



北京中醫藥大學

BEIJING UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

博士研究生學位論文

THESIS OF DOCTOR'S DEGREE

題目：幽門螺杆菌相关性胃癌前病变上皮
细胞动态变化规律机制与临床研究

专 业：中医内科学

研究方向：中医药防治脾胃病

学位类型：专业型

博 士 生：张忠绵

导 师：李志红 教授

二〇二四年五月

目 录

符号说明.....	10
文献综述.....	12
综述一 中医药防治幽门螺杆菌相关性胃炎研究进展	12
综述二 H.pylori 依赖 Paligenosis 介导细胞自噬完成胃上皮细胞的 SPEM 转化.....	20
参考文献.....	30
前言.....	40
第一部分 放大内镜结合窄带成像技术在识别 H.pylori 相关性胃癌前 病变中的应用价值	42
1 研究对象.....	44
1.1 入组标准.....	44
1.2 排除标准.....	45
2 方法.....	45
2.1 研究设计	45
2.2 内镜检查及内镜下病变特征评估.....	45
2.3 病变的病理组织学诊断标准.....	48
2.4 质量控制	49
2.5 统计学分析	49
3 结果.....	50
3.1 入组患者的人口学特征及病变情况.....	50
3.2 Bayes 逐步判别分析法胃癌前病变诊断模型的建立、验证及效 能评价	58
4 讨论.....	65
4.1 人口学特征分析.....	65
4.2 高危型 OLGA 分期的相关因素分析	65
4.3 高危型 OLGIM 分期的相关因素分析	67
4.4 OLGA 与 OLGIM 分类系统的侧重及差异	68
第二部分 单细胞转录组测序解析 H.pylori 相关性胃癌前病变上皮细 胞分化图景	69
概述.....	69
1 材料与方法.....	70
1.1 数据下载.....	70
1.2 单细胞 RNA-seq 数据分析及数据挖掘过程	70
2 统计方法.....	71

3 结果.....	72
3.1 一般资料.....	72
3.2 单细胞图谱细胞类群鉴定及细胞比例分析	73
3.3 H.pylori 不同感染状态的单细胞分析及关键基因通路鉴定 ...	76
3.4 构建参白颗粒干预胃上皮细胞类群“活性成分-靶点-细胞类群”模型	83
4 讨论.....	85
第三部分 参白颗粒干预 H.pylori 急、慢性感染过程中胃黏膜细胞增殖、自噬以及凋亡的机制	90
1 材料与方法.....	90
1.1 主要实验仪器和软件.....	90
1.2 主要实验试剂.....	92
1.3 实验细胞、细菌、动物.....	93
1.4 中药复方参白颗粒的制备.....	93
2 实验方法.....	93
2.1 H.pylori 培养	93
2.2 细胞培养	94
2.3 建立 H.pylori 急性/慢性感染 GES-1 细胞模型	94
2.4 中药复方参白颗粒含药血清的制备.....	95
2.5 透射电镜观察细胞急性/慢性感染组细胞超微结构的变化 ...	96
2.6 CCK8 法检测细胞增殖活性	96
2.7 ELISA 检	96
2.8 Real time Quantitative PCR (qPCR)检测	97
2.9 细胞划痕实验.....	99
2.10 Transwell 侵袭实验.....	99
2.11 AnnexinV-APC/7-AAD 双染色法检测细胞凋亡	100
2.12 Western Blottin 检测蛋白质表达	100
3 结果.....	102
3.1 参白颗粒干预最佳剂量筛选.....	102
3.2 参白颗粒含药血清提高 H.pylori 急性感染期抑制的 GES-1 细胞增殖水平	103
3.3 参白颗粒提高 H.pylori 急性感染抑制的 GES-1 细胞自噬相关基因/蛋白水平	104
3.4 H.pylori 急性感染诱导 GES-1 细胞促炎因子分泌增加	108
3.5 参白颗粒含药血清抵抗 H.pylori 慢性感染期 GES-1 细胞增殖水平	109
3.6 参白颗粒抑制 H.pylori 慢性感染诱导增强的 GES-1 细胞迁移与侵袭能力	110

