

Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证的胃黏膜菌群特征及炎症水平分析

廖桂彬¹, 唐舒婷², 廖晓意¹, 兰绍阳², 胡玲³, 陈斌², 樊冬梅², 李培武², 陈昀²

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 3. 广州中医药大学科技创新中心, 广东 广州 510405)

摘要:目的 探讨幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证形成的生物学机制。方法 收集 107 例 Hp 相关性胃病患者的胃黏膜样本, 其中脾胃湿热证 70 例, 脾气虚证 37 例, 同时招募平和体质健康受试者 10 名作为正常对照组。采用 16S rDNA 技术检测胃黏膜样本菌群组成, 免疫组织化学法检测胃黏膜 NLRP3 和白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)蛋白表达水平。结果 与正常对照组比较, 脾胃湿热证患者胃黏膜菌群放线菌门、拟杆菌门的相对丰度显著降低($P < 0.05$), 脾气虚证组患者胃黏膜菌群的门水平物种丰度无明显差异; 线性判别分析显示, 与正常对照组比较, 幽门螺杆菌属为 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证患者的胃黏膜标志菌属。与正常对照组比较, 脾胃湿热证、脾气虚证患者胃黏膜 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著升高($P < 0.05$)。结论 胃黏膜菌群结构差异、炎症水平升高可能是 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证形成的内在生物学机理。

关键词: Hp 相关性胃病; 脾胃湿热证; 脾气虚证; 胃内微生态; 16S rDNA

中图分类号: R259 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2022)07-0576-08

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0576

引文格式: 廖桂彬, 唐舒婷, 廖晓意, 等. Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证的胃黏膜菌群特征及炎症水平分析[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(7): 576-583, 650.

Characterization of Gastric Mucosal Flora and Inflammation Level in Hp-Related Gastropathy with Spleen-Stomach Damp-Heat and Spleen-Qi Deficiency Syndromes

LIAO Gui-bin¹, TANG Shu-ting², LIAO Xiao-yi¹, LAN Shao-yang², HU Ling³, CHEN Bin², FAN Dong-mei², LI Pei-wu², CHEN Xu²

(1. The First School of Clinical Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 3. Center for Science and Technology Innovation, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the biological mechanisms underlying the formation of spleen-stomach damp-heat and spleen-qi deficiency syndromes in *helicobacter pylori* (Hp)-related gastropathy. **METHODS** Gastric mucosa samples were collected from 107 patients with Hp-related gastropathy, including 70 cases with spleen-stomach damp-heat syndrome and 37 cases with spleen-qi deficiency syndrome, while 10 healthy subjects with moderate constitution were recruited as normal control group. Besides, the gastric mucosa samples were examined by 16S rDNA technique, and the expression levels of NLRP3 and interleukin-1 β (IL-1 β) in the gastric mucosa were measured by immunohistochemistry. **RESULTS** Compared with the normal control group, the relative abundance of the gastric mucosal flora of Actinobacteria and Bacteroidetes phylum was significantly lower in patients with spleen-stomach damp-heat syndrome ($P < 0.05$), while the abundance of gastric mucosal flora in patients with spleen-qi deficiency syndrome was not obviously different. In addition, the linear discriminant analysis showed that Hp was the marker genus of gastric mucosa in Hp-related gastropathy patients with spleen-stomach damp-heat and spleen-qi deficiency syndromes. What is more, the expression levels of NLRP3 and IL-1 β proteins in the gastric mucosa of patients with spleen-stomach damp-heat and spleen-qi deficiency syndromes were significantly higher compared with those of normal controls ($P < 0.05$). **CONCLUSION** The structural differences in gastric mucosal flora and elevated inflammation levels may be the underlying biological mechanism for the formation of Hp-related gastropathy with spleen-stomach damp-heat and spleen-qi deficiency syndromes.

KEYWORDS: Hp-related gastropathy; spleen-stomach damp-heat syndrome; spleen-qi deficiency syndrome; gastric microecology; 16S rDNA

收稿日期: 2021-09-10

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82074197); 国家自然科学基金青年科学基金项目(81904145, 81904139); 广东省自然科学基金(2017A030310486); 广州中医药大学第一附属医院创新强院资助项目(2019JIT25); 广州中医药大学一流学科建设项目(A3-0402-20-415-007); 广东省研究生教育创新计划项目(2020JGXM031)

第一作者: 廖桂彬, 男, 硕士研究生, E-mail: 20192109599@stu.gzucm.edu.cn

通信作者: 陈昀, 女, 主治医师, 主要从事 Hp 相关性胃病发病机制研究, E-mail: 61519764@qq.com

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 相关性胃病是现代医学对于 Hp 感染所引起胃黏膜病变的简称,包括慢性非萎缩性胃炎 (Chronic non-atrophic gastritis, CNAG)、慢性萎缩性胃炎 (Chronic atrophic gastritis, CAG) 以及胃癌 (Gastric cancer, GC)^[1-2]。近年来,许多中医学者对 Hp 相关性胃病“病-证”关系进行了相关研究^[3],李京尧、陈瑶等多项研究提示 Hp 相关性胃病实证常见脾胃湿热证及肝胃不和证,以脾胃湿热证为主,热、湿是其主要病理因素,而脾气虚证是 Hp 相关性胃病中出现频率较高的虚证证型,提示脾胃湿热、脾气虚与 Hp 相关性胃病的发病具有一定相关性^[4-5]。

胃内微生态可直观地显示胃内菌群的组成及结构特征,越来越多的研究发现,胃内微生态失衡可能是 Hp 相关性胃病的重要致病因素之一^[6-8]。课题组前期研究显示,慢性胃炎脾胃湿热证组 Hp 感染率与脾气虚证组相当,但感染程度高于脾气虚证组^[9],此外,前期研究发现脾胃湿热证组白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-8 (Interleukin-8, IL-8)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等 mRNA 及蛋白均处于高表达状态^[10-11],而 IL-1 β 的强效抑酸作用可升高胃内 pH 值,有利于胃内细菌繁殖,提示 Hp 相关性胃病脾胃湿热证的发生可能与胃内微生态失衡存在一定联系。但目前鲜有关于 Hp 相关性胃病中医证型胃内微生态的研究,因此,本研究拟通过探究 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证患者与健康受试者之间胃黏膜菌群特征以及炎症因子的表达差异,为 Hp 相关性胃病中医证型形成的机制研究提供思路。

