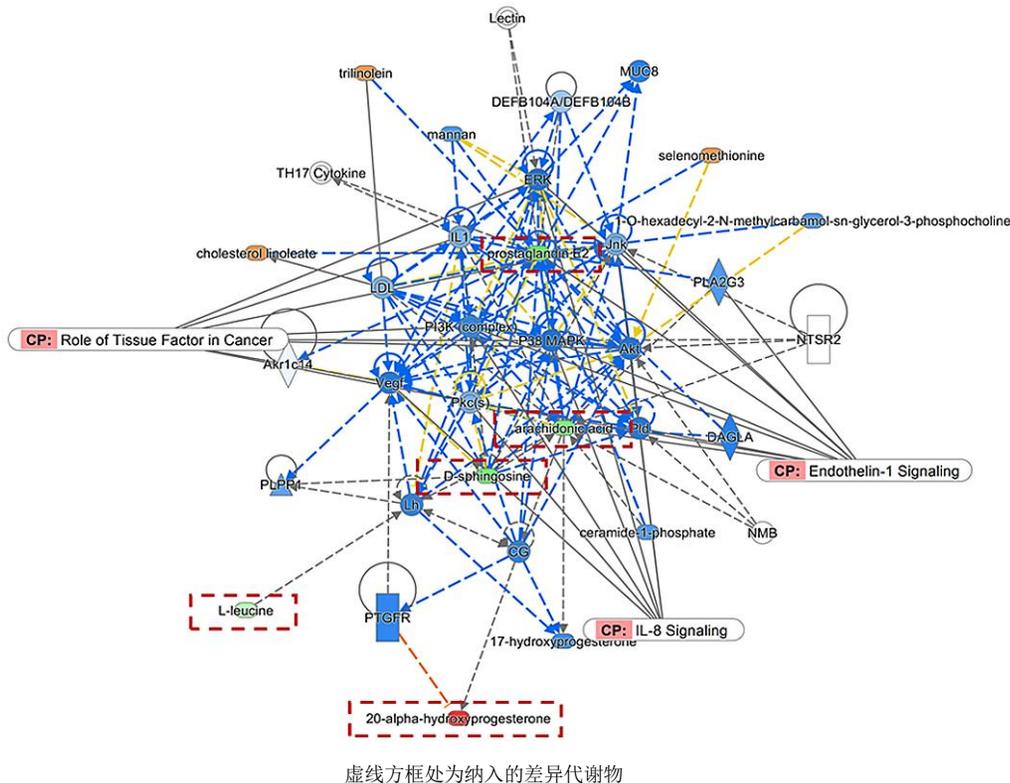


图 8 益胃饮干预 GPL 的代谢通路示意图

Fig. 8 Metabolic pathway diagram of Yiwei Decoction intervening GPL

4 讨论

胃癌的发病率和死亡率位居恶性肿瘤前列^[10]。GPL 是胃癌炎癌转化的重要阶段, 其炎症进展与胃癌的发生密切相关。据不完全统计, 慢性炎症导致全世界约 20% 恶性肿瘤的发生, 炎癌转化机制研究备受科研学者关注^[11]。目前, 慢性炎症参与肿瘤发生的病理机制多样, 炎性微环境为研究热点^[12]。研究表明, 在肝癌、胃癌、结肠癌等多种消化系统肿瘤



The involved different metabolites showed in the dotted line box

图 9 益胃饮干预 GPL 的网络靶点分析预测图

Fig. 9 Network target analysis and prediction map of Yiwei Decoction intervening GPL

表 3 益胃饮对 GPL 模型大鼠血清中 ET-1 和 IL-8 水平的影 响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Yiwei Decoction on levels of ET-1 and IL-8 in serum of GPL model rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	ET-1/(ng·L ⁻¹)	IL-8/(ng·L ⁻¹)
对照	—	98 ± 12	0.317 ± 0.046
模型	—	289 ± 37**	0.576 ± 0.071**
益胃饮	5	168 ± 21##	0.442 ± 0.029#
	20	203 ± 29#	0.513 ± 0.082