3.7 参白颗粒抑制 H.pylori 慢性感染诱发的 GES-1 细胞自噬相关 基因/蛋白水平	112
3.8 参白颗粒激活 H.pylori 慢性感染诱导的 GES-1 细胞凋亡抵抗	116
4 讨论.....	118
4.1 H.pylori 急性感染与慢性感染共培养模型的建立.....	118
4.2 参白颗粒用于治疗胃癌前病变临床研究的源流	118
4.3 参白颗粒对急、慢性感染中胃黏膜细胞增殖、自噬的影响	119
结语.....	121
参考文献.....	123

摘要

目的和意义: 本研究拟通过胃癌风险评估系统 OLGA (operating link for gastritis assessment, OLGA) /OLGIM (operating link for gastric intestinal metaplasia, OLGIM) 对患者进行风险分层, 重点研究高危型胃癌前病变患者的内镜特征, 评估传统白光内镜 (Conventional White-Light Imaging Endoscopy, C-WLE) 联合放大窄带成像技术 (Magnifying Endoscopy - Narrow band imaging, ME-NBI) 在识别 *H.pylori* (*Helicobacter pylori*, *H.pylori*) 相关性胃癌前病变患者中的临床应用价值, 以期为内镜下判别高危型胃癌前病变提供诊断依据; ME-NBI 下仅限于观察黏膜浅表层的腺体形态及微血管特征, 对于腺颈部以下及其基底部以及横向的细胞形态特征无法得到有效的观察, 因此以单细胞测序技术解析 *H.pylori* 相关性胃癌前病变整个上皮细胞类群的分化图景, 以期找到胃癌前病变发生发展过程中的关键靶点与关键细胞类群, 然后辅以细胞实验建立 *H.pylori* 与细胞共培养模型以探究 *H.pylori* 在急性感染及慢性感染过程中发挥作用的机制, 同时加入参白颗粒含药血清干预, 借以明确中药复方发挥疗效的靶点通路。

研究方法:

1 临床研究识别高危型 *H.pylori* 相关性胃癌前病变内镜下特征

本试验纳入了使用C-WLE、ME-NBI技术以及具有活检病理组织学结果的患者共计422例, 将金标准病理结果按照OLGA/OLGIM对患者分层后, 对每位患者的C-WLE、ME-NBI内镜图片, 依据京都胃炎分类判定*H.pylori*感染的状态, 其次描述病变部位及方位, 病变的形态特征, 将上述内容归纳整理后开始进行统计学分析。将组间有统计学意义 ($P < 0.05$) 的指标进行多重共线性诊断, 筛选可以入组贝叶斯 (Bayes) 逐步判别分析法的变量, 剔除不能入组的变量, 建立基于C-WLE及ME-NBI结合的OLGA/OLGIM分期胃癌前病变的综合诊断模型, 并采用自身检验法和留一交叉验证法检验模型的准确率, 最后构建受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线对诊断模型效能进行评价, 双侧检验 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 单细胞测序技术描绘胃黏膜上皮细胞类群分化图景

本实验纳入了 10 例 *H.pylori* 相关的单细胞数据将其分类为 *H.pylori* 现症感染组 5 例以及 *H.pylori* 既往感染组 5 例, 对多样本进行整合、去批次以及数据质控后等数据清

洗后进行拟时序分析以展现上皮细胞类群的轨迹推断分析,同时运用 CellphoneDB 算法来计算胃黏膜上皮细胞类群之间潜在配体-受体相互作用,以网络图形式描绘各类群细胞间的互作关系;继以中药网络药理学构建参白颗粒干预胃黏膜上皮细胞各类群表达基因的“活性成分-靶点-细胞类群”模型,探索参白颗粒干预 *H.pylori* 相关胃癌前病变的有效作用靶点。

3 细胞实验构建 *H.pylori* 与细胞共培养模型探究细胞异常增殖分化通路

细胞实验通过建立 *H.pylori* 感染人胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 的共培养模型,利用 *H.pylori* 急性感染 (短期共培养) 和慢性感染 (长期持续共培养) 两种模型来探究在此过程中 GES-1 细胞增殖、干性、自噬、侵袭、迁移、凋亡等变化,同时加入了课题组临床验证的有效方剂参白颗粒,并探究参白颗粒在急性感染与慢性感染过程中对 *H.pylori* 诱导的细胞异常增殖、自噬以及凋亡等过程的影响。