1 临床资料

1.1 一般资料

选取 2019 年 11 月至 2020 年 10 月在广州中医药大学第一附属医院脾胃病科内窥镜室和胃肠外科就诊,且病理确诊为 Hp 相关性胃病的患者 107 例 (包含 CNAG 患者 49 例, CAG 患者 45 例, GC 患者 13 例),其中脾胃湿热证患者 70 例,脾气虚证患者 37 例,同时招募平和体质健康受试者 10 例作为正常对照组。3 组年龄比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 3 组性别比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。详见表 1。脾胃湿热证组和脾气虚证组的 Hp 相关性胃病不同病种比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), 详见表 2,具有可比性。本研究经广州中医药大学第一附属医院伦理委员会审批通过 (伦理批号:

ZYYECK[2019]095)。

表 1 Hp 相关性胃病不同证候患者性别、年龄比较 ($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Comparison of sex and age of different evidence of Hp-related gastropathy ($\bar{x}\pm s$)

证型	例数	性别		年龄/岁
		男	女	
脾胃湿热证组	70	46	24	54.23 $\pm$ 12.63
脾气虚证组	37	13	24	51.27 $\pm$ 13.03
正常对照组	10	5	5	51.20 $\pm$ 10.62

注:组间比较, $\chi^2_{性别}=9.32, P<0.05$ 。

表 2 Hp 相关性胃病不同证候患者病种比较
Table 2 Comparison of disease types between different evidence of Hp-related gastropathy

证型	例数	CNAG	CAG	GC
脾胃湿热证组	70	34	29	7
脾气虚证组	37	15	16	6

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 参照 2017 年中华医学会消化病分会发布的《中国慢性胃炎共识意见》^[12] 中 CNAG 和 CAG 的诊断标准:取 4 块标本 (胃窦距幽门 2~3 cm 大弯、小弯、前壁和后壁各 1 块), CNAG 内镜下可见黏膜红斑、黏膜出血点或斑块、黏膜粗糙伴或不伴水肿、充血渗出等基本表现。CAG 内镜下可见黏膜红白相间,以白相为主,皱襞变平甚至消失,部分黏膜血管显露;可伴有黏膜颗粒或结节状等表现。慢性胃炎患者胃镜病理活检若提示固有腺体有萎缩即可诊断为 CAG,若无则为 CNAG。胃癌的诊断通过内镜下胃黏膜组织活检病理结果或手术室标本病理结果确定最终诊断。

1.2.2 中医辨证标准 脾胃湿热证和脾气虚证的诊断标准均参照 2002 年《中药新药临床研究指导原则 (试行)》^[13]。

脾胃湿热证:主症包括胃脘痛或胀痛,大便黏滞不爽,纳呆食少,舌苔黄腻;次症包括脘痞恶心,口苦而黏,肢体困重,渴而少饮。具备舌苔黄腻并同时具备其余主症 2 项,或主症 1 项及次症 2 项,或次症 3 项,即可诊断。

脾气虚证:主症包括食少纳呆,体倦乏力,食后腹胀,大便异常 (溏、烂、先硬后溏、时溏时硬);次症包括神疲懒言,口淡不渴,腹痛绵绵,恶心呕吐,脘闷,肠鸣,面色萎黄,浮肿,排便无力,舌质淡,舌体胖或有齿印,苔薄白,脉细弱或沉弱。具备主症 2 项和次症 1 项,即可诊断。

1.2.3 健康受试者纳入标准 ①内镜下提示仅慢

性浅表性胃炎,无活动性炎症;②Hp 检测结果阴性;③无呼吸、循环、消化、泌尿、神经系统等疾病,无临床其他不适症状;④由 2 位主任医师对其体质辨识为平和体质者;⑤所有受试对象均签署试验知情文件。

1.3 Hp 相关性胃病纳入标准

①符合 CNAG、CAG 或 GC 的病理诊断,且中医证候符合脾胃湿热证或脾气虚证辨证标准;②年龄在 18~70 岁之间;③Hp 感染史,且近 1 个月未行 Hp 根除疗法,未使用抗生素、益生菌、铋剂、H₂ 受体拮抗剂和质子泵抑制剂(Proton pump inhibitor, PPI)者;④所有受试对象均签署试验知情文件。

1.4 排除标准

①合并有严重心、脑、肺、肝、肾及神经系统疾病者;②近期有消化道出血病史者;③孕妇、哺乳期妇女。

2 方法

2.1 胃黏膜样本采集

所有 Hp 相关性胃病受试者及健康受试者均行电子胃镜检查,并于胃窦距幽门口 2~3 cm 处的大、小弯或前、后壁钳取 4 块直径约 0.2~0.3 cm 的胃黏膜组织进行检测,其中 1 块行病理学组织检测;1 块行免疫组化蛋白检测;1 块放入装有 RNA 保存液的冻存管中,随后立即投入液氮瓶并转移至 -80 ℃ 低温冰箱保存以备 16S rDNA 测序;另留取 1 块样本备用。胃癌标本则剪取手术切除的肿物组织、距离肿物 2~3 cm 的组织、远癌组织各 4 块直径约 0.2~0.3 cm 胃黏膜组织,处理同前。将 -80 ℃ 低温冰箱保存的样本送至广州华银健康科技有限公司行 16S rDNA 测序。

