

·基础研究·

本文引用:贺佐梅,夏帅帅,邵峰,吴华英,吴正治,谢梦洲.基于 iTRAQ 标记技术研究慢性浅表性胃炎脾虚证的唾液差异表达蛋白[J].湖南中医药大学学报,2017,37(8):813-818.

## 基于 iTRAQ 标记技术研究慢性浅表性胃炎脾虚证的唾液差异表达蛋白

贺佐梅<sup>1</sup>,夏帅帅<sup>1</sup>,邵峰<sup>1</sup>,吴华英<sup>1</sup>,吴正治<sup>2\*</sup>,谢梦洲<sup>1\*</sup>

(1.湖南中医药大学中医诊断研究所,湖南长沙 410208;2.广东医学院附属福田医院,广东深圳 518033;

3.湖南省 2011 数字中医药协同创新中心,湖南长沙 410208)

**[摘要]** 目的 运用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术筛选慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)不同中医证候患者唾液中的潜在特异性生物标志物,探索一种客观化、规范化的中医辨证方法。方法 采用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术及后期生物信息学方法,筛选 CSG 脾虚证 28 例与 CSG 湿热证 28 例对比以及与正常对照组 28 例对比的唾液差异蛋白质分析。结果 CSG 脾虚证对比 CSG 湿热证,Ratio $\geq 1.5$  的共有 128 个蛋白,Ratio $\leq 0.667$  的共有 39 个蛋白;CSG 脾虚证对比正常对照组 Ratio $\geq 1.5$  的共有 113 个蛋白,Ratio $\leq 0.667$  的共有 72 个蛋白。筛选出多个重要蛋白,如 Keratin 家族、ANX 家族和 apolipoprotein 家族中的多种亚型以及  $\gamma$ -谷氨酸转移酶等,可能与 CSG 不同中医证候的发生、发展有密切的关系。结论 iTRAQ 唾液蛋白质组学技术筛选出了多个具有潜在价值的 CSG 中医证候无创诊断的重要蛋白,值得进一步深入研究。

**[关键词]** 慢性浅表性胃炎;中医证候;脾虚证;湿热证;分子诊断;唾液;定量蛋白质组学;iTRAQ

**[中图分类号]** R285.5;R573.3<sup>+</sup>1;R393

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.08.001

### Research of Saliva Differential Expressed Proteins in Chronic Superficial Gastritis with Spleen Deficiency Syndrome Based on ITRAQ Labeling

HE Zuomei<sup>1</sup>, XIA Shuashuai<sup>1</sup>, SHAO Feng<sup>1</sup>, WU Huaying<sup>1</sup>, WU Zhengzhi<sup>2\*</sup>, XIE Mengzhou<sup>1\*</sup>

(1. Diagnostic Research Institute of TCM, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Futian Affiliated Hospital of Guangdong Medical Institute, Shenzhen, Guangdong, 518033, China; 3. 2011 Collaborative

Innovation Center of Digital Chinese Medicine of Colleges and Universities in Hunan Province, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To screen the potential specific biomarker in saliva of chronic superficial gastritis (CSG) with different TCM syndromes by iTRAQ quantitative proteomics, and to explore the objective and standard TCM syndromes differentiation methods. **Methods** Saliva samples were taken from 28 cases of CSG patients with spleen deficiency syndrome (group A), 28 cases of CSG patients with damp-heat syndrome (group B) and 28 cases of normal control volunteers (group C), in which differential expressed proteins were analyzed by iTRAQ quantitative proteomics and bioinformatics methods. **Results** 1. In the comparison between group A and group B, it screened out 128 up-regulated proteins (ratio $\geq 1.5$ ) and 39 down-regulated proteins (ratio $\leq 0.667$ ). 2. In the comparison between group B and group C, it screened out 113 up-regulated proteins (ratio $\geq 1.5$ ) and 72 down-regulated proteins (ratio $\leq 0.667$ ). 3. This study screened out a large number of differential expression proteins in saliva, including various subtypes in Keratin family, ANX family, apolipoprotein family, and  $\gamma$ -glutamyltransferase, which may be related to the occurrence and development of different syndromes of CSG. **Conclusion** The multiple poten-