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

瘤发生进程中, 炎症引起的氧化应激反应起到了促进作用^[13]。花生四烯酸及其衍生物是一类重要的调控炎症的介质, 可经多条途径加重机体氧化应激和炎症反应^[14]。环氧酶 2 (COX-2) 是花生四烯酸代谢成前列腺素 E2 (PGE2) 的关键酶。研究表明 COX-2 在胃癌患者中普遍高表达, 可抑制细胞凋亡, 并且与肿瘤侵袭与转移密切相关^[15]。COX-2 的代谢产物 PGE2 是强促炎因子, 介导靶细胞膜受体 EP 和 JAK/STAT 信号通路等途径的激活, 从而影响肿瘤干细胞生长, 促进癌症的发生发展^[16]。本研究通过代谢组学发现, MNNG 诱导的 GPL 模

型大鼠血清中花生四烯酸、PGE2 等水平显著增加, 反映了 GPL 组织中的炎症反应。益胃饮可显著回调花生四烯酸、PGE2 水平, 证实益胃饮对胃组织炎症有干预作用, 表明益胃饮可以通过抑制炎症改善肿瘤炎性微环境, 从而延缓胃癌的病变。

为进一步探究益胃饮的作用机制, 本研究采用 IPA 建立生物分子相互作用网络, 结果表明益胃饮干预 GPL 主要涉及 ET-1、IL-8 信号传导和组织因子在癌症中的作用等途径。ET 是由 21 种氨基酸残基组成的具有血管活性的多肽, 在多种恶性肿瘤中均高表达, 其中以 ET-1 生理作用最强^[17]。ET-1 主要作用于周围淋巴结, 促使淋巴管生成, 并促进恶性肿瘤新生血管形成, 为肿瘤的侵袭、转移提供重要基础^[18]。研究表明, 胃癌中 ET-1 蛋白表达较癌旁组织明显升高, 且与胃癌的发生、发展、转移有关^[19]。ELISA 检测结果证实益胃饮可显著降低 GPL 模型大鼠血清中 ET-1 水平, 提示该途径可能是益胃饮干预 GPL 进程的关键靶点之一。

IPA 分析提示益胃饮的作用机制可能与调控 IL-8 密切相关。IL-8 又称为趋化因子 CXCL8, 是 CXC 促炎趋化因子家族成员之一, 是一种重要的促

炎因子和免疫抑制因子^[20]。IL-8 可促进肿瘤细胞增殖, 还可通过自分泌诱导癌细胞获得间充质表型, 致使肿瘤微环境免疫调节的紊乱, 加剧异型细胞免疫逃逸^[21]。高表达的 IL-8 可在一定程度上抑制肿瘤免疫应答, 促进肿瘤进展, 与胃癌患者生存期呈负相关, 是潜在的预测胃癌预后的关键指标, 具有一定临床应用价值^[20,22]。本研究结果显示, 益胃饮可显著降低 GPL 模型大鼠血清中 IL-8 水平, 提示 IL-8 介导的调节肿瘤免疫微环境途径可能是益胃饮干预 GPL 的关键靶点之一。

本研究在明确益胃饮可干预 GPL 的基础上, 采用 UPLC-Q-TOF/MS 表征大鼠血清代谢物, 发现 13 个与益胃饮干预 GPL 作用相关的潜在标志物, 涉及不饱和脂肪酸的生物合成, 缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸的生物合成, 鞘脂代谢, 花生四烯酸代谢和类固醇激素合成代谢等代谢途径, 提示益胃饮可逆转机体花生四烯酸-PGE2 炎症通路, 改善肿瘤炎症微环境, 发挥干预 GPL 作用。进一步结合 IPA 分析和 ELISA 验证, 表明益胃饮干预 GPL 与抑制机体 ET-1、IL-8 信号途径密切相关, 可通过抑制肿瘤细胞的增殖、分化和转移, 并改变免疫肿瘤微环境, 从而干预 GPL。本研究表明益胃饮可多层次、多途径抑制 GPL 进展, 体现了中药复方多靶点、多环节调控特点, 为后续深入探讨益胃饮防治 GPL 的作用机制提供研究基础, 为益胃饮的临床应用提供科学依据。

参考文献

[1] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA: A Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.