2.2 胃黏膜菌群检测

提取胃黏膜样本中的总 DNA,利用 16S rDNA 技术对 V3~V4 区的 DNA 序列进行 PCR 扩增,然后通过 Illumina Miseq 测序平台进行测序,构建 DNA 文库,测序获得的原始数据(Raw reads)进行数据过滤和优化后进行下游分析,使用 VSEARCH(v2.3.4)软件按照相似度>97%的原则将原始数据进行聚类,得到 OTU 代表序列。使用 RDP classifier(v2.2)软件将 OTU 代表序列与 Silva 数据库比对进行物种注释分析^[14]。主要采用 R 软件(v3.5.1)、QIIME(v1.80)软件和 mothur(v1.39.5)软件进行菌群生物信息分析,包括 α 多样性分析和线性判别分析(LDA Effect size 分析,LEfSe 分析)等。

2.3 胃黏膜 NLRP3 和 IL-1β 蛋白表达水平检测

采用二步免疫组织化学标记法检测胃黏膜 NLRP3 和 IL-1β 蛋白表达水平,试剂盒购自 Servicebio 公司,货号分别为:GB11086、GB23303,具体操作步骤按试剂盒说明进行。显微镜(型号:XSP-C204)进行镜检、图像采集分析。根据细胞的染色程度进行评分:细胞不染色计为 0 分;染色程度为淡黄色、棕黄色、棕褐色分别计为 1 分、2 分、3 分。另根据染色细胞占据视野细胞总数的百分比来进行评分,随机选取 5 个高倍视野(200×)。阳性细胞百分比<1%计 0 分;1%≤, <25%记 1 分;25%≤, <50%记 2 分;50%≤, <75%记 3 分;75%≤, ≤100%记 4 分。阳性细胞染色程度得分与阳性细胞所占百分比得分的乘积即为免疫组织化学法总分,其中 0 分为阴性,记(-);1~4 分为轻度,记(+);5~8 分为中度,记(++);9 分及以上为重度,记(+++)。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据处理与分析,计量资料数据满足正态性,用 $\bar{x} \pm s$ 描述,同时满足正态性和方差齐性的多组独立计量资料选用单因素方差分析,若不满足正态性分布,用四分位法描述,2 组比较采用 Mann-Whitney U 检验,计数资料采用 χ^2 检验或校正 χ^2 检验,多组等级资料比较采用 Kruskal-Wallis H 检验,多重比较使用 Bonferroni 法校正 P 值,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。所有图形采用 R 包(v3.5.1)实现。

3 结果

3.1 胃黏膜菌群 α 多样性分析

所有样本共计得到 5 350 839 条序列,平均每个样本 45 733 条。物种累积曲线图中可见曲线先迅速上升,后趋于平缓,说明样本量已足够满足检测需求,详见图 1。

非参数检验分析胃黏膜菌群 α 多样性指数,结果提示,与正常对照组比较,脾胃湿热证组菌群多样性指数(Shannon 指数和 Simpson 指数)差异有统计学意义($P < 0.01$),Chao 指数和 Ace 指数差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 3。与正常对照组比较,脾气虚证组 Simpson 指数差异有统计学意义($P < 0.05$),Shannon 指数、Chao 指数和 Ace 指数差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表 4。

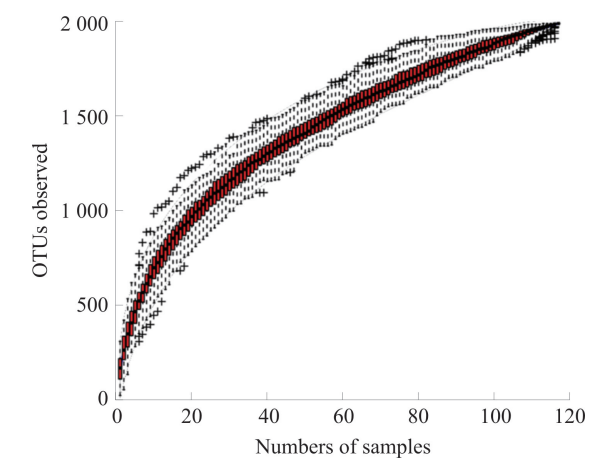


图 1 物种累计曲线

Fig. 1 Species accumulation curves

3.2 胃黏膜菌群 β 多样性分析

基于 Unweighted UniFrac 距离,不考虑序列丰

度,只考虑序列数量,采用主坐标分析(Principal coordinates analysis,PCoA)的方法研究各组样品间差异。研究发现 3 组样本均呈现不同程度的重叠,组间差异不显著,详见图 2。

3.3 胃黏膜菌群结构及组成分析

通过分析各组优势菌门(相对丰度>1%)结果发现:门水平,与正常对照组比较,脾胃湿热证患者胃黏膜的放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)相对丰度显著减少($P<0.05$, $P<0.01$),脾气虚证组患者未见明显优势菌群。属水平,与正常对照组比较,脾胃湿热证组胃黏膜的幽门螺杆菌属(Helicobacter)相对丰度显著增加($P<0.01$),奈瑟氏菌属(Neisseria)相对丰度减少($P<0.05$),脾气虚证组幽门螺杆菌属相对丰度显著增加($P<0.01$),详见图 3,表 5~6。

表 3 Hp 相关性胃病脾胃湿热证胃黏膜菌群的 α 多样性分析 [$M(P_{25}, P_{75})$]

Table 3 α diversity analysis of gastric mucosa microflora in Hp-related gastropathy with spleen-stomach damp-heat syndrome [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	Chao	Ace	Shannon	Simpson
脾胃湿热证组	70	181.98(114.09,226.39)	182.39(116.12,225.58)	2.00(0.38,3.27)**	0.23(0.90,0.89)**
正常对照组	10	221.02(101.00,281.27)	218.46(82.01,272.30)	3.21(2.85,3.65)	0.08(0.05,0.11)

注:组间比较,** $P<0.01$ 。

表 4 Hp 相关性胃病脾气虚证胃黏膜菌群的 α 多样性分析 [$M(P_{25}, P_{75})$]

Table 4 α diversity analysis of gastric mucosa microflora in Hp-related gastropathy with spleen-qi deficiency syndrome [$M(P_{25}, P_{75})$]

组别	例数	Chao	Ace	Shannon	Simpson
脾气虚证组	37	177.16(123.75,270.21)	180.37(125.54,277.81)	2.94(1.41,3.51)	0.14(0.06,0.53)*
正常对照组	10	221.02(101.00,281.27)	218.46(82.01,272.30)	3.21(2.85,3.65)	0.08(0.05,0.11)