**[收稿日期]** 2017-01-03

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81273665);湖南中医药大学中医诊断国家重点学科开放基金项目(2015ZYZD09);湖南省 2011 数字中医药协同创新中心。

**[作者简介]** 贺佐梅,女,博士研究生在读,主要从事中医诊断学研究。

**[通讯作者]** \* 吴正治,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:szwz001@163.com;谢梦洲,女,博士,教授,E-mail:xiezm64@163.com。

tial molecular biomarkers in saliva to diagnose CSG with different TCM syndromes were screened by iTRAQ quantitative proteomic technology, which is worthy of further study.

[**Keywords**] chronic superficial gastritis; TCM syndromes; spleen deficiency syndrome; damp-heat syndrome; molecular diagnosis; saliva; quantitative proteomics; iTRAQ

中医药对于慢性胃炎的治疗有独特的优势,但是往往难于准确把握证型。本文采用现代系统生物学方法——同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)定量蛋白质组学技术研究慢性胃炎证型<sup>[1]</sup>,以慢性浅表性胃炎(chronic superficial gastritis, CSG)为代表,进行胃炎中医辨证客观化、规范化的初步探索。CSG病因有虚实二因,本研究选取虚证(以脾胃气虚证为代表)、实证(以湿热蕴脾证为代表)CSG患者的唾液标本进行研究。

本研究是基于 iTRAQ 及液相-质谱/质谱联用(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS),主要目的是定量检测 CSG 脾虚证与湿热证以及正常对照组的差异唾液蛋白表达情况,同时为进一步筛选与 CSG 中医证候相关的蛋白质或蛋白质组提供研究参考,从蛋白水平研究中中医证候的本质。

## 1 资料与标准

### 1.1 病例选择

1.1.1 CSG 诊断标准 CSG 的诊断依据《内科学》的诊断标准<sup>[2]</sup>。CSG 缺乏临床上的特异性症状和体征,其确诊主要依赖理化检查,如内镜检查和胃黏膜活检的组织学。(1)内镜的诊断依据:浅表性胃炎内镜可见黏膜出现红斑(点、条状、片状),粗糙不平或伴出血点或斑;(2)病理活检的诊断依据:炎性细胞浸润局限在胃小凹和黏膜的固有层表面,淋巴细胞和浆细胞是主要的炎性细胞,而腺体完整无损。幽门螺旋杆菌(HP)感染时主要是活动性炎症,其中以中性粒细胞浸润为主。

1.1.2 中医证型诊断标准 根据中华人民共和国国家标准《中医临床诊疗术语》所列的证候诊断标准(1997年),为了使辨证更具客观性,尽可能减少人为因素干扰,本研究以证素辨证为基础,运用“中医智能(辅助)诊疗系统”(“WF-Ⅲ中医辅助诊疗系统”升级版),提取证素,进行辨证。(1)脾虚证诊断标准:脾虚证包括脾气虚证与脾阳虚证。脾气虚证临床表现<sup>[3]</sup>:腹胀纳少,食后胀甚,大便溏薄,肢体倦怠,神疲乏力,少气懒言,形体消瘦,面色萎黄,或见

肥胖、浮肿,舌淡苔白,脉缓弱;脾阳虚证临床表现<sup>[3]</sup>:纳少腹胀,腹痛绵绵,喜温喜按,形寒气怯,四肢不温,面白无华或虚浮,口淡不渴,大便稀溏,或见肢体浮肿,小便短少,或见带下量多而清稀色白,舌质淡胖或有齿痕,苔白滑,脉沉迟无力等;(2)湿热蕴脾证诊断标准:湿热蕴脾证临床表现<sup>[4]</sup>:脘腹痞闷,纳呆呕恶,大便溏泄而不爽,肢体困重,渴不多饮,身热不扬,汗出不解,或身目鲜黄,或皮肤发痒,舌质红,苔黄腻,脉濡数。

