

益气活血法对大鼠萎缩性胃炎癌前病变差异基因表达谱的影响

李军祥, 张玉禄, 朱陵群, 赵宁宁

李军祥, 张玉禄, 赵宁宁, 北京中医药大学东方医院消化科
北京市 100078

朱陵群, 北京中医药大学中医内科学教育部重点实验室
李军祥, 教授, 博士生导师, 主要从事中医药防治消化系统疾病
的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30572388

作者贡献分布: 此课题由李军祥设计; 研究过程由李军祥, 张玉
禄及朱陵群操作完成; 数据分析由张玉禄完成; 本论文写作由张
玉禄及赵宁宁完成。

通讯作者: 李军祥, 100078, 北京市, 北京中医药大学东方医院
消化内科. lijx970508@sohu.com

电话: 010-67689766

收稿日期: 2008-05-26 修回日期: 2008-09-03

接受日期: 2008-09-17 在线出版日期: 2008-10-18

Effect of Qi-replenishing and blood-activating treatment on aberrant gene expression profile in the precancerous lesion of CAG in rats

Jun-Xiang Li, Yu-Lu Zhang, Ling-Qun Zhu,
Ning-Ning Zhao

Jun-Xiang Li, Yu-Lu Zhang, Ning-Ning Zhao, Depart-
ment of Gastroenterology, Oriental Hospital of Beijing Uni-
versity of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078,
China

Ling-Qun Zhu, Key Laboratory of the Ministry of Educa-
tion, Chinese Internal Medicine Laboratory, Beijing Uni-
versity of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700,
China

Supported by: National Natural Science Foundation of
China, No. 30572388

Correspondence to: Dr. Jun-Xiang Li, Department of
Gastroenterology, Oriental Hospital of Beijing University of
Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078,
China. lijx970508@sohu.com

Received: 2008-05-26 Revised: 2008-09-03

Accepted: 2008-09-17 Published online: 2008-10-18

Abstract

AIM: To investigate aberrant gene expression of
chronic atrophic gastritis (CAG) precancerous
lesions in rats receiving Qi-replenishing and
blood-activating treatment and to analyze its
pharmac-mechanism at genetic level.

METHODS: The model of precancerous lesion
of CAG rats induced by spring insertion and
hot paste was established. One step method

for extraction of total RNA of rat stomach tis-
sues after administration of Qi-replenishing
and blood-activating medicinals and the stom-
ach tissue of the model group was used. After
reverse transcription and fluorescent labeling
by Cy3, Cy5, we got two groups of rat stom-
ach cDNA probes and then hybridized with
the cDNA gene expression profiles microarray
hybridization. The result was scanned by the
laser scanner and processed by software for im-
age analysis, standardization, the ratio of value
analysis, cluster analysis and gene ontology
analysis. Results of gene array were verified by
Real-time PCR.

RESULTS: Screening showed 205 differen-
tially expressed genes, of which, there were
101 up-regulated expression genes and 104
down-regulated expression genes. They
composed the gene expression profiles for
precancerous lesion of precancerous lesions
of CAG in rats treated with Qi-replenishing
and blood-activating medicinals. There were
four genes related to apoptosis including heat
shock 70 kDa protein 1a, growth arrest and
dna-damage-inducible, complement compo-
nent 9 and albumin. The Real-time PCR con-
firmed expression of HSP70 up-regulated in
rats treated with Qi-replenishing and blood-
activating medicinals, which were consistent
with results using microarray technology.

CONCLUSION: These differentially expressed
genes involved different biological processes
and gene regulations. Further analysis of the
differentially expressed genes might help re-
veal the pharmac-mechanism of Qi-replenish-
ing and blood-activating medicinals at genetic
level.

Key Words: Gene expression; cDNA microarray;
Chronic atrophic gastritis; Precancerous lesion;
Rats; Qi-replenishing and blood-activating treat-
ment; Traditional Chinese medicine

Li JX, Zhang YL, Zhu LQ, Zhao NN. Effect of Qi-

■背景资料

在国家“八五”
攻关课题等关于
中医药防治萎缩
性胃炎癌前病变
的研究中, 从临床
和实验研究两方
面证明活血化瘀
法防治萎缩性胃
炎癌前病变取得
了较好的效果, 但
其作用机制尚不
清楚, 本课题的重
点是从基因水平
进一步探讨活血
法防治萎缩性胃
炎癌前期病变的
作用机制。

■同行评议者

管冬元, 副教授,
上海中医药大学
基础医学院实验
中医学教研室

■研究前沿

近年来活血化癥法防治萎缩性胃炎癌前病变的机制探讨是目前该领域的研究热点之一,已深入到基因水平,但活血化癥法的作用是多方面的,多层次的,从基因信号传导通路方面研究活血化癥法防治萎缩性胃炎癌前病变的作用机制是下一步的研究重点。

replenishing and blood-activating treatment on aberrant gene expression profile in the precancerous lesion of CAG in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(29): 3261-3268

摘要

目的: 分析益气活血法干预慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)癌前病变的差异表达基因,从基因水平探讨益气活血法防治大鼠CAG癌前病变的药理机制

方法: 应用大鼠12K基因表达谱cDNA芯片,检测益气活血法干预后CAG癌前病变大鼠基因的差异表达变化,筛选出差异表达基因,建立益气活血法干预后CAG癌前病变大鼠差异基因表达谱并进行生物信息学分析. 并运用Real-time荧光定量PCR鉴定HSP70基因表达.