注:组间比较,* $P<0.05$ 。

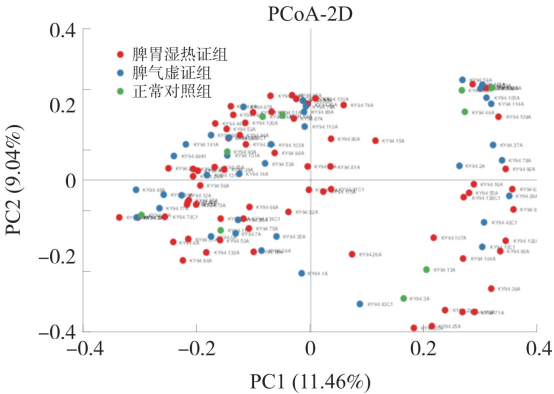


图 2 脾胃湿热证组、脾气虚证组和正常对照组胃黏膜菌群的多样性 PCoA 图

Fig. 2 PCoA diagram of diversity of gastric mucosa microflora in spleen and stomach damp-heat syndrome group, spleen-qi deficiency syndrome group and normal control group

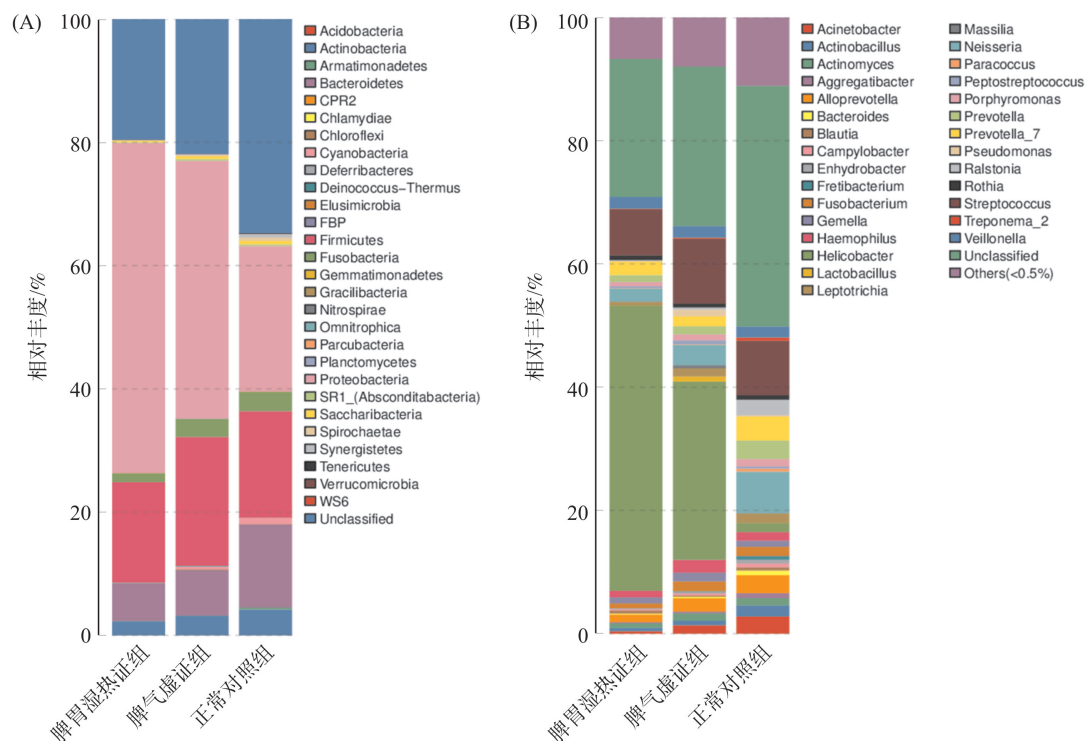


图 3 脾胃湿热证组、脾气虚证组和正常对照组在门(A)、属(B)水平的物种丰度组成

Fig. 3 Species abundance at phylum (A) and genus (B) level in spleen and stomach damp-heat syndrome group, spleen-qi deficiency group and normal control group

表 5 Hp 相关性胃病脾胃湿热证门、属水平差异菌群($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Differential flora in Hp-related gastropathy with spleen and stomach damp-heat syndrome at the phylum and genus level ($\bar{x}\pm s$)

组别	门水平		属水平	
	Actinobacteria	Bacteroidetes	Helicobacter	Neisseria
脾胃湿热证组	2. 547±3. 498 **	6. 963±9. 752 *	40. 904±44. 899 **	2. 141±3. 717 *
正常对照组	4. 851±2. 921	12. 390±9. 970	1. 531±4. 813	4. 281±6. 283

注:组间比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

表 6 Hp 相关性胃病脾气虚证属水平差异菌群($\bar{x}\pm s$)
Table 6 Differential flora in Hp-related gastropathy with spleen-qi deficiency syndrome at the genus level ($\bar{x}\pm s$)

组别	Helicobacter
脾气虚证组	28. 269±39. 237 **
正常对照组	1. 531±4. 812

注:组间比较,** $P<0.01$ 。

3.4 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证患者胃黏膜的标志菌群

为进一步探索 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证组的胃黏膜标志菌群,本研究采用 LEfSe 分析^[15],标志菌群需满足阈值 $P<0.05$ 且 LDA score

值 ≥ 3.0 (或 ≤ -3.0)。脾胃湿热证组和正常对照组比较,在属水平,脾胃湿热证组的胃黏膜优势菌群为幽门螺杆菌属(*Helicobacter*),正常对照组的胃黏膜优势菌群为奈瑟氏菌属(*Neisseria*),详见图 4。脾气虚证组与正常对照组比较,在属水平,脾气虚证组胃黏膜优势菌群为幽门螺杆菌属(*Helicobacter*),正常对照组无优势菌群,详见图 5。