1.1.3 纳入标准 (1)符合诊断标准,年龄在 20~75 岁之间;(2)未经治疗;(3)自愿且能够配合参加的受试对象。以上 3 项必须全部符合才能纳入。

1.1.4 排除标准 (1)不符合上述诊断标准者;(2)年龄 <20 岁或 >75 岁者;(3)患有口腔局部及唾液腺的炎症、消化道溃疡、肿瘤及先天性疾病;患有舍格伦综合征、囊性纤维病;患有其他系统严重并发疾病。

1.1.5 质量控制 (1)采用统一诊断标准、统一调查表格、统一调查方法;(2)调查者在调查时严格按照标准执行,减少调查者偏倚,确保资料的一致性和真实性;(3)电子胃镜及病理结果均由 1 月内三级甲等医院诊断。

### 1.2 一般资料

本研究自 2014 年 12 月-2015 年 06 月共收集符合诊断和纳入标准的 CSG 脾虚证和湿热证患者各 28 例,全部病例来源于湖南中医药大学第一附属医院脾胃病科,均经胃镜检查确诊,采集患者入院第二天清晨的唾液。

CSG 脾虚证 28 例,其中男 12 例,女 16 例,年龄 25~68 岁,中位年龄 55 岁;CSG 湿热证 28 例,男 13 例,女 15 例,年龄 27~67 岁,中位年龄 54 岁;正常对照组 28 例,其中男 18 例,女 10 例;年龄 23~68 岁,中位年龄 54 岁,均来自于湖南中医药大学附属第一医院体检科健康自愿者。该研究方案符合人体试验伦理学标准,并得到伦理委员会的批准,受试者在受试前已知情,并签署知情同意书。

## 2 方法

### 2.1 样品收集

受试者取材前一天晚上临睡前清水漱口 3 次

(不再进任何食物和药物),采用非刺激性唾液采集方式,第二天晨起后漱口前空腹取材。由经过培训的课题组专人取材,前5 min内的唾液自然吞下后开始收集,患者将已经消毒的无菌小圆柱形棉花含入口中,口腔唾液积聚至一定量后,将该棉花吐入置于冰浴中的10 mL唾液离心管内。

样品预处理:4 ℃下3 000 r/min离心5 min,收集上清液,冰浴上分装在15 mL EP管中,每管300  $\mu$ L,加入(1/100)的蛋白酶抑制剂3  $\mu$ L,于-80 ℃冰箱冷冻保存。实验时取出样本,冰浴解冻。

## 2.2 唾液蛋白提取、酶解与 iTRAQ 标记

在每个样品用10 kd超滤管浓缩后加入适量的裂解液,涡旋混匀,室温提取30 min,40 000 g离心1 h取上清,采用Bradford方法对蛋白样品进行定量。取100  $\mu$ g蛋白/样溶液置于离心管中;加入2  $\mu$ L Reducing Reagent,60 ℃反应1 h;加入1  $\mu$ L Cysteine-Blocking Reagent,室温10 min;将还原烷基化后的蛋白溶液加入10 kd的超滤管中离心20 min,弃掉收集管底部溶液。加入iTRAQ试剂盒中的Dissolution Buffer 100  $\mu$ L,更换新的收集管,在超滤管中加入胰蛋白酶,37 ℃反应过夜。次日,离心20 min,酶解消化后的肽段溶液离心于收集管底部。在超滤管中加入50  $\mu$ L Dissolution Buffer再次离心20 min,与上步合并。