结果: 共筛选出差异表达基因205个,其中上调基因为101条,下调基因104条,共同构成了益气活血法干预大鼠CAG癌前病变的差异表达基因谱. 与凋亡相关的4个基因为heat shock 70 kDa protein 1a, growth arrest and DNA-damage-inducible, complement component 9和albumin. Real-time荧光定量PCR鉴定结果表明益气活血法干预治疗后HSP70基因表达上调,与芯片检测结果一致.

结论: 益气活血法对大鼠CAG癌前病变的基因表达的影响涉及到多种生物学过程信号传递及基因调控的改变,从分子生物学角度说明中医益气活血法对CAG癌前病变的影响是一个复杂的病理生理过程.

关键词: 基因表达; 基因芯片; 萎缩性胃炎; 癌前病变; 大鼠; 益气活血法; 中医

李军祥, 张玉禄, 朱陵群, 赵宁宁. 益气活血法对大鼠萎缩性胃炎癌前病变差异基因表达谱的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(29): 3261-3268
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3261.asp>

0 引言

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是消化系统常见病、疑难病之一,在CAG基础上伴发的肠上皮化生(intestinal metaplasia, IM)和异型增生(displasia, Dys)是胃癌前期病变^[1]. 临床上中医运用益气活血法治疗本病取得了较好的效果. 本研究复制大鼠CAG癌前病变模型,研究益气活血法对大鼠萎

缩性胃炎癌前病变基因表达的影响,从基因水平探讨益气活血法防治萎缩性胃炎癌前病变的作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠,体质量180-220 g,清洁级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物许可证编号: SCXX(京)2002-0003. 北京中医药大学东直门医院中药药理学实验室II级动物实验室,许可证号: SYXK 11-00-0029. 微量天平(HANGPING JA1003)为上海天平仪器厂产品. Agilent 2100 Bioanalyzer: Agilent: 型号: G2938B; Nano Drop Spectrophotometer: 型号ND-1000; 酶标仪: 型号KC4; MJ PCR仪: 型号PTC-100; UVP杂交炉: 型号HB-1000; Agilent扫描仪: 型号G2655AA; Line-gene荧光定量PCR检测系统为杭州博日科技有限公司产品; 台式高速冷冻离心机TGL-16(湘仪); DYY-7C型电泳仪与DYCP-31D型水平式电泳槽为北京六一仪器厂产品; 紫外分析仪为北京宾达英创科技有限公司产品; 紫外分光光度计UV-2000为尤尼柯(上海)仪器有限公司产品.

1.2 方法

1.2.1 大鼠CAG癌前期病变模型的建立: 大鼠在相同条件下分笼饲养,每笼4只,常规喂养标准颗粒饲料,自由饮用水. 按赵凤志 *et al*^[2]的方法,将♂ Wistar大鼠(体质量230-260 g)禁食不禁水16 h后,以10 g/L戊巴比妥ip麻醉(5 mL/kg),称体质量,固定大鼠四肢,在无菌条件下开腹,暴露胃,在胃前壁距幽门环0.2 cm无或少血管处切一小口,将一长约2 cm,直径约0.2-0.3 cm的金属弹簧前1/3插过其幽门环进入十二指肠,用缝线将弹簧两端及中央固定,按手术常规逐层缝合胃及腹壁切口. 手术后禁食不禁水24 h,恢复性饲养1 wk后,开始每周每只大鼠ig 60-70℃高盐热淀粉糊2次,每次2 mL,连续24 wk. 并于造模结束前随机抽取模型组大鼠8只进行胃黏膜病变病理形态学检查,其中7只出现轻-中度不典型增生,确认造模成功. 造模结束后,将模型大鼠随机分为益气活血治疗组[予三七粉0.7 g/(kg·d)加黄芪浸膏3.5 g/(kg·d)]和自然恢复组(予双蒸水灌胃),两组分别每天上午ig 1次,连续12 wk,于给药第12周末处死实验大鼠,进行病理切片.

1.2.2 组织取材: ig 12 wk,采用乙醚麻醉法,剖腹取胃,在胃窦部阳性病变部位取材,益气活血组

取材3例, 正常对照组3例, 自然恢复组1例, 取材后标本迅速液氮冻存备用。

1.2.3 大鼠表达谱芯片: 大鼠12K基因表达谱cDNA芯片, 覆盖11 060种基因, 其中Unigene 10 695条, 已知基因5657条, EST4716条。

1.2.4 探针制备: 按照TRIzol试剂说明, 采用异硫氰酸胍一步法抽提所取胃黏膜组织总RNA, 所提总RNA使用Agilent 2100进行样品RNA检测, 确定其完整性。用Oligotex mRNA Midi Kit(Qiagen公司)纯化mRNA。每1份探针取4 μ g mRNA, 逆转录标记cDNA探针并纯化探针。模型组来源的mRNA由Cy3-dUTP标记制成探针, 益气活血组来源的mRNA由Cy5-dUTP标记制成探针。