3.5 胃黏膜组织 NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平
与正常对照组比较,脾胃湿热证组、脾气虚证组 NLRP3、IL-1 β 蛋白表达水平均显著增加($P<0.05$),详见表 7~8、图 6~7。

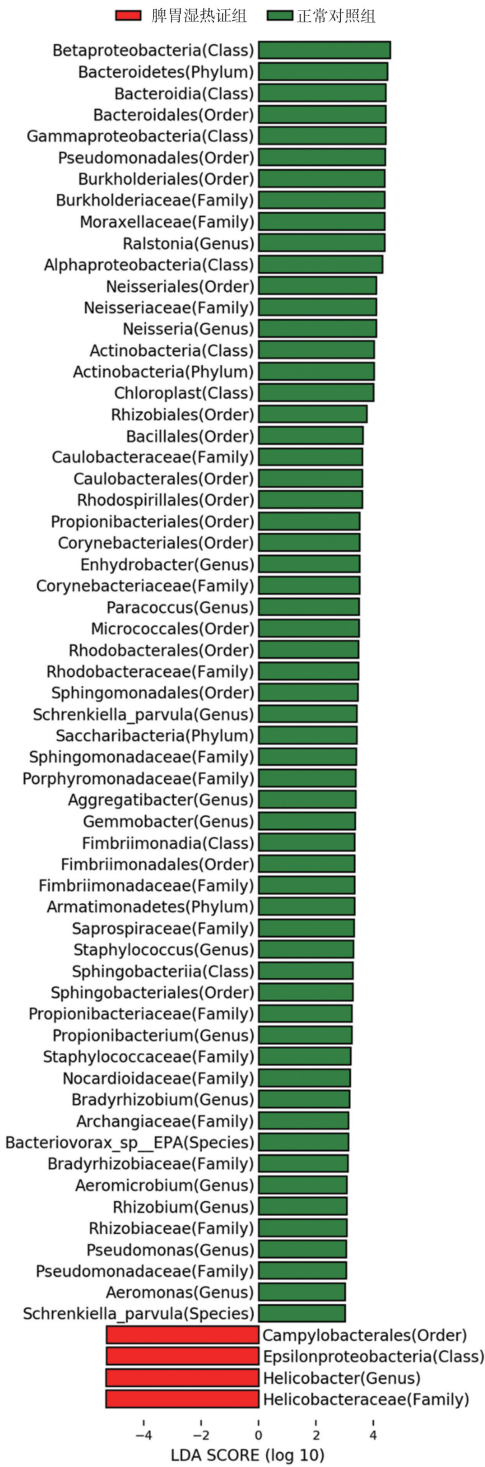


图 4 Hp 相关性胃病脾胃湿热证优势菌群

Fig. 4 The dominant flora of Hp-related gastropathy with spleen-stomach damp-heat syndrome

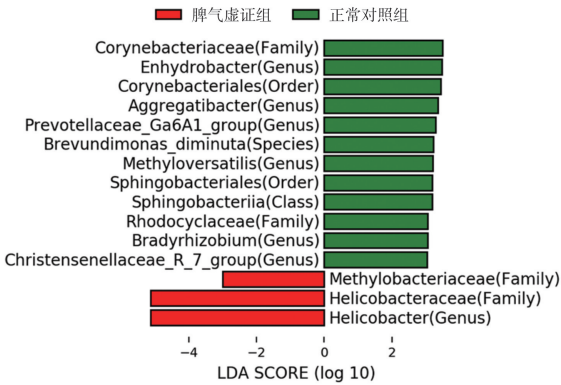


图 5 Hp 相关性胃病脾气虚证组优势菌群

Fig. 5 The dominant flora of Hp-related gastropathy with spleen-qi deficiency syndrome

表 7 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证的 NLRP3 蛋白表达

Table 7 NLRP3 protein expression in Hp-related gastropathy with spleen-stomach damp-heat syndrome and spleen-qi deficiency syndrome

组别	例数	阴性	轻度	中度	重度
脾胃湿热证组	70	7	18	31	14
脾气虚证组	37	3	10	16	8
正常对照组	10	3	6	0	1

注:经 Kruskal-Wallis H 检验,与正常对照组比较,脾胃湿热证组统计值为 30.186, $P<0.05$,脾气虚证组统计值为 31.432, $P<0.05$ 。

表 8 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证的 IL-1 β 蛋白表达

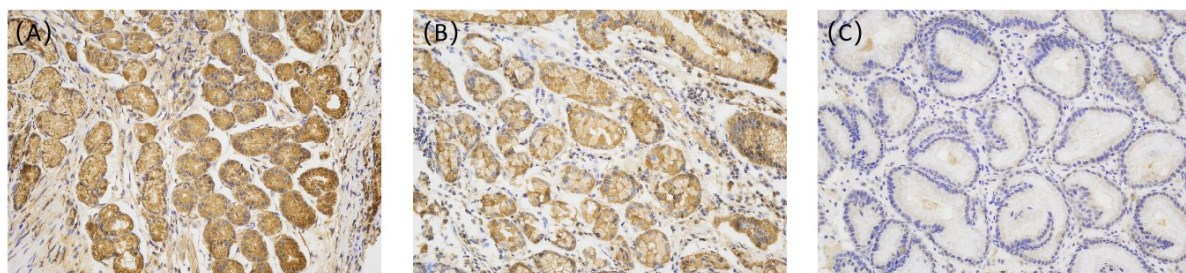
Table 8 IL-1 β protein expression in Hp-related gastropathy with spleen-stomach damp-heat syndrome and spleen-qi deficiency syndrome

组别	例数	阴性	轻度	中度	重度
脾胃湿热证组	70	7	29	22	12
脾气虚证组	37	4	11	16	6
正常对照组	10	5	3	2	0

注:经 Kruskal-Wallis H 检验,与正常对照组比较,脾胃湿热证组统计值为 28.629, $P<0.05$,脾气虚证组统计值为 32.639, $P<0.05$ 。