研究结果:

1 临床相关研究

使用 Bayes 判别法探究与因变量 OLGA (低危型/高危型) 的关系后,得到与高危型 OLGA 关系密切的变量类目有病变部位 (胃体下部大弯侧) (X_9)、C-WLE 下可见明显肠化斑 (X_{17})、病变大小 (X_{18})、由背景黏膜的小凹边缘上皮环绕的内侧有凸出的明显的分界线 (Multiple Convex Demarcation Line, MCDL) 的有无 (X_{26}) 以及 MCDL 边界是否规整 (X_{27}),同时得到高危型 OLGA 判别方程 $=-8.287+3.069X_9+1.433X_{17}+4.519X_{18}-0.556X_{26}+2.487X_{27}$ 。通过对以上的诊断模型进行验证,得到该方程的 ROC 曲线下面积 (Area under the receiver operating characteristic curve, AUC) 为 0.904 (95% CI, 0.870~0.939),特异性为 81.6%,敏感性为 87.5%,表现出较高的高危 OLGA 诊断效能。

同时对高危型 OLGIM 相关因素进行分析后发现病变部位 (胃体小弯侧) (X_4)、病变部位 (胃体下部大弯侧) (X_9)、病变大小 (X_{18})、DL 的有无 (X_{20})、WGA 的有无 (X_{25})、MCDL 边界是否规整 (X_{27}) 以及上皮环内血管模式 (Vessels within Epithelial Circle pattern, VEC pattern) 的有无 (X_{28}) 等 7 个变量类目与高危型 OLGIM 具有较强的相关性,同时得到高危型 OLGIM 的判别方程式为

$=-10.128+1.403X_4+3.899X_9+4.484X_{18}-9.699X_{20}+3.505X_{25}+10.252X_{27}+3.310X_{28}$ ，对方程进行验证后发现，OLGIM 诊断模型的 AUC 值为 0.950 (95% CI, 0.926~0.974)，敏感度为 82.8%，特异性为 95.8%，显示了较高的诊断效能。

2 单细胞测序结果

通过拟时序轴构建胃黏膜上皮细胞类群演化轨迹图后，拟时序轴起始端为潘氏细胞、MKI67+ progenitor 细胞以及壁细胞、成纤维细胞，其中潘氏细胞与 LGR5+ stem 细胞之间有密切的关联。而在起始端的壁细胞、MKI67+ progenitor 细胞在组织损伤后消失、死亡。然后通过建立了细胞互作网络图来直观的展示各细胞类群之间的通讯关系，在细胞强度互作方面，LGR5+ stem 细胞、肠内分泌细胞与 Pit mucous 细胞、成纤维细胞、潘氏细胞以及主细胞之间存在较强的关联，继而通过细胞间相互作用关系网络发现巨噬细胞迁移抑制因子 (Macrophage migration inhibitory factor, MIF) (CD74-CXCR4)、MIF (CD74-CXCR2) 以及 MIF (CD74-CD44) 配体-受体对在上述细胞类群互作关系之间普遍存在，且相互作用程度最强。同时运用网络药理学技术，构建中药复方参白颗粒干预胃黏膜上皮细胞各类群表达基因的“活性成分-靶点-细胞类群”模型后得到参白颗粒发挥疗效的关键活性成分为槲皮素、木犀草素、山奈酚、豆甾醇、 β -胡萝卜素、 β -谷甾醇。

3 细胞实验结果

通过建立 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养模式模拟 *H.pylori* 胃内急性感染与慢性长期感染的状态。*H.pylori* 与 GES-1 细胞短期共培养时，*H.pylori* 可抑制 GES-1 细胞增殖活性，抑制细胞自噬水平。在经过一个月的长期共培养后，持续暴露于 *H.pylori* 环境下的 GES-1 细胞增殖水平提高，细胞自噬增强，细胞的侵袭以及迁移能力均有所提高，并且长期感染后的细胞在透过 transwell 小室时，与对照组相比，可以发现细胞形态发生了明显的变化，细胞牵拉伸长，侵袭能力增加；同时长期感染的 GES-1 细胞的凋亡率明显下降，具备了一定的抗凋亡特性；在加入参白颗粒含药血清干预后，慢性感染的 GES-1 细胞增殖明显被抑制，而细胞凋亡率被提高，导致凋亡指数/增殖指数比率显著增加，这表明参白颗粒可以扭转上述细胞恶变的趋势。