1.2.5 芯片杂交(cDNA芯片杂交): 取出经定量的Cy3和Cy5标记的探针, 取Cy3探针90 pmol, Cy5探针60 pmol, 浓缩至7 μ L, 然后转至0.2 mL PCR管内。将溶解的探针置于PCR仪中94 $^{\circ}$ C变性3 min左右, 取出加入Cot-1 DNA 1 μ g, A80 1 μ g放回PCR仪中, 70 $^{\circ}$ C保温30 min。反应结束后, 加入9 μ L 4 \times 杂交缓冲液和18 μ L甲酰胺, 总体积达到36 μ L, 充分混匀。取杂交液滴加于芯片上, 盖上盖玻片。将杂交芯片水平放入加有1 \times PBS的杂交盒, 置42 $^{\circ}$ C杂交箱中避光杂交16-18 h。

1.2.6 芯片洗涤: 杂交结束后, 用镊子取出片子, 浸入经过50 $^{\circ}$ C预热的洗液I中, 上下抽动, 使盖玻片从芯片上自然脱离, 然后在50 $^{\circ}$ C洗液I中洗涤10 min。从洗液I中取出片子, 浸入50 $^{\circ}$ C预热的洗液II中, 洗涤10 min, 然后再转入新的洗液II中, 重复2次。从洗液II中取出片子, 室温洗液III洗涤5 min, 重复2次。取出芯片于去离子水中室温洗涤2 min。用镊子小心将片子取出, 迅速转入50 mL空离心管中, 1500 r/min离心5 min, 干片。最后将芯片取出放入芯片盒, 避光保存于干燥器中。

1.2.7 荧光扫描、数据处理和统计学分析: 将玻片放入扫描片夹中, Agilent扫描仪扫描芯片, 获得荧光图像, 提取杂交信号, 以管家基因为内参照对Cy3和Cy5的原始提取信号进行均衡和修正。ImaGene3.0软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值, 以芯片中密度值 5×10^8 以上的数据点为有效数据, 数据导入分析软件Genespring, 用Background subtraction based on negative controls和per spot and per chip

Intensity dependent normalization(non-linear or LOWESS normalization)方法标准化, 计算得到ratio值(两种荧光Cy5与Cy3的比值); ratio值大于2或小于0.5的数据点为存在显著性差异表达的基因点, 以此为筛选标准, 筛选出差异表达基因。

1.2.8 生物信息学分析: 利用美国NIH开发的DAVID系统对差异表达基因进行基因功能富集分析^[3]。

1.2.9 Real-time荧光定量PCR鉴定HSP70基因表达 引物设计采用Primer premier 5及oligo 6等生物软件, 引物序列如下: NM_031971 Rattus HSP70 192 bp, 上游: 5-gctgatcttgccttgagac-3; 下游: 5-caagatcaccatcaccaacg-3。RT制备cDNA溶液: Microtube管中配制下列模板RNA/引物混合液, 全量<15 μ L, 模板RNA和Oligo(dT)12-18 Primer(50 μ mol/L)的使用量分别为3, 2.5 μ L; 70 $^{\circ}$ C保温5 min后迅速在冰上急冷2 min以上; 离心数秒钟使模板RNA/引物的变性溶液聚集于Microtube管底部; 在上述Microtube管中配制下列反转录反应液: 5 μ L 5 \times M-MLV Buffer, 1.25 μ L dNTP Mixture(各10 mmol/L), 25 U RNase Inhibitor(40 U/ μ L), 200 U, M-MLV(200 U/ μ L), up to 25 μ L RNase free dH₂O, 42 $^{\circ}$ C保温1 h; 70 $^{\circ}$ C保温15 min后冰上冷却, 得到cDNA溶液。Real-time PCR: Real-time PCR反应体系: 25 μ L 2XSYBR Mix(with 4 mmol/L Mg²⁺), 1 μ L PCR Forward Primer(10 μ mol/L), 1 μ L PCR Reverse Primer (10 μ mol/L), 0.3 μ L Taq DNA Polymerase, 20.7 μ L ddH₂O, 2 μ L cDNA。Real-time PCR反应条件见表1。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量 益气活血组大鼠体质量为 671.25 ± 36.26 g($n = 3$), 正常对照组体质量为 661.00 ± 37.29 g($n = 3$), 二者相比无显著性差异。自然恢复组大鼠体质量为603 g($n = 1$)。

2.2 各组大鼠组织病理 自然恢复组, 重度增生: 上皮细胞或呈立方形、不定形, 细胞核明显增大, 大小、形状不一, 排列紊乱。腺管结构明显紊乱, 形状大小和排列极不规则。益气活血组, 轻度增生: 细胞核稍大, 深染, 呈圆形、卵圆形或柱形, 排列较密集, 位于细胞基底。腺管轻度增生, 管腔稍不规则, 排列稍紊乱和疏密不均。正常组, 细胞核大小均一, 疏密均匀, 腺管管腔