4 讨论

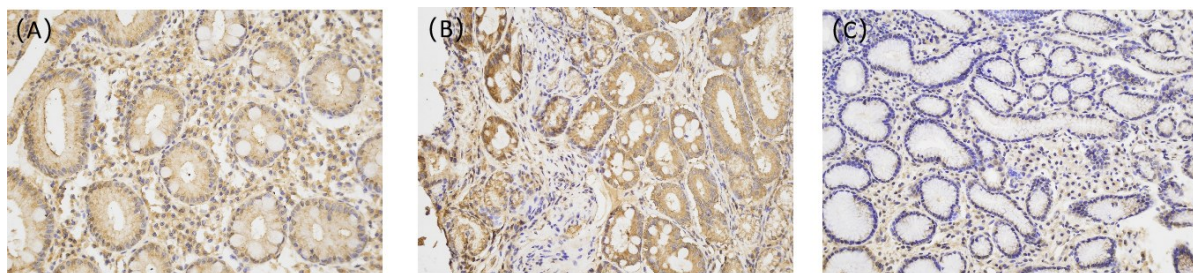
Hp 相关性胃病在我国发病率较高,其发病机制主要与 Hp 感染相关,若迁延不愈, Hp 等菌群作为肿瘤微环境的重要因素之一,可通过影响机体免疫状态促进慢性胃炎向胃癌发生发展^[16]。



注: A. 脾胃湿热证组; B. 脾气虚证组; C. 正常对照组

图 6 胃黏膜组织中 NLRP3 蛋白表达水平 ($\times 200$)

Fig. 6 Expression of NLRP3 in gastric mucosa tissue ($\times 200$)



注: A. 脾胃湿热证组; B. 脾气虚证组; C. 正常对照组

图 7 胃黏膜组织中 IL-1 β 蛋白表达水平 ($\times 200$)

Fig. 7 Expression of IL-1 β in gastric mucosa tissue ($\times 200$)

目前中医药对于 Hp 相关性胃病的临床症状改善甚至逆转取得了显著的疗效。脾胃湿热证、脾气虚证分别是 Hp 相关胃病实证及虚证的常见证型,然而目前关于 Hp 相关性胃病的研究多集中于肠道菌群或舌苔菌群特征的研究^[10,17-21],不同中医证型的胃内微生态及炎症水平变化的研究较少。因此,本文系统分析了 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证患者胃黏膜的菌群特征及胃黏膜炎症因子的表达,研究发现 Hp 相关性胃病脾胃湿热证患者幽门螺杆菌属相对丰度显著升高,奈瑟氏菌属相对丰度显著降低,幽门螺杆菌属是脾胃湿热证患者的胃黏膜优势菌属。同时,脾气虚证患者幽门螺杆菌属相对丰度亦显著升高,提示二者均为幽门螺杆菌属的易感证型。与课题组前期研究发现脾胃湿热证和脾气虚证均有较高的 Hp 感染率结果相一致。

菌群失衡可影响宿主免疫系统功能的正常发挥^[9,22],IL-1 β 等炎症因子作为先天宿主防御介质直接受其影响^[23],Fan 等^[24]发现乳酸杆菌的增加可抑制 IL-1 β 的表达,从而缓解肠道炎症。而炎症作为机体免疫的重要环节,亦可影响胃内微生态的组成和结构,从而破坏胃黏膜菌群的动态平衡^[16,25],Ling 等发现胃癌肿瘤微环境中的调节性 T 细胞和浆细胞样树突细胞表达改变与胃微生物群失调相关^[26]。本研究发现脾胃湿热证组的胃黏膜菌群多

样性低于正常对照组,而 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达水平高于正常对照组,提示胃黏膜菌群多样性减少、物种丰度下降等菌群失调现象可能与炎症反应相互作用,影响机体免疫,从而促进了 Hp 相关性胃病脾胃湿热证的形成。奈瑟氏菌属等为正常对照组的优势菌,齐城成等^[27]发现健康薄白苔和病理黄腻苔(湿热证的主要征象之一)中奈瑟氏菌属的丰度存在差异,认为奈瑟氏菌属可能是区别健康薄白苔和病理黄腻苔的菌群之一。

幽门螺杆菌属导致 Hp 相关性胃病的发病可能与其导致胃黏膜长期处于炎症状态有关。IL-1 β 作为经典的促炎细胞因子,多项研究表明 IL-1 β 在 Hp 感染患者胃黏膜的表达高低与 Hp 感染的相关炎症反应密切相关^[28-30]。细胞毒素相关基因 A 蛋白(Cytotoxin associated gene A protein, CagA)是 Hp 的主要毒力因子之一,可通过激活 NF- κ B 信号通路,活化 NLRP3 炎症体,促进 IL-1 β 、IL-18 的释放,激活细胞焦亡,进而加重炎症反应^[22]。课题组前期发现 Hp 感染可激活 NF- κ B 信号,促进其下游的相关因子 IL-1 β 的高表达^[11],随后对 IL-1 β 基因多态性的研究中发现 IL-1 β -511 TT 基因型在脾胃湿热证中的表达量有所升高,进一步采用二代测序法筛查发现 Hp 感染患者体内 NODs 通路被激活, NLRP3 炎症体处于高表达状态^[11]。本研究结果显

示 Hp 相关性胃病中脾胃湿热证组和脾气虚证组的 NLRP3 和 IL-1 β 蛋白表达水平均显著高于正常对照组,说明脾胃湿热证、脾气虚证的形成和 NLRP3 及 IL-1 β 蛋白表达密切相关,但脾胃湿热证的 NLRP3 和 IL-1 β 感染以中、重度表达为多,而脾气虚证中 NLRP3 和 IL-1 β 的表达以轻、中度为主。提示 NLRP3 及 IL-1 β 表达水平的升高可能是“湿热”“脾气虚”的重要致病机制之一。

综上所述,胃黏膜菌群多样性减少、炎症程度升高可能是 Hp 相关性胃病脾胃湿热证、脾气虚证发病的内在致病机理。脾胃湿热证、脾气虚证和正常对照组的差异优势菌群可能是其菌群标志。本次研究尚未对不同证型之间菌群及相关机制进行比较研究,课题组后续将进一步扩大样本,并纳入 Hp 相关性胃病不同病种及不同证候,基于炎症与菌群改变进一步深入系统研究。