研究结论：

1 高危型 OLGA 分期与病变部位（胃体下部大弯侧）、C-WLE 下可见明显肠化斑、病变大小、MCDL 的有无以及 MCDL 边界是否规整等变量类目关系密切；高危型 OLGIM 分期与病变部位（胃体小弯侧）、病变部位（胃体下部大弯侧）、病变大小、DL 的有无、WGA 的有无、MCDL 边界是否规整以及 VEC pattern 的有无等 7 个变量类目具有较强的相关性。

2 构建 *H.pylori* 感染后的胃黏膜上皮细胞类群分化轨迹图谱以及细胞互作网络图可以发现，LGR5+ stem 细胞在胃癌前病变上皮细胞的恶性增殖分化中具有重要地位。

3 *H.pylori* 与 GES-1 细胞短期共培养后，细胞增殖活性下降，细胞自噬受抑制，分泌大量的促炎因子，而在长期共培养后，正常的 GES-1 细胞表现出癌症干细胞（Cancer stem cells, CSCs）样转化，细胞出现异常增殖活性、抗凋亡特性以及能够激活细胞自噬以维持干细胞特性，加入参白颗粒含药血清干预后，细胞增殖能够得到有效的抑制，细胞凋亡率提高，自噬水平受抑制，同样可以降低 CSCs 样细胞的迁移以及侵袭能力从而减少 CSCs 样细胞的动态生长。

关键词：单细胞转录组测序；*H.pylori* 相关性胃癌前病变；LGR5+ stem 细胞；胃黏膜上皮细胞；细胞自噬

ABSTRACT

Objective: In this study, patients were risk stratified by the gastric cancer risk assessment system OLGA/OLGIM, focusing on the endoscopic characteristics of high-risk patients with gastric precancerous lesions. To evaluate the clinical application value of C-WLE combined with ME-NBI in the identification of *H.pylori* related gastric precancerous lesions, in order to provide diagnostic basis for the identification of high-risk gastric precancerous lesions under endoscopy. The evolutionary trajectory of *H.pylori* related gastric precancerous lesions epithelial cells was analyzed single cell sequencing technology, in order to find the key targets and key cell groups in the occurrence and development of gastric precancerous lesions. Then, combined with cell experiments, a co-culture model of *H.pylori* and cells was established to explore the mechanism of *H.pylori* in the process of acute infection and chronic infection, and Shenbai granules drug-containing serum was added to intervene, so as to clarify the target pathway of the therapeutic effect of Chinese medicine compound.

Methods:

1 Clinical studies to identify endoscopic features of high-risk *H.pylori* associated gastric precancerous lesions

A total of 422 patients with C-WLE and ME-NBI techniques and biopsy histopathological results were included in this study. After stratification of patients with gold standard pathological results according to OLGA/OLGIM, C-WLE and ME-NBI endoscopic images of each patient were used to determine the status of *H.pylori* infection according to the Kyoto gastritis classification. Secondly, the location and orientation of the lesions and the morphological characteristics of the lesions were described, and the above contents were summarized and sorted out for statistical analysis. Multicollinear diagnosis was performed for indicators with statistical significance between groups ($P < 0.05$). Variables that could be included in Bayes stepwise discriminant analysis were screened and those that could not be included were eliminated, and a comprehensive diagnosis model of OLGA/OLGIM staging of gastric precancerous lesions based on C-WLE and ME-NBI was established. The accuracy of

the model was tested by self-testing method and leave-one cross-validation method. Finally, receiver operating characteristic (ROC) curve was constructed to evaluate the efficiency of the diagnostic model. The bilateral test $P < 0.05$ was statistically significant.

2 The differentiation of gastric mucosal epithelial cell group clusters was described by single cell sequencing

In this study, 10 cases of single cell data related to *H.pylori* were included and classified into 5 cases in the *H.pylori* current infection group and 5 cases in the *H.pylori* past infection group. After multiple copies were integrated, batch removal, data quality control and other data cleaning, pseudo-time series analysis was performed to show the trajectory inference analysis of epithelial cell groups. At the same time, CellphoneDB algorithm was used to calculate the potential ligand-receptor interactions among the gastric mucosal epithelial cell groups, and the interaction between the various groups of cells was described in the form of network diagram. Based on the network pharmacology of traditional Chinese medicine, the "active ingredient - target - cell group" model of Shenbai granules in the intervention of various groups of gastric mucosal epithelial cells was established to explore the effective target of Shenbai granules in the intervention of *H.pylori* -related gastric precancerous lesions.