向每管iTRAQ<sup>®</sup>试剂中加入70  $\mu$ L异丙醇,涡旋振荡,离心至管底。将同一组所有的样品先各自等体积混合,再将CSG脾虚证组和CSG湿热证组等各等体积均分为两组,取100  $\mu$ g酶解产物,将iTRAQ试剂添加到样品中,各组的标记情况为:CSG脾虚证组1标记为114,CSG脾虚证组2标记为119,CSG湿热证组1标记为115,CSG湿热证组2标记为121,正常对照组标记为113。因此,CSG脾虚证与CSG湿热证之间便有4组重复试验,即114/115,114/121,119/115,119/121;CSG脾虚证与正常对照组共进行了2组重复对比试验,即114/113,119/113。多组重复试验可减少实验误差。涡旋振荡,离心至管底,室温反应2 h。加入100  $\mu$ L水终止反应。

## 2.3 LC-MS/MS 鉴定和数据分析

混合标记后的样品用100  $\mu$ L流动相溶解,14 000 g离心20 min,取上清液待用。取100  $\mu$ L准备好的样本上样。iTRAQ的质谱分析是由Thermo-Q Exactive型质谱完成,产生的质谱原始文件采用Thermo公司的配套商用软件Proteome Discoverer 1.3处理。

## 2.4 生物信息学分析

质谱原始文件采用Thermo公司的配套商用软件Proteome Discoverer 1.3处理。根据原始数据选取,差异倍数 $\geq 1.5$ 或差异倍数 $\leq 0.67$ ,所得结果进入分析。通过Uniprot数据库功能注释及文献调研筛选CSG相关蛋白,运用DAVID软件从生物过程、细胞成分、分子功能注释对蛋白进行分类,选择KEGG数据库对蛋白所涉及的通路进行分类和富集分析。

## 2.5 差异蛋白定量信息统计

根据原始数据的P-value,选取 $P \leq 0.05$ 进行过滤后,几组对比实验的均值差异倍数 $\geq 1.5$ 或差异倍数 $\leq 0.667$ ,所得结果进入分析。

# 3 结果

## 3.1 CSG脾虚证与CSG湿热证对比

CSG脾虚证对比CSG湿热证共进行四组实验重复(114/115,114/121,119/115,119/121),共筛查到1 195个蛋白,所有蛋白在4组均有表达。取四组均值,ratio $\geq 1.5$ ,共128个;Ratio $\leq 0.667$ ,共39个。

## 3.2 CSG脾虚证与正常对照组对比

CSG脾虚与正常组对比共进行两组对比实验(114/113,119/113),共得到1 197个蛋白,其中1个蛋白只在一组有表达。其余1 196个蛋白在两组对比试验中都有表达。满足两组均值结果ratio $\geq 1.5$ 或者ratio $\leq 0.667$ ,共得到185个蛋白,其中ratio $\geq 1.5$ 的共113个蛋白,ratio $\leq 0.667$ 共72个蛋白。

# 4 数据的生物信息解析

数据的后期挖掘是阐释实验信息和挖掘潜在的有价值蛋白质的重要环节,因此在分析中主要参考了目前公认的可信度较高的GO(Gene Ontology)数据库,详细信息见网站:<http://www.geneontology.org>。分析数据为之前研究团队得到存在差异表达的蛋白质以及差异定量信息。

通过生物信息学分析工具DAVID对鉴定蛋白进行GO功能注释、功能富集分析及定位分析。蛋白质的GO功能注释包括三个方面内容:蛋白质参与的生物学过程(biological process,BP)、蛋白质具有的分子功能(molecular function,MF)以及蛋白质所属的细胞组分(cellular component,CC),在此主要讨论差异蛋白所参与的生物学过程。蛋白质所属的细胞组分亦即蛋白质的亚细胞定位。

#### 4.1 CSG 脾虚证与湿热证对比

4.1.1 上调蛋白 Ratio  $\geq 1.5$  的共有 128 个蛋白,GO 数据库可识别(Mapped)75 个,不可识别(Unmapped)53 个。有分类信息的 69 个,无分类信息的 6 个,92.0%的蛋白质拥有 BP 注释信息;将上调蛋白 ID 导入 PANTHER 系统,得出 CSG 脾虚证与 CSG 湿热证对比,上调蛋白 BP 各分类组成。这些蛋白主要参与代谢、发育、细胞进程、组织或生物起源细胞组件、定位、免疫、应激反应等生物学过程。