■相关报道

近年来国内学者在防治萎缩性胃炎及其癌前病变的研究中发现HSP70基因的表达异常, 证实HSP70基因表达对胃黏膜有保护作用, 并能促进黏膜的损伤修复。

■创新盘点

本文运用基因芯片技术研究活血化癥法的作用机制,筛选出差异表达基因,从基因功能角度分析,HSP70基因是活血化癥法防治本病的目的基因之一,为进一步从基因信号传导通路上揭示其作用机制提供了有益的实验基础。

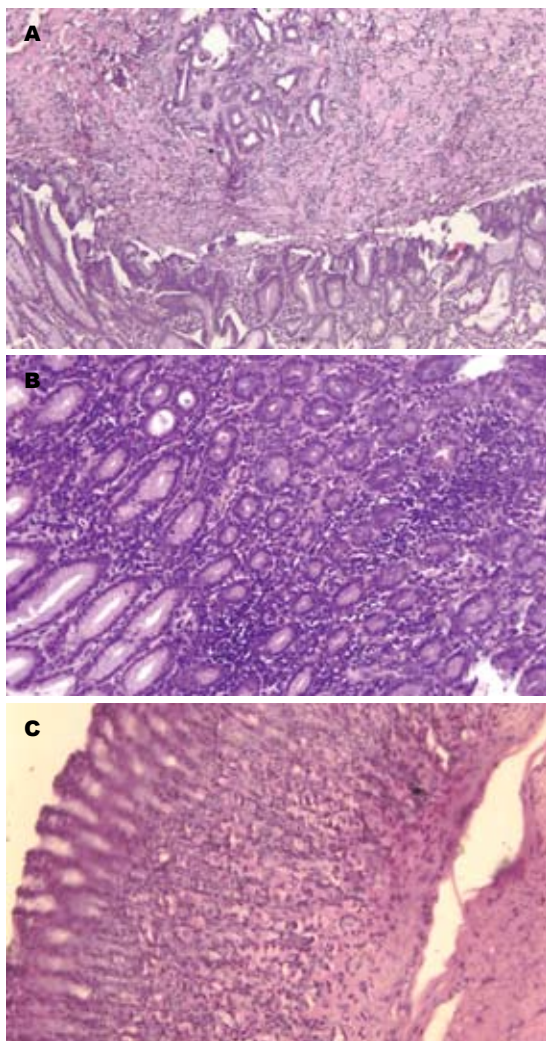


图1 各组大鼠病理图. A: 自然恢复组; B: 益气活血组; C: 正常组.

规则,排列整齐(图1).

2.3 样品RNA质量检测结果 芯样品RNA电泳检测,使用Agilent 2100进行样品质检(样品编号同上).该批样品抽提的RNA量足够;电泳中,条带 $28S>18S$,质检合格,可以进行芯片实验(表2,图2).

2.4 数据统计学分析

2.4.1 聚类分析: 利用stanford大学Eisen Lab开发的Cluster软件(<http://rana.lbl.gov/>)进行分层聚类,结果表明益气活血组的基因表达谱模式与自然恢复组反差最大,提示益气活血组的药物疗效可能较好,聚类的结果表明热休克蛋白70(heat shock 70 kDa protein, HSP70)及其相邻的几个基因是自然恢复组和益气活血组反差最大的区域(图中蓝圈内所示),提示这几个基因可能是益气活血法作用机制较明确的靶标(图3).

表1 Real-time PCR反应条件

反应步骤	$t(^{\circ}\text{C})$	$t(\text{s})$	循环	荧光信号收集
预孵育	95	120	1	无
	95	20		
扩增	58	25	45	在延伸阶段结束时
	72	30		
溶解曲线	65	0	1	在温度缓慢升高过程中
	95	20		

表2 样品RNA浓度 (g/L)

分组	样品编号	总RNA浓度	纯化后RNA浓度
益气活血组	1	1.88	1.78
	2	2.94	1.33
	3	2.65	1.50
空白对照组	10	3.36	1.26
	11	3.36	1.40
	12	3.26	1.63
自然恢复组	13	2.56	1.24

表3 三张芯片差异基因数目

芯片编号	55006	55007	55008
上调基因数	566	346	452
下调基因数	706	640	519

2.4.2 差异基因列表: 按照设定的数据筛选标准: $\text{Ratio} \geq 2$ 或 ≤ 0.5 , $P < 0.05$, 益气活血组三张芯片筛选出的差异基因数目见表3. 益气活血组三张芯片同时满足 $\text{Ratio} \geq 2$, $P < 0.05$, 或 $\text{Ratio} \leq 0.5$, $P < 0.05$, 筛选出差异表达基因205个, 其中上调基因为101条, 下调基因104条, 将上调基因按RATIO1值降序排列前30位及下调基因按RATIO1值升序排列前30位列出见表4.