3 The co-culture model of *H.pylori* and GES-1 cells was constructed to explore the pathway of abnormal cell proliferation and differentiation

The cell experiment established a co-culture model of *H.pylori* -infected gastric mucosal epithelial cells (GES-1). Two models of *H.pylori* acute infection (short-term co-culture) and chronic infection (long-term continuous co-culture) were used to explore the changes of proliferation, dryness, autophagy, invasion, migration and apoptosis of GES-1 cells during this process. At the same time, Shenbai Granules, an effective prescription clinically verified by our research group, were added to explore the effects of Shenbai granules on *H.pylori* -induced abnormal cell proliferation, autophagy and apoptosis during acute and chronic infection.

Results:

1 Clinical research

After using Bayes discriminant method to explore the relationship with the dependent variable OLGA (low risk/high risk), The variables that were closely related to high-risk OLGA were lesion location (large curvature of the lower part of the stomach) (X_9), obvious intestinal lesions visible under C-WLE (X_{17}), lesion size (X_{18}), presence or absence of MCDL (X_{26}), and whether MCDL boundaries were structured (X_{27}). At the same time, the discriminant equation of high-risk OLGA was obtained $=-8.287+3.069 X_9+ 1.4333 X_{17} +4.519X_{18}-0.556 X_{18}+2.487 X_{27}$. By verifying the above diagnostic model, the Area under the receiver operating characteristic curve (AUC) of this equation is 0.904 (95% CI, 0.870~0.939). The specificity and sensitivity were 81.6% and 87.5% respectively, indicating high diagnostic efficacy of OLGA at high risk.

After analyzing the related factors of high-risk OLGIM, the lesion location (small curved side of the stomach) (X_4), lesion location (large curved side of the lower stomach) (X_9), lesion size (X_{18}), presence or absence of DL (X_{20}), presence or absence of WGA (X_{25}), MCDL boundary normalization (X_{27}), and VEC pattern or not (X_{28}). There was a strong correlation between seven variables and high-risk OLGIM, and the discriminant equation was obtained $=-10.128+1.403 X_4+3.899 X_9+4.484 X_{18}-9.699 X_{20}+3.505 X_{25}+10.252 X_{27}+3.310 X_{28}$. The AUC value of the OLGIM diagnostic model was 0.950 (95% CI, 0.926-0.974), the sensitivity was 82.8%, and the specificity was 95.8%, indicating high diagnostic efficiency.

2 Single cell sequencing results

After constructing the evolutionary trajectory of gastric mucosal epithelial cell groups through the pseudo-temporal axis, the beginning of the pseudo-temporal axis was Paneth cells, MKI67+ progenitor cells, parietal cells and fibroblasts, among which Paneth cells were closely related to LGR5+ stem cells. However, MKI67+ progenitor cells in the initial parietal end disappeared and died after tissue injury. Then, the communication relationship among various cell groups was visually demonstrated by establishing the cell interaction network diagram. In terms of cell strength interaction, LGR5+ stem cells, enteroendocrine cells, Pit mucous cells, fibroblasts, Paneth cells and main cells were strongly correlated. It was found that MIF (CD74-CXCR4), MIF (CD74-CXCR2) and MIF (CD74-CD44) ligand-receptor

pairs were generally present among the interactions of the above cell groups, and the degree of interaction was the strongest. At the same time, network pharmacology technology was used to establish the "active ingredient-target-cell group" model of the intervention of Chinese herbal compound Shenbai Granules on the expression genes of various groups of gastric mucosal epithelial cells. The key active ingredients of Shenbai granules were quercetin, luteolin, kaempferol, soybean sterol, β -carotene, β -sitosterol.