4.1.2 下调蛋白 Ratio  $\leq 0.667$  的共有 39 个蛋白,

GO 数据库可识别 (Mapped)19 个,不可识别(Unmapped)20 个。有分类信息的 18 个,无分类信息的 1 个,94.7%的蛋白质拥有 BP 注释信息;将下调蛋白 ID 导入 PANTHER 系统,得出 CSG 脾虚证 VS CSG 湿热证下调蛋白 BP 各分类组成。这些蛋白主要参与细胞进程、代谢、生物调节、发育、定位、多细胞生物过程、免疫等生物学过程。

4.1.3 CSG 脾虚证与湿热证对比差异蛋白参与的相关通路 CSG 脾虚证与 CSG 湿热证对比差异蛋白参与的相关通路见表 1。

表 1 CSG 脾虚证与 CSG 湿热证对比差异蛋白参与的相关通路

通路	富集倍数	P 值
Pyruvate metabolism (P02772)	> 5	1.00E+00
ATP synthesis (P02721)	> 5	1.00E+00
De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis (P02739)	> 5	1.00E+00
De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis (P02740)	> 5	1.00E+00
Glycolysis (P00024)	> 5	1.00E+00
Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	> 5	3.65E-01
FAS signaling pathway (P00020)	> 5	1.00E+00
De novo purine biosynthesis (P02738)	> 5	1.00E+00

#### 4.2 CSG 脾虚证与正常对照组对比

4.2.1 上调蛋白 Ratio  $\geq 1.5$  的共有 113 个蛋白,GO 数据库可识别(Mapped)60 个,不可识别(Unmapped)53 个。有分类信息的 55 个,无分类信息的 5 个,91.7%的蛋白质拥有 BP 注释信息;将上调蛋白 ID 导入 PANTHER 系统,得出胃炎虚证与正常对照组对比上调蛋白 BP 各分类组成。这些蛋白主要参与代谢、发育、细胞进程、定位、组织或生物起源细胞组件、应激反应等生物学过程。

4.2.2 下调蛋白 Ratio  $\leq 0.667$  的共有 72 个蛋白,GO 数据库可识别(Mapped)35 个,不可识别(Unmapped)37 个。有分类信息的 31 个,无分类信息的 4 个,88.6%的蛋白质拥有 BP 注释信息;将下调蛋白 ID 导入 PANTHER 系统,得出 CSG 脾虚证 VS 正常对照组对比,下调蛋白 BP 各分类组成。这些蛋白主要参与细胞进程、代谢、生物调节、发育、定位、生物附着、免疫等生物学过程。

4.2.3 CSG 脾虚证与正常对照组对比差异蛋白参与的相关通路 CSG 脾虚证与正常对照组对比差异蛋白参与的相关通路见表 2。

tio  $\leq 0.667$ ) 在 pubmed 数据库中一一进行检索,在此讨论文献记录较多的几个候选蛋白(完整的实验设计包括了 CSG 湿热证组与正常对照组的对比,并且实际的实验也完成了该部分的内容,但由于数据太多,所以该论文并未纳入该部分内容)。

角蛋白(Cytokeratin,CK)家族 CK 异常表达与 HP 感染、非甾体抗炎药物导致的胃损伤密切相关。Todorovic V 等<sup>[5]</sup>认为 HP 感染导致 Cytokeratin 家族中各亚型的不同表达共同作用于胃黏膜,多种亚型可损坏胃黏膜上皮的紧密连接,导致胃黏膜的损伤,并证实正常胃窦黏膜的表皮到深层的腺体,都可以见到 CK8 的表达;Zhao Y 等<sup>[6]</sup>发现,HP 感染导致的胃损伤,包括急性胃炎、萎缩性胃炎、肠化生及胃癌病变,皆可发现 Keratin 异常表达。Attallah AM 等<sup>[7]</sup>在 1996 年的研究中发现 CK1 在正常胃黏膜无表达,而在失去活力的凋亡胃黏膜上皮细胞中可见持续表达。吴军<sup>[8]</sup>的研究发现,CK16、CA72-4 和 CEA 三种肿瘤指标联合检测可考虑作为新的胃癌指标。Attallah AM 和 Kang HS<sup>[9]</sup>的研究结果皆表明,CK1 在受损的胃黏膜均升高。Todorovic V 等通过对比 HP(+)的胃炎患者、HP(-)的胃炎患者及正常对照组,结果 HP(+)的胃炎患者 Cytokeratin 18(CK18)明