2.4.3 Gene Ontology(GO)富集分析: 差异表达基因GO分析结果表明, 益气活血法对大鼠CAG癌前病变的基因表达的影响涉及到多种生物学过程信号传递及基因调控的改变, 包括细胞信号和传递类基因、细胞骨架蛋白基因、细胞外基质类基因、细胞周期相关基因、癌基因和抑癌基因、细胞凋亡相关基因以及细胞受体和细胞代谢相关基因等, 从细胞凋亡角度发现4个上调基因可能与益气活血法作用机制密切相关, 其中HSP70基因前期研究结果表明在CAG癌前病变大鼠模型中表达下调, 经活血化癥法治疗后, HSP70基因表达上调, 因此

表 4 益气活血组筛选出的部分差异表达基因列表

上调基因				下调基因			
GenBank	RATIO1	RATIO2	RATIO3	GenBank	RATIO1	RATIO2	RATIO3
NM_012564	99.01	44.64	42.37	NM_031821	0.25	0.25	0.32
NM_012657	44.25	38.61	41.84	BI296915	0.23	0.32	0.29
NM_145779	34.25	21.14	25.06	XM_149281	0.23	0.23	0.39
NM_012898	25.00	23.92	22.47	NM_133404	0.23	0.27	0.49
NM_134326	24.15	19.57	21.10	BE095796	0.22	0.32	0.27
NM_012582	22.17	15.43	14.16	NM_031320	0.21	0.32	0.24
NM_013112	19.65	8.77	15.90	BC017596	0.21	0.15	0.30
NM_031531	19.61	8.40	11.72	XM_134666	0.21	0.29	0.12
NM_019156	19.46	8.20	10.13	NM_012552	0.21	0.23	0.18
NM_012901	17.83	8.13	7.87	BF396698	0.20	0.28	0.29
NM_053469	17.70	6.85	2.29	AI144892	0.20	0.18	0.21
NM_019184	16.03	9.90	11.55	BF544595	0.20	0.34	0.07
BQ191104	13.28	7.14	10.44	NM_012623	0.19	0.17	0.11
NM_080576	13.18	6.41	6.90	BE118680	0.19	0.14	0.22
XM_342639	12.71	8.06	8.13	M92076	0.18	0.15	0.22
NM_017233	12.38	5.56	6.99	NM_023970	0.17	0.15	0.17
NM_053768	12.02	7.35	13.00	XM_041991	0.17	0.31	0.28
BQ191104	11.86	6.29	10.28	BE099720	0.14	0.33	0.22
NM_017055	11.81	5.18	7.19	NM_012847	0.14	0.19	0.13
NM_031971	10.36	11.43	2.75	NM_013034	0.10	0.18	0.36
NM_031543	10.24	8.47	8.93	NM_152936	0.08	0.06	0.36
NM_020071	10.08	8.26	6.54	NM_016997	0.08	0.07	0.19
NM_017024	9.62	4.26	6.80	NM_016997	0.08	0.06	0.13
NM_175837	8.55	2.93	5.92	NM_012635	0.05	0.06	0.13
NM_030832	8.40	4.29	7.46	NM_012553	0.04	0.06	0.09
NM_053288	8.26	5.18	4.03	NM_139086	0.02	0.02	0.06
NM_053617	8.26	4.88	7.04	NM_173127	0.02	0.02	0.04
NM_030850	8.20	3.89	7.25	NM_054009	0.02	0.02	0.04
XM_129207	8.20	3.33	2.42	NM_031502	0.02	0.02	0.03
NM_057146	7.81	8.70	6.85	NM_013161	0.01	0.02	0.02

■应用要点
HSP70基因表达异常在萎缩性胃炎癌前病变的发病机制中的作用逐渐受到重视,从活血化瘀法影响HSP70基因表达的角度深入研究其作用机制,为临床新药研发积累有益资料。

表 5 GO分析结果与凋亡相关的4个基因

GeneBank ID	gene title
NM_031971	heat shock 70 kd protein 1a
AI599423	growth arrest and dna-damage-inducible
NM_057146	complement component 9
NM_134326	albumin

推测HSP70基因可能是益气活血法治疗大鼠CAG癌前病变较明确的靶基因之一。GO分析结果与凋亡相关的4个基因见表5;与凋亡相关的4个基因在正常对照组的芯片检测中RATIO值见表6。表6数据说明,益气活血组芯片检测结果中表达上调的4个基因在正常对照组芯片检测结果中RATIO值在大部分在0.5-1.5之间,基因表达无明显上调或下调,其中18748号芯片

表 6 正常对照组与凋亡相关的4个基因的RATIO值

GenBank	RATIO1(I0744)	RATIO2(I0745)	RATIO3(I8748)
NM_031971	0.92	1.08	0.98
AI599423	1.00	0.94	0.81
NM_057146	0.64	0.61	—
NM_134326	1.13	0.96	0.89

NM_057146基因无表达,说明与正常对照组比较,益气活血法对4个凋亡相关基因表达有明显影响。

2.4.4 Real-time PCR验证结果:所有样本在相同条件下对内参基因和目的基因进行Real-time PCR验证,得到CT值,应用 $2^{-\Delta CT}$ 公式对目的基因相对表达量进行计算(表7)。结果表明,HSP70基因相对表达量在1号样本(0.76)、2号