3 Cell experiment results

A co-culture model of *H.pylori* and GES-1 cells was established to simulate the acute and chronic gastric infection of *H.pylori*. When *H.pylori* was co-cultured with GES-1 cells for a short period of time, *H.pylori* could inhibit the proliferation activity of GES-1 cells and inhibit the level of autophagy. After one month of long-term co-culture, GES-1 cells continuously exposed to *H.pylori* increased their proliferation level, enhanced autophagy, and improved their invasion and migration ability. Moreover, when the cells passed through the transwell chamber after long-term infection, significant changes in cell morphology were found compared with the control group. Cell elongation, invasion ability increased; At the same time, the apoptosis rate of GES-1 cells with long-term infection decreased obviously, and had certain anti-apoptosis characteristics. After the intervention of Shenbai Granules, the proliferation of GES-1 cells in chronic infection was significantly inhibited, and the apoptosis rate was increased, resulting in a significant increase in the ratio of apoptosis index to proliferation index, which indicated that Shenbai granules could reverse the above trend of cell degeneration.

Conclusions:

1 The stage of high-risk OLGA was closely related to variables such as lesion location (large curved side of the lower part of the stomach), obvious intestinal lesions visible under C-WLE, lesion size, presence or absence of MCDL, and regularity of MCDL boundaries. The stage of high-risk OLGIM was strongly correlated with seven variables, including lesion location (small curved side of the stomach), lesion location (large curved side of the lower stomach), lesion size, presence or absence of DL, presence or absence of WGA, regularity of

MCDL boundary and presence or absence of VEC pattern.

2 By constructing the differentiation locus of gastric mucosal epithelial cell groups and cell interaction network map after *H.pylori* infection, it can be found that LGR5+ stem cells play an important role in the malignant proliferation of gastric precancerous lesions epithelial cells.

3 After short-term co-culture of *H.pylori* with GES-1 cells, cell proliferation activity decreased, autophagy was inhibited, and a large number of pro-inflammatory factors were secreted. However, after long-term co-culture, normal GES-1 cells showed Cancer stem cells (CSCs) -like transformation. Cells showed abnormal proliferative activity, anti-apoptotic properties and the ability to activate autophagy to maintain stem cell properties. After the intervention of Shenbai Granules drug-containing serum, cell proliferation could be effectively inhibited, apoptosis rate was increased, autophagy level was inhibited, and migration and invasion ability of CSCs-like cells were also reduced, thus reducing the dynamic growth of CSCs-like cells.

KEYWORDS: single-cell transcriptome sequencing, *H.pylori* associated gastric precancerous lesions, LGR5+ stem cells, gastric mucosal epithelial cells, Autophagy

符号说明

缩略词	英文全称	中文全称
AUC	Area under the receiver operating characteristic curve	ROC 曲线下面积
Bayes	Bayes	贝叶斯
CAG	Chronic Atrophic Gastritis	慢性萎缩性胃炎
CNAG	Chronic Non-Atrophic Gastritis	慢性非萎缩性胃炎
CSCs	Cancer stem cells	癌症干细胞
C-WLE	Conventional White-Light Imaging Endoscopy	传统白光内镜
DL	Demarcation Line	分界线
Dys	Dysplasia	异型增生
EFB	Endoscopic Forceps Biopsy	活检钳活检
EGC	Early Gastric cancer	早期胃癌
GC	Gastric Cancer	胃癌
HGIN	High-Grade Intraepithelial Neoplasia	高级别上皮内瘤变
<i>H.pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	幽门螺杆菌
IM	Intestinal metaplasia	肠上皮化生
LBC	Light Blue Crest	亮蓝嵴
LGIN	Low-Grade Intraepithelial Neoplasia	低级别上皮内瘤变
MCDL	Multiple Convex Demarcation Line	由背景黏膜的小凹边缘上皮环绕的内侧有凸出的明显的分界线
ME-NBI	Magnifying Endoscopy - Narrow band imaging	放大窄带成像技术