## 5 讨论

将筛选到的差异表达蛋白(ratio  $\geq 1.5$  或者 ra-

表 2 CSG 脾虚证与正常对照组对比差异蛋白参与的相关通路

通路	富集倍数	P 值
PLP biosynthesis (P02759)	> 5	1.00E+00
Vitamin B6 metabolism (P02787)	> 5	1.00E+00
Serine glycine biosynthesis (P02776)	> 5	1.00E+00
Pyruvate metabolism (P02772)	> 5	1.00E+00
De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis (P02739)	> 5	1.00E+00
5HT3 type receptor mediated signaling pathway (P04375)	> 5	1.00E+00
5HT4 type receptor mediated signaling pathway (P04376)	> 5	1.00E+00
Opioid proopiomelanocortin pathway (P05917)	> 5	1.00E+00
Opioid proenkephalin pathway (P05915)	> 5	1.00E+00
De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis (P02740)	> 5	1.00E+00
Glycolysis (P00024)	> 5	1.00E+00
5HT1 type receptor mediated signaling pathway (P04373)	> 5	1.00E+00
Nicotine pharmacodynamics pathway (P06587)	> 5	1.00E+00
De novo purine biosynthesis (P02738)	> 5	1.00E+00

显升高,而 CK19 及 CK20 表达下调;HP(+)的胃炎患者中 CK7 表达上调,且表达量与炎症程度密切相关,而在 HP(-)的胃炎患者及正常对照组中均未发现 CK7 的表达。Schwerer MJ 等<sup>[9]</sup>早在 1997 年的研究就表明 HP 感染导致的胃炎中 CK7, 8, 18 and 19 表达增加,而 CK20 表达下降;Lauwers GY<sup>[10]</sup>研究则提示在非甾体消炎药物引起的胃病(non-steroidal anti-inflammatory drug,NSAID)中,CK 8, 18 and 19 表达强度进一步加大。Cohen M 等<sup>[11]</sup>发现 CK7 及 CK20 与有无 HP 感染及受损胃黏膜的部位有关系。此外,相较于正常胃小凹黏膜上皮及 HP(+)胃炎,CK5 和 CK6 在肠化生胃黏膜明显降低,CK 仅在肠化生组表达,CK13 在所有组都有表达<sup>[12]</sup>。在糜烂性胃炎(erosive gastritis,EG)中 keratin-5 表达上调<sup>[13]</sup>。Keratin 还可用于胃黏膜细胞的染色,用于追踪 B 淋巴细胞、Russell 体及其他胃黏膜细胞的生理变化过程<sup>[14-16]</sup>。综上所述,Keratin 家族的异常表达与胃黏膜损伤密切相关。本研究中,Keratin 家族中有 10 种亚型在 CSG 脾虚证与正常对照组对比中,胃炎脾虚证组表达上调。

膜联蛋白(Annexin,ANX)家族 Jorge YC 等<sup>[17]</sup>通过对比研究胃炎、胃腺癌和正常胃黏膜样本,结果发现胃炎和胃腺癌患者的 ANXA1 表达均增加,表明 ANXA1 与胃黏膜炎症及癌性病变密切相关。Kang HS 等<sup>[18]</sup>通过 MALDI TOF 质谱分析对比 HP(-)正常胃黏膜及 HP(+)胃炎黏膜,结果发现 HP(+)胃炎黏膜的 annexin IV 表达下调。Park JS 等<sup>[19]</sup>发现 annexin A3 在正常胃黏膜及胃腺癌细胞系均