■同行评价

本文应用基因芯片探讨了益气活血法对CAG癌前病变的基因调控情况,其研究方法新颖,研究目标明确,具有一定的学术价值。

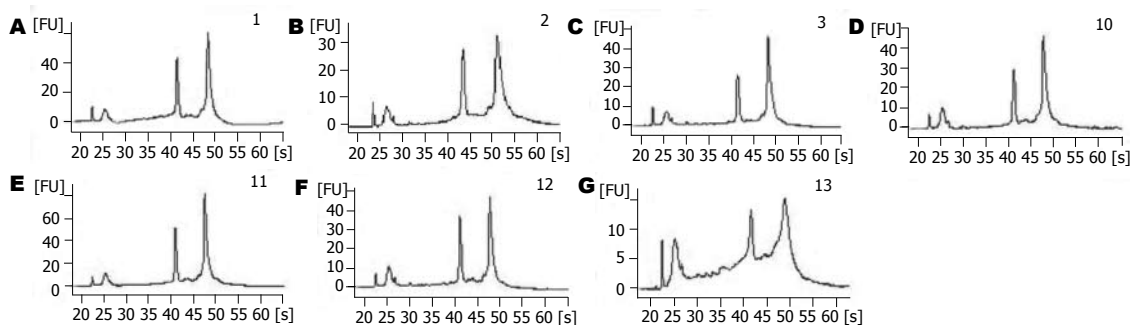


图2 使用Agilent 2100生物分析仪采用荧光毛细管电泳法对样品RNA检测的结果。横坐标代表时间,纵坐标代表荧光强度,较高的两个波峰分别代表18S和28S;其中:A-C:益气活血组;D-F:正常对照组;G:自然恢复组。

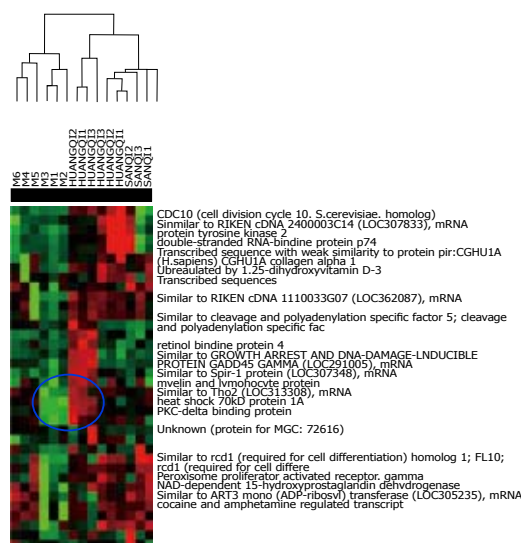


图3 益气活血组基因表达谱的局部聚类图。

样本(0.81)和3号样本(0.68)比13号样本(0.46)相对表达量都要高,分别为13号样本的1.67倍、1.77倍和1.48倍,说明经过益气活血法干预治疗后HSP70基因表达增加,与芯片检测结果一致。

3 讨论

基因芯片技术具有高质量、高效率、高准确性特点,一次可同步监测数以千计的基因的变化,与传统技术相比,具有无比的优越性^[4]。良好的基因芯片实验设计是充分发挥基因芯片技术优势的前提,基因芯片技术的生物学重复是减少或消除误差的常用手段^[5]。近年来发展起来的Real-time PCR技术具有特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点,是分子生物学研究中用于鉴定基因的重要工具。本研究运用基因芯片技术检测益气活血法对大鼠萎缩性胃炎癌前病变基因表达的影响,从基因水平探讨益气活血法防治萎缩性胃炎癌前病变的作用机制,并通过Real-time PCR

表7 HSP70基因表达Real-time PCR验证

编号	actin	平均值	HSP70	平均值	ΔCT	$2^{-\Delta CT}$
1	19.04	19	22.79	22.71	3.71	0.76
1	18.96		22.63			
2	18.83	19.1	23.05	22.73	3.63	0.81
2	19.37		22.40			
3	20.97	21.015	24.93	24.90	3.88	0.68
3	21.06		24.86			
13	24.52	24.41	28.89	28.86	4.45	0.46
13	24.30		28.83			

验证基因芯片的结果。

基因芯片结果显示,益气活血法对CAG癌前病变大鼠胃黏膜基因表达有明显影响,综合分析三张芯片生物学重复结果,共筛选出差异表达基因205个,其中上调基因为101条,下调基因104条,共同构成了益气活血法影响大鼠CAG癌前病变的差异表达基因谱。差异表达基因的功能分析结果表明,益气活血法对大鼠CAG癌前病变的基因表达的影响涉及到多种生物学过程信号传递及基因调控的改变,包括细胞信号和传递类基因、细胞骨架蛋白基因、细胞外基质类基因、细胞周期相关基因、癌基因和抑癌基因、细胞凋亡相关基因以及细胞受体和细胞代谢相关基因等,从基因水平说明中医益气活血法对CAG癌前病变的影响是一个复杂的过程。

本实验造模完成时,基因芯片结果显示,模型大鼠HSP70基因表达较正常大鼠下调;治疗完成时,基因芯片结果显示,益气活血组CAG癌前病变大鼠HSP70基因显著上调。基因聚类分析和富集分析结果提示HSP70基因可能是益气活血法防治大鼠CAG癌前病变的靶基因之一。