符号说明（续表）

缩略词	英文全称	中文全称
MESDA-G	Magnifying Endoscopy Simple Diagnostic Algorithm for Early Gastric Cancer	放大内镜诊断简化流 程
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	巨噬细胞迁移抑制因 子
MSP	microsurface pattern	表面微结构
MVP	microvascular pattern	微血管构造
OLGA	operating link for gastritis assessment	胃炎评估系统
OLGIM	operating link for gastric intestinal metaplasia	基于肠化生的胃炎评 价系统
RAC	Regular Arrangement of Collecting Venules	集合小静脉
ROC	receiver operating characteristic	受试者工作特征
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SPEM	Spasmolytic Ploypeptide Expressing Metaplasia	解痉多肽表达化生
VEC pattern	Vessels within Epithelial Circle pattern	上皮环内血管模式
VIF	variance inflation factor	方差膨胀因子
WB	Western Blotting	免疫蛋白印迹
WGA	White Globe Appearance	白球征
WOS	White Opaque Substance	白色不透明物质
WZ	White Zone	腺管白区

文献综述

综述一 中医药防治幽门螺杆菌相关性胃炎研究进展

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H.pylori*) 以下简称 *H.pylori*, 是一种微需氧、革兰氏阴性杆菌, 其具有多种毒力因子, 包括尾部鞭毛引导的运动性、脲酶提供的 *H.pylori* 氮源、外膜蛋白家族介导的粘附素、细胞毒素相关基因 A、空泡细胞毒素 A 等, 能够使其与宿主 (人胃黏膜) 细胞达到长期的动态平衡, 实现其在人胃黏膜中长期定植的状态。

H.pylori 已被归类为 I 类致癌物, 越来越多的证据表明, *H.pylori* 是 Correa 级联反应中慢性胃炎向胃腺癌转化的过程的启动因子, 是已被证明的可以导致胃癌的环境危险因素。*H.pylori* 全球感染率达 60% 以上, 对 *H.pylori* 进行有针对性的监测及根除, 能够控制全球的胃癌发病率^[1]。*H.pylori* 感染后胃黏膜处于持续的炎症状态, 常见的临床表现有嗝气、胃痛、恶心、反酸、腹部不适等, 被称为幽门螺杆菌相关性胃炎 (*Helicobacter pylori*-associated gastritis, HPAG)^[1]。根除 *H.pylori* 不仅可以改善胃部多种不适症状, 同时可以降低胃癌的发病率。目前国内外治疗 HPAG 主要通过抗菌、抑制胃酸分泌、保护胃黏膜的三联或者四联综合疗法。但是目前存在的问题是 *H.pylori* 初次根除失败率逐渐升高, 这与 *H.pylori* 对抗生素的耐药性逐渐增加以及 *H.pylori* 并不会从根本上改变宿主环境有关。此外, 服用抗生素过程中, 其刺激胃肠道导致的不适症状极大的降低了患者的服药依从性, 这也是导致 *H.pylori* 除菌失败的关键因素之一。因此, 以抗生素为主的三联、四联杀菌方案出现了一定的缺陷性, 所以寻找合适的药物来扩大目前的用药需求并应对高 *H.pylori* 的耐药率是我们亟待解决的问题。

鉴于目前尚未出现有效的、能够规避以上问题的西药, 越来越多的研究者将目光转向中医药。随着中西医结合的理念逐渐深化, 中医药参与到 *H.pylori* 的防治工作中取得了较为可喜的成绩。中医治疗强调整体性, 重视调节人体的平衡, 这体现在中医药在防治 *H.pylori* 方面, 不单是对致病微生物的根除, 同样着重于胃黏膜的修复, 调节人体全身的免疫, 这正是印证了《黄帝内经》中的“正气存内, 邪不可干”的观点。

在《2022 中国幽门螺杆菌感染治疗指南》^[2]以及《中国慢性胃炎诊治指南》^[3] (2022, 上海) 的治疗部分均提出使用中药制剂可行性。中药制剂有多种活性成分组成, 具有广

泛的药理活性，可以作为一种联合疗法加入到 HPAG 的治疗中，这提供了一条可以治疗 HPAG 的重要潜在途径。研究表明，铋剂四联方案联合中药制剂有利于提高 *H.pylori* 感染根除率以及某些中药制剂干预可以逆转肠化生，从而降低癌前病变的风险。