可见表达。HP 感染导致宿主细胞浆膜裂解,胞外Ca<sup>2+</sup>内流,进而应激性地导致 annexin 家族中的 annexin A1 和 annexin A4 转位至浆膜<sup>[20]</sup>。annexin-1 可激活 Lipoxins(脂氧素),脂氧素具有抗炎、护胃作用,而 annexin-1 本身也具有消炎和保护胃黏膜的作用<sup>[21]</sup>。Annexin V 可作胃黏膜细胞凋亡的标记<sup>[22]</sup>。本研究中,Annexin 家族中有 4 种亚型在 CSG 脾虚证与正常对照组对比中,胃炎脾虚证组表达上调。

apolipoprotein 家族 He QY 等<sup>[23]</sup>发现 apolipoprotein A-I 和 alpha1-antitrypsin( $\alpha$  抗胰蛋白酶)的退化和新陈代谢,是胃黏膜炎症反应的应答机制。Liu C 等<sup>[24]</sup>发现 5906.5、6635.7 和 8716.3 三个质谱峰,经鉴定分别为 fibrinogen  $\alpha$ -chain(纤维蛋白原  $\alpha$  链),apolipoprotein A-II 和 apolipoprotein C-I,这三个峰组成的胃癌诊断模型,敏感性 93.85%(61/65),特异性 94.34%(50/53),可见  $\alpha$ -chain(纤维蛋白原  $\alpha$  链),apolipoprotein A-II 和 apolipoprotein C-I 是潜在的可应用于临床的胃癌诊断分子。本研究中,apolipoprotein 家族中有 5 种亚型在 CSG 脾虚证与正常对照组对比中,CSG 脾虚证组表达上调。

$\gamma$ -谷氨酸转移酶( $\gamma$ -glutamyltransferase,GGT)GGT 与胃部的炎症密切相关。Rimbara E 等<sup>[25]</sup>发现, $\gamma$ -谷氨酸转移酶激活,可消耗谷氨酸盐,可减少 IL-8 介导的炎症损伤。本研究中,GGT 在 2 组重复对比实验中,CSG 脾虚证组下调 0.677 倍。

综上所述,研究团队认为唾液中 Keratin 家族、ANX 家族和 apolipoprotein 家族中的多种亚型以及 GGT 的变化可作为 CSG 中医证候无创诊断的潜在