参考文献:

- [1] CORREA P. Human gastric carcinogenesis: A multistep and multifactorial process: First American cancer society award lecture on cancer epidemiology and prevention [J]. Cancer Res, 1992, 52 (24): 6735-6740.
- [2] CORREA P, HOUGHTON J. Carcinogenesis of *Helicobacter pylori* [J]. Gastroenterology, 2007, 133(2): 659-672.
- [3] 胡伏莲,张声生. 全国中西医结合治疗幽门螺杆菌相关“病-证”共识[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2018, 27(9): 1008-1016.
HU FL, ZHANG SS. National consensus for the treatment of *Helicobacter pylori* and related symptoms based on Integrative Traditional Chinese and Western Medicine [J]. Chin J Gastroenterol Hepatol, 2018, 27(9): 1008-1016.
- [4] 陈瑶,刘庆义,叶晖,等. 幽门螺杆菌相关性胃病中医证型及证候要素演变规律的多中心研究[J]. 现代中医临床, 2015, 22 (2): 12-16.
CHEN Y, LIU QY, YE H, et al. Multi-center study of Chinese medicine syndrome types and syndrome factors evolution law of *Helicobacter pylori* related gastropathy [J]. Mod Chin Clin Med, 2015, 22(2): 12-16.
- [5] 李京尧,王盼,刘文静,等. 幽门螺杆菌相关性胃炎患者中医体质与中医证型相关性研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31 (10): 2416-2418.
LI JY, WANG P, LIU WJ, et al. A study on the correlation between TCM constitution and TCM evidence in patients with *Helicobacter pylori* - associated gastritis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(10): 2416-2418.
- [6] FERREIRA RM, PEREIRA-MARQUES J, PINTO-RIBEIRO I, et al. Gastric microbial community profiling reveals a dysbiotic cancer-associated microbiota [J]. Gut, 2018, 67(2): 226-236.
- [7] PARK CH, LEE AR, LEE YR, et al. Evaluation of gastric microbiome and metagenomic function in patients with intestinal Metaplasia using 16S rRNA gene sequencing [J]. Helicobacter, 2019, 24(1): e12547.
- [8] EUN CS, KIM BK, HAN DS, et al. Differences in gastric mucosal microbiota profiling in patients with chronic gastritis, intestinal Metaplasia, and gastric cancer using pyrosequencing methods [J]. Helicobacter, 2014, 19(6): 407-416.
- [9] 胡玲,崔娜娟,罗琦,等. 慢性胃炎脾胃湿热证与热休克蛋白

- 70 和核因子- κ B 炎症通路表达的关系 [J]. 广州中医药大学学报, 2010, 27(6): 587-591, 669.
- HU L, CUI NJ, LUO Q, et al. Relationship of heat shock protein 70 and nuclear factor- κ B inflammatory pathway with spleen-stomach damp-heat syndrome in chronic gastritis [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2010, 27(6): 587-591, 669.
- [10] 胡玲,程明,李培武,等. 不同证候舌苔 HSP70、IL-8 mRNA 表达与胃黏膜 HP 感染和病理改变的关联 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(8): 653-658.
HU L, CHENG M, LI PW, et al. Correlation of mRNA expressions of HSP70 and IL-8 in coating on tongue, HP infection and pathological changes of gastric mucosa in patients with different TCM patterns [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2016, 39(8): 653-658.
- [11] 陈响. Hp 相关胃病患者胃黏膜 IL-1 β -511、TNF- α -308 基因多态性与不同中医证候关联的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
CHEN X. Researching of relationship on IL-1 β -511 and TNF- α -308 gene polymorphisms of gastric mucosa and different syndromes in *Helicobacter pylori* related gastric disease patients [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015.
- [12] 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.
FANG JY, DU YQ, LIU WZ, et al. Chinese consensus on chronic gastritis (2017, Shanghai) [J]. Chin J Gastroenterol, 2017, 22 (11): 670-687.
- [13] 中药新药临床研究指导原则: 试行 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 362-372.
Guiding principles for clinical research of new Chinese medicine: Trial [M]. Beijing: China medico-pharmaceutical science and technology publishing house, 2002: 362-372.
- [14] QUAST C, PRUESE E, YILMAZ P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools [J]. Nucleic Acids Res, 2012, 41 (D1): D590-D596.
- [15] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation [J]. Genome Biol, 2011, 12 (6): R60.
- [16] BELKAID Y, HAND TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation [J]. Cell, 2014, 157(1): 121-141.
- [17] 安明伟,曾治君,叶梦琪,等. 湿热质与肠道菌群关系探讨 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(8): 2049-2050.
AN MW, ZENG ZJ, YE MQ, et al. Exploring the relationship between damp heat and intestinal flora [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(8): 2049-2050.
- [18] 周祎青,郑裕华,陈颂,等. 连翘对岭南湿热模型小鼠的作用及其肠道菌群变化的研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(6): 678-685.
ZHOU YQ, ZHENG YH, CHEN S, et al. Effects of forsythiae fructus on Lingnan damp-heat model mice and changes of intestinal flora [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2019, 30(6): 678-685.
- [19] 王灿,张心怡,金黑鹰,等. 内生湿热证人群的肠道菌群特点研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(1): 38-43.
WANG C, ZHANG XY, JIN HY, et al. Study on the characteristics of intestinal flora in the population with endogenous damp-heat syndrome [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 30(1): 38-43.
- [20] 李可歆. 慢性胃炎证候、证素分布及其寒热证与舌苔菌群的相关性研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
LI KX. A study on the correlation between chronic gastritis symptoms, evidence distribution and its hot and cold evidence and tongue flora [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2020.