HSP70对胃黏膜亦具有保护作用,并能促进黏膜的损伤修复^[6].正常胃黏膜上皮完整性的维持有赖于细胞增生和凋亡的动态平衡,而凋亡调控蛋白的异常会影响这一动态平衡^[7],导致胃黏膜细胞凋亡和增殖的异常^[8].HSP70是重要的凋亡调控因子.Liu *et al*发现难辨梭状芽孢杆菌毒素A诱导肠黏膜上皮细胞凋亡;上调肠黏膜细胞内源HSP70水平,能保护细胞线粒体功能,抑制凋亡通路的激活^[9].细胞表面的Fas/Apo-1受体和他们的配体相结合是诱导凋亡的重要原因,HSP-70的表达可能提供一种能够包裹自身和外来抗原的新的免疫物质,从而使细胞避免凋亡^[10-11].研究发现,细胞内HSP70水平的增高可通过阻断信号通路,抑制应激诱导的蛋白激酶38和JNK(junn-terminalkinase)激活,从而减少细胞凋亡.线粒体可能是细胞选择死亡(炎症扩大)或凋亡(炎症受限)的关键细胞器,HSP70对线粒体的保护作用可能是HSP70的重要的抗凋亡机制^[12].在金属弹簧、高盐热糊及反流的胆汁和十二指肠液等致病因素的刺激下,大鼠胃黏膜从正常胃黏膜细胞→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型性增生,其凋亡率逐渐升高^[13].芯片结果表明益气活血法干预治疗后HSP70基因上调,且与Real-time PCR基因鉴定结果一致,HSP70基因表达上调抑制细胞凋亡及其通路的激活可能是其治疗CAG癌前病变的机制之一.

CAG癌前病变大鼠胃黏膜HSP70基因表达较正常大鼠下调,分析其原因,可能有以下几点:(1)与胃黏膜营养供应不良有关:CAG癌前病变胃黏膜血流减少^[14]或局部胃黏膜营养供应失调,蛋白营养不良能削弱HSP70转录调控因子HSF-1活性,抑制HSP70 mRNA合成^[15];(2)与表达HSP70的细胞减少有关:长期的黏膜损害导致胃黏膜细胞死亡,腺体丢失.HSP70表达水平和黏膜损伤程度呈负相关^[16-17].

CAG癌前病变属中医“胃痞”范畴,其病位在胃,与肝脾关系密切,病性属虚实相兼,病程绵长,病情迁延反复难愈,胃为多气多血之腑,气行则血行,气虚则血瘀,日久则影响气血运行形成气虚血瘀证,临床上中医运用益气活血法治疗CAG癌前病变取得了较好的疗效,能够改善胃黏膜血液循环,促进胃黏膜病变的修复,这种药理作用可能是HSP70基因上调产生的效应之一,HSP70基因上调在益气活血法防

治大鼠CAG癌前病变作用机制中可能是一个重要的环节,但HSP70基因上调对信息传导通路和相关基因的调控等方面的机制有待进一步深入研究.

4 参考文献

- 1 陈灏珠.实用内科学.第12版.北京:人民卫生出版社,2005:1881-1882
- 2 赵凤志,鲁香凤,戴欣,卜益民,张旭晨,石雪迎,方杰,董建华,田德禄,马庆山,秦腊梅,王志春,阎艳芳.三种方剂水煎液对实验性慢性胃炎大鼠胃粘膜组织病理学变化及胃液pH、胆酸含量的影响.中国中药杂志1995;20:488-492
- 3 Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003; 4: P3
- 4 徐俊荣,崔大祥,张沥,张玲霞,贾长河,张宁霞,江梅,曹广周.基因芯片法筛选萎缩性胃炎相关的差异表达基因.世界华人消化杂志2003;11:47-50
- 5 吴斌,林乔,王米渠.试论影响基因芯片实验设计的因素.世界华人消化杂志2005;13:1206-1209
- 6 Odashima M, Otaka M, Matsushashi T, Jin M, Horikawa Y, Ohba R, Itoh H, Watanabe S. Mechanical strain stress suppresses expression of HSP70 and wound restoration in gastric mucosal cells. *Dig Dis Sci* 2007; 52: 3087-3091
- 7 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 16-26
- 8 Nardone G, Staibano S, Rocco A, Mezza E, D'armiento FP, Insabato L, Coppola A, Salvatore G, Lucariello A, Figura N, De Rosa G, Budillon G. Effect of *Helicobacter pylori* infection and its eradication on cell proliferation, DNA status, and oncogene expression in patients with chronic gastritis. *Gut* 1999; 44: 789-799
- 9 Liu TS, Musch MW, Sugi K, Walsh-Reitz MM, Ropeleski MJ, Hendrickson BA, Pothoulakis C, Lamont JT, Chang EB. Protective role of HSP72 against *Clostridium difficile* toxin A-induced intestinal epithelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C1073-C1082
- 10 Beere HM, Green DR. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2001; 11: 6-10
- 11 Didelot C, Schmitt E, Brunet M, Maingret L, Parcellier A, Garrido C. Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death. *Handb Exp Pharmacol* 2006; (172): 171-198
- 12 Yenari MA, Liu J, Zheng Z, Vexler ZS, Lee JE, Giffard RG. Antiapoptotic and anti-inflammatory mechanisms of heat-shock protein protection. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 74-83
- 13 李子俊,林秋雄,王启仪,林华欢,骆新兰,詹德娟.胃癌及癌前病变细胞增殖和凋亡与bc12/bax表达关系的研究.现代消化及介入诊疗杂志2000;5:14-16
- 14 Takaya Y, Tsunoda S, Itoh M, Oshima H. [Studies on analysis of gastric mucosal blood flow by electronic endoscopic image. Especially on atrophic gastritis] *Nippon Ika Daigaku Zasshi* 1994; 61: 295-305
- 15 Kawai T, Teshima S, Kusumoto K, Kawahara T,