生物标志物之一。

### 参考文献:

- [1] 肖隋熙,李杰,袁肇凯,等.基于 iTRAQ 技术的冠心病血瘀证蛋白质谱研究[J].湖南中医药大学学报,2016,36(7):5-10.
- [2] 陆再英,钟南山.内科学[M].第7版.北京:人民卫生出版社,2008:382-423.
- [3] 朱文锋.中医诊断学[M].北京:人民卫生出版社,1999,690-691.
- [4] 欧阳宏.脾胃温热证诊断标准及以药测证方法初探[D].广州:广州中医药大学,2002.
- [5] Todorovic V, Sokić-Milutinović A, Mrdarević N, et al. Expression of cytokeratins in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis of adult patients infected with cagA+strains: an immunohistochemical study[J]. World J Gastroenterol. 2006, 12(12): 1865-1873.
- [6] 赵艳,谢渊,陈娟,等.幽门螺杆菌感染蒙古沙鼠胃癌模型的建立及蛋白质组学研究[J].中华病理学杂志,2014,43(12):820-826.
- [7] Attallah AM, Abdel-Wahab M, Elshal MF, et al. Apoptosis in chronic gastritis: evaluation of the gastric mucosa by DNA flow cytometry and the expression of the high molecular weight cytokeratin[J]. Hepatogastroenterology. 1996, 43(11): 1305-1312.
- [8] 吴军,徐美珍.胃癌患者血清 CK-18、CA72-4、CEA 的临床意义[J].热带医学杂志,2016,16(12):1533-1535.
- [9] Schwerer MJ, Kraft K, Baczako K. Structural changes in the gastric foveolar epithelium in *Helicobacter pylori*-positive gastritis revealed by keratin immunohistochemistry [J]. Hum Pathol, 1997, 28(11): 1260-1267.
- [10] Lauwers GY, Furman J, Michael LE, et al. Cytoskeletal and kinetic epithelial differences between NSAID gastropathy and *Helicobacter pylori* gastritis: an immunohistochemical determination [J]. Histopathology, 2001, 39(2): 133-140.
- [11] Cohen M, CuetoRúa E, Balcarce N, et al. Expression of cytokeratins 7 and 20 in *Helicobacter pylori*-associated chronic gastritis in children[J]. Pediatr Dev Pathol, 2004, 7(2): 180-186.
- [12] Schwerer MJ, Baczako K. Expression of cytokeratins typical for ductal and squamous differentiation in the human stomach: an immunohistochemical study of normal foveolar epithelium, *Helicobacter pylori* gastritis and intestinal metaplasia [J]. Histopathology, 1996, 29(2): 131-137.
- [13] Galamb O, Sipos F, Molnar B, et al. Evaluation of malignant and benign gastric biopsy specimens by mRNA expression profile and multivariate statistical methods [J]. Cytometry B Clin Cytom, 2007, 72(5): 299-309.
- [14] Sutak J, Stoddard C, Smith ME. Solitary epithelial cells in B cell gastric MALT lymphoma[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(11):1226-1228.
- [15] Ensari A, Savas B, Heper AO, et al. An unusual presentation of *Helicobacter pylori* infection: so-called "Russell body gastritis"[J]. Virchows Arch, 2005, 446(4): 463-466.
- [16] Oksanen A, Sankila A, von Boguslawski K, et al. Inflammation and cytokeratin 7/20 staining of cardiac mucosa in young patients with and without *Helicobacter pylori* infection[J]. J Clin Pathol, 2005, 58(4): 376-381.
- [17] Jorge YC, Mataruco MM, Aratijo LP, et al. Expression of annexin-A1 and galectin-1 anti-inflammatory proteins and mRNA in chronic gastritis and gastric cancer[J]. Mediators Inflamm, 2013: 152860. doi: 10.1155/2013/152860.
- [18] Kang HS, Hong SN, Park HR, et al. Proteomics analysis for *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa [J]. Korean J Gastroenterol. 2014, 64(1): 10-17.
- [19] Park JS, Lee SJ, Kim TH, et al. Gastric autoantigenic proteins in *Helicobacter pylori* infection[J]. Yonsei Med J, 2013, 54(6): 1342-1352.
- [20] Lin LL, Huang HC, Ogihara S, et al. *Helicobacter pylori* disrupts host cell membranes, initiating a repair response and cell proliferation[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(8): 10176-10192.
- [21] Wallace JL, de Lima OM Jr, Fiorucci S. Lipoxins in gastric mucosal health and disease, Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids, 2005, 73(3/4): 251-255.
- [22] Das S, Sarkar A, Ryan KA, et al. Brain angiogenesis inhibitor 1 is expressed by gastric phagocytes during infection with *Helicobacter pylori* and mediates the recognition and engulfment of human apoptotic gastric epithelial cells [J]. FASEB J, 2014, 28(5): 2214-2224.
- [23] He QY, Yang H, Wong BC, et al. Serological proteomics of gastritis: degradation of apolipoprotein A-I and alpha1-antitrypsin is a common response to inflammation irrespective of *Helicobacter pylori* infection[J]. Dig Dis Sci, 2008, 53(12): 3112-3118.
- [24] Liu C, Pan C, Liang Y. Screening and identification of serum proteomic biomarkers for gastric adenocarcinoma[J]. Exp Ther Med, 2012, 3(6): 1005-1009.
- [25] Rimbara E, Mori S, Kim H, et al. Role of  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection [J]. Microbiol Immunol, 2013, 57(10): 665-673.

(本文编辑 杨 璞)