(下转 650 页)

- [59] 南充地区卫生局. 南充常用中草药[M]. 南充: 南充地区卫生局, 1974; 714.
Nanchong District Health Bureau. Commonly Used Chinese Herbal Medicines in Nanchong[M]. Nanchong: Nanchong district health bureau, 1974; 714.
- [60] 浙江药用植物志编写组. 浙江药用植物志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1980; 1738.
Medicinal Flora of Zhejiang Editorial Committee. Medicinal Flora of Zhejiang[M]. Hangzhou: Zhejiang science and technology publishing house, 1980; 1738.
- [61] 湖南省中药资源普查办公室. 湖南省中药资源名录[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1989; 167.
Hunan Provincial Office of Traditional Chinese Medicine Resources Census. Directory of Traditional Chinese Medicine Resources in Hunan Province[M]. Changsha: Hunan science and technology press, 1989; 167.
- [62] 蔡光先. 湖南药物志: 第 5 卷[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004; 3257.
CAI GX. Hunan Chinese Materia Medica: Vol. V[M]. Changsha: Hunan science and technology press, 2004; 3257.
- [63] 方志先, 廖朝林. 湖北恩施药用植物志: 下[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2006; 192.
FANG ZX, LIAO CL. Medicinal Flora of Hubei Enshi: Vol. II[M]. Wuhan: Hubei scientific and technical publishers, 2006; 192.
- [64] 高松, 苑迅, 冯宝民, 等. 辽宁中药志: 植物类[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010; 739.
GAO S, YUAN X, FENG BM, et al. The Traditional Chinese Medicine in Liaoning: Plants[M]. Shenyang: Liaoning science and technology publishing house, 2010; 739.
- [65] 云南省药物研究所. 云南天然药物图鉴: 第 5 卷[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2012; 396.
Yunnan Institute of Materia Medica. Illustrated Handbook for Medicinal Materials from Nature in Yunnan: Vol. 5[M]. Kunming: Yunnan science and technology publishing house, 2012; 396.
- [66] 司有奇, 苏意明, 张承明, 等. 黔南本草: 下册[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2015; 736-737.
SI YQ, SU YM, ZHANG CM, et al. Qiannan Materia Medica: Vol. II[M]. Guiyang: Guizhou science and technology publishing house, 2015; 736-737.
- [67] 徐平洲, 徐琳. 北仑中草药图鉴: 修订版[M]. 宁波: 宁波出版社, 2017; 557.
XU PZ, XU L. Illustrated for Chinese Herbal Medicines in Beilun: Revision[M]. Ningbo: Ningbo publishing house, 2017; 557.
- [68] 李长乐, 董昌山, 周志祥, 等. 湖北红安中药植物志[M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2019; 226.
LI CL, DONG CS, ZHOU ZX, et al. Flora of Traditional Chinese Medicine in Hong'an, Hubei[M]. Wuhan: Huazhong university of science and technology press, 2019; 226.

(编辑:董盈妹)

(上接 583 页)

- [21] 程明, 胡玲, 劳绍贤. 幽门螺杆菌和乳酸杆菌菌群失调与慢性胃病脾胃湿热证发病的关系[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(9): 1273-1275.
CHENG M, HU L, LAO SX. Relation between dysbacteriosis of *Helicobacter pylori* and *Lactobacillus acidophilus* and the pathogenesis of chronic gastropathy patients of pi-Wei damp-heat syndrome[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2011, 31(9): 1273-1275.
- [22] 崔娜娟, 胡玲, 劳绍贤, 等. 慢性胃炎脾胃湿热证与核因子- κ B mRNA、热休克蛋白 70 mRNA 关系的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2010, 30(1): 18-21.
CUI NJ, HU L, LAO SX, et al. Relationship between pi-Wei damp-heat syndrome with expressions of nuclear factor- κ B mRNA and heat shock protein 70 mRNA in patients with chronic gastritis[J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2010, 30(1): 18-21.
- [23] BELKAID Y, HAND TW. Role of the microbiota in immunity and inflammation[J]. Cell, 2014, 157(1): 121-141.
- [24] FAN LN, QI YD, QU SW, et al. B. Adolescentis ameliorates chronic colitis by regulating Treg/Th2 response and gut microbiota remodeling[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1): 1826746.
- [25] LLORCA L, PÉREZ-PÉREZ G, URRUZUNO P, et al. Characterization of the gastric microbiota in a pediatric population according to *Helicobacter pylori* status[J]. Pediatr Infect Dis J, 2017, 36(2): 173-178.
- [26] LING ZX, SHAO L, LIU X, et al. Regulatory T cells and plasmacytoid dendritic cells within the tumor microenvironment in gastric cancer are correlated with gastric microbiota dysbiosis: A preliminary study[J]. Front Immunol, 2019, 10: 533.
- [27] 齐城成, 李伟, 丁成华, 等. 黄腻苔舌面菌群与属水平上的差异性研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3455-3458.
QI CC, LI W, DING CH, et al. Research on the flora differences of yellow-greasy fur in phylum and genus level[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2018, 33(8): 3455-3458.
- [28] 王廷义, 左钱飞, 张意, 等. 幽门螺杆菌空泡毒素 VacA 促进胃上皮细胞 NLRP3 炎性小体激活[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(1): 58-63, 68.
WANG TY, ZUO QF, ZHANG Y, et al. *H. pylori* vacuolating cytotoxin A (VacA) promotes NLRP3 inflammasome activation in gastric epithelial cells[J]. Immunol J, 2020, 36(1): 58-63, 68.
- [29] 李翔, 何跃平, 刘胜, 等. 幽门螺杆菌经 ROS 通路激活 NLRP3 炎症复合体诱导 THP-1 细胞分泌 IL-1 β 和 IL-18[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(3): 308-313.
LI X, HE YP, LIU S, et al. *Helicobacter pylori* induces cytokines IL-1 β and IL-18 production in human monocytic cell line through activation of NLRP3 inflammasome via ROS signaling pathway[J]. Chin J Immunol, 2015, 31(3): 308-313.
- [30] ZHANG XY, ZHANG PY, ABOUL-SOUD MAM. From inflammation to gastric cancer: Role of *Helicobacter pylori* [J]. Oncol Lett, 2017, 13(2): 543-548.

(编辑:周建英 董盈妹)