- Kondo K, Kishi K, Rokutan K. A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranyl-geranyl-acetone, restores the heat shock response in gastric mucosa of protein-malnourished rats. *J Lab Clin Med* 2000; 136: 138-148
- 16 Guo JS, Cho CH, Wang JY, Koo MW. Expression and immunolocalization of heat shock proteins in the healing of gastric ulcers in rats. *Scand J Gastroenterol* 2002; 37: 17-22
- 17 Rokutan K, Miyoshi M, Teshima S, Kawai T, Kawahara T, Kishi K. Phenylarsine oxide inhibits heat shock protein 70 induction in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 279: C1506-C1515

编辑 李军亮 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

“科技期刊在国家自主创新体系中的作用”专题讨论会在京召开

本刊讯 为提升我国科技期刊的整体水平,提高我国科技期刊引领各学科领域自主创新的发展方向,同时也为我国科研人员提供一个很好的国际平台,国家自然科学基金委员会政策局和科学基金杂志社于2008-8-27/28在北京联合组织召开了第31期《双清论坛》,论坛主题为“科技期刊在国家自主创新体系中的作用”。

参会人员有政府管理部门、高等院校、科研院所等机构约40位官员和专家学者,以及来自国内30多家重点学术期刊的编辑。国家自然科学基金委员会王杰副主任全程参加了为期2天的论坛,并在开幕式的发言中指出,我国科学家要将创新成果投向自己的期刊视为己任。政策局韩宇副局长和科学基金杂志社副主任祖广安分别介绍了此次论坛的总体要求和特点与定位。

本次论坛围绕以下6个议题对我国科技期刊在国家自主创新体系中的作用开展了深入讨论: (1)科技发达国家科技期刊的现状与发展趋势; (2)国际上若干影响力大的科技期刊创业发展案例分析与经验分享; (3)我国科技期刊在建设创新性国家中所应扮演的角色; (4)我国科技期刊存在的问题与原因分析; (5)我国科技期刊要从大做到强的具体措施建议; (6)基金委在促进我国科技期刊跨越式发展上所应发挥的作用。

陈佳洱院士、师昌绪院士和朱作言院士分别作了“为中国科学的发展办好科学期刊”、“我国科技期刊要从大做到强”和“基金委全力推进我国科技期刊走向世界”的主题演讲。对于当前科技期刊的发展,他们认为,政府管理部门应引入竞争与淘汰机制,借鉴国有大企业改革创新的经验,办好国家级科技期刊,为国家自主创新体系建设做贡献。在国际化方面,期刊应通过各种渠道与国际大型出版商合作,向国际性期刊学习,逐步实现集团化运作,扩大自己的影响。此外,他们还特别强调了要完善和改革当前的评价体系,目前用表观的、量化的论文数量和引用数据来评价科研和论文,很容易将我国的科研引向歧途。我们应充分重视“开放存取”(Open Access, OA)的出版模式,OA出版是当前我国科技期刊发展的理想模式;科技期刊要注重与新闻媒体的沟通,这是提高国民科技素质的重要渠道。

清华大学生命科学与医学研究院施一公副院长和中国科学院基因组研究所吴仲义所长也分别应邀作了专题报告。他们认为当前有大量优秀华人学者,有着丰富的、潜在的优秀稿源,不少人还都参与着一些国际上有重要影响的期刊的工作。如果有足够的经费支持和强有力的编辑队伍,我国主办高水平的国际性科技期刊是可行的。中国科学院物理研究所王鼎盛院士、国家地震局地球物理所陈运泰院士、中国科协学会学术部杨文志副部长、中国科学院半导体研究所夏建白院士、中华医学会副会长王海燕教授、北京市肿瘤防治研究所吕有勇教授、中华医学杂志社游苏宁社长和中国科学杂志社肖宏总经理也特邀进行了专题发言。

会议还邀请《细胞研究》、《世界胃肠病学杂志》、《亚洲男科学杂志》及《分子植物》四刊编辑部人员作了典型特邀发言。他们是国内近几年来出现的国际化程度比较领先的期刊,他们的共同特点都是主编全力以赴,全身心地投入到期刊工作中,成为期刊的灵魂。这些刊物都是按照国际通行的办刊模式运作,但是又各有特点。他们的多元化办刊经验很值得国内其他刊物借鉴。

参会者还就基金委完善和改革当前的评价体系进行了讨论,他们提出通过追加研究经费以及设立有关加快科技期刊国际化进程的系列软课题等想法,为国家自然科学基金委员会提出了中肯的建议。今天我们有了改革开放的政策推动,有了与会者所代表的国家政府部门、科学家群体和期刊编辑们的共同努力,就没有克服不了的困难,我国科技期刊走向国际的梦想也一定会早日实现。(祖广安 2008-10-18)

编辑 李军亮