[2] 陈凡. 慢性萎缩性胃炎伴异型增生的治疗进展 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(6): 346-348.

[3] Rokkas T, Rokka A, Portincasa P. A systematic review and meta-analysis of the role of *Helicobacter pylori* eradication in preventing gastric cancer [J]. *Ann Gastroenterol*, 2017, 30(4): 414-423.

[4] 孙心, 陈涤平. 胃癌前病变的干预及中医药治疗 [J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(2): 289-293.

[5] 薛骞, 柴可群, 周永列, 等. 益胃饮含药血清对胃癌细胞 MFC 增殖凋亡及 NR4A3/HGF 表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(6): 1326-1331.

[6] 薛骞, 柴可群, 何徐军, 等. 益胃饮含药血清对胃癌细胞体外迁移与侵袭能力及肝细胞生长因子表达的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(3): 290-294.

[7] 柴可群, 薛骞, 何徐军, 等. 益胃饮对小鼠移植性前

胃癌术后复发转移及 MMP-9、BCL-2、VEGF 的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(9): 2444-2448.

- [8] Wang M, Chen L, Liu D, *et al.* Metabolomics highlights pharmacological bioactivity and biochemical mechanism of traditional Chinese medicine [J]. *Chem-Biol Interact*, 2017, 273: 133-141.
- [9] Wang X J, Zhang A H, Sun H, *et al.* Chinmedomics: Newer theory and application [J]. *Chin Herb Med*, 2016, 8(4): 299-307.
- [10] Hou Q, Tan H T, Lim K H, *et al.* Identification and functional validation of caldesmon as a potential gastric cancer metastasis-associated protein [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12(2): 980-990.
- [11] Ritter B, Greten F R. Modulating inflammation for cancer therapy [J]. *J Exp Med*, 2019, 216(6): 1234-1243.
- [12] Berraondo P, Minute L, Ajona D, *et al.* Innate immune mediators in cancer: Between defense and resistance [J]. *Immunol Rev*, 2016, 274(1): 290-306.
- [13] Cabillic F, Corlu A. Regulation of transdifferentiation and retrodifferentiation by inflammatory cytokines in hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(4): 607-615.
- [14] Leuti A, Maccarrone M, Chiurchiù V. Proresolving lipid mediators: Endogenous modulators of oxidative stress [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8107265.
- [15] 韩黎丽, 陈小兵, 吕慧芳, 等. 环氧化酶-2 对人胃癌细胞 SGC-7901 迁移能力及上皮钙粘素表达的影响 [J]. 中国临床医生杂志, 2018, 46(4): 444-446.
- [16] 张翹腾, 王毅. COX2-PGE2 调节肿瘤的发生和发展机制研究进展 [J]. 西南军医, 2018, 20(1): 50-53.
- [17] Olender J, Nowakowska-Zajdel E, Walkiewicz K, *et al.* Endothelins and carcinogenesis [J]. *Postep Hig Med Dosw*, 2016, 70: 872-880.
- [18] Rosanò L, Cianfrocca R, Sestito R, *et al.* Targeting endothelin-1 receptor/ β -arrestin1 network for the treatment of ovarian cancer [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2017, 21(10): 925-932.
- [19] 刘嘉庆, 张大伟, 李光. 胃癌组织内皮素-1 和 P53 表达及其临床意义 [J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(6): 1170-1172.
- [20] Alfaro C, Sanmamed M F, Rodríguez-Ruiz M E, *et al.* Interleukin-8 in cancer pathogenesis, treatment and follow-up [J]. *Cancer Treat Rev*, 2017, 60: 24-31.
- [21] David J M, Dominguez C, Hamilton D H, *et al.* The IL-8/IL-8R axis: A double agent in tumor immune resistance [J]. *Vaccines*, 2016, 4(3): 22.
- [22] 彭春伟, 刘广杰, 余昌俊. 胃癌患者血清 IL-6、IL-8、TNF- α 表达水平及其临床意义分析 [J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2019, 11(7): 125-129.