本综述将就中医药治疗 HPAG 的最新研究进展作一综述，并对相关中药的有效成分及作用机理进行阐述，以期对中医药防治 HPAG 提供进一步启示。

1 HPAG 的中医病名认识

HPAG 的病名在中医典籍中并无明确的记载，1982 年以前 *H.pylori* 是并不被医疗工作者所认识的，*H.pylori* 概念的提出丰富了慢性胃炎的病因学范围。HPAG 临床表现多见胃脘疼痛、腹胀、嗝气、反酸等，根据相关症状，参考《慢性胃炎中医诊疗专家共识》（2023）^[4]意见及《中国病证分类及代码》^[5]，可将其诊断为“胃脘痛”、“胃痛”、“痞满”、“胃痞”的疾病范畴。

1.1 胃痞（痞满）

患者自觉胃脘痞塞，胸膈胀满，触之无形，按之柔软，压之不痛为主要症状的病证。文献中有记录的“否”、“否满”、“否膈”即是本证。“否”作为病名首次出现于《素问·五常政大论篇》，原文为“备化之纪，气协天休，……，其气平，其性顺，其化丰满，……，其政安静，其候溽蒸，其令湿，其脏脾，脾其畏风，其主口，……，其病否，其味甘，其音宫，……。”可见痞满最初病位在脾。后东汉张仲景在《伤寒论》^[6]提出“心下痞”的病名，指“但满而不痛者，此为痞”，定义了痞为满而不痛的特点，进而提出五泻心汤的方药，自此后世即沿用“痞满”的病名。此后各医家对痞满的病因病机及治法进行了详细的论述。龚廷贤著作《万病回春》^[7]中有“非痞块之痞也，乃胸腹饱闷而不舒畅也。”指出痞满并非实物积块，成因乃胸腹饱闷气机郁滞。后有张景岳在《景岳全书·杂病谟·痞满》^[8]一书中将“痞”与“满”两证进行细致的区分，将“痞”定义为“痞塞不开”，“满”则为“胀满不行”，故有“满则近胀，而痞则不必胀也”，又将“痞”分为实痞、虚痞，认为“有邪有滞而痞者，实痞也；无物无滞而痞者，虚痞也。”又有林珮琴在《类证治裁·痞满》^[9]中将痞满按照病因分为伤寒痞与杂病痞两种，谓之“伤寒之痞，从外之内，故宜苦泄。杂病之痞，从内之外，故宜辛散。”；在 1989 年 10 月全国第五届全国脾胃病学术会议中将慢性萎缩性胃炎病名定义为“胃痞病”并沿用至今^[10]。

1.2 胃脘痛（胃痛）

此病名最早见于《素问·五常政大论篇》“少阳司天，火气下临，肺气上从，……，风行于地，尘沙飞扬，心痛胃脘痛，厥逆膈不痛，其主暴速。”此即为关于胃脘痛病名的首次历史记载，在《内经》中尚有类似病名如“心痛”、“厥心痛”、“胃心痛”、“胃痛”等。至孙思邈在《备急千金要方·心腹痛》^[11]中提到的九种心痛“九痛丸，治九种心痛，一虫心痛，二疰心痛，三风心痛，四悸心痛，五食心痛，六饮心痛，七冷心痛，八热心痛，九来去心痛，此方悉主之。”此九种心痛乃心痛成因，此中心痛病名乃现代胃痛；宋代陈无择在《三因极一病证方论·九痛叙论》^[12]中将心痛与真心痛进行鉴别开来，有“夫心痛者。在方论则曰九痛。内经则曰举痛，一曰卒痛。种种不同，以其痛在中脘，故总而言之曰心痛，其实非心痛也。若真心痛，则手足青至节，若甚，夕发昼死，昼发夕死，不在治疗之数。”此中将《内经》中“举痛”、“卒痛”等病名明确归为“心痛”，即是痛在中脘的“胃痛”范畴，并将其与真心痛区别开来；至金元时期，李东垣著有《兰室秘藏·中满腹胀门·胃脘痛门》^[13]中设“胃脘痛”一门，并首次提出“胃脘痛”的病名，指出其症状为噎气、腹胀，与脾有关，明确了胃脘痛的病因病机、临床表现与治疗等；张景岳在《景岳全书》中启用胃脘痛病名，有“凡病心腹痛者，有上中下三焦之别。上焦者，痛在膈上，此即胃脘痛也，《内经》曰胃脘当心而痛者即此。”同时期虞抟在《医学正传·胃脘痛》^[14]中将孙思邈描述的九种心痛明确为胃脘痛，“古方九种心痛，……，夫所谓冷者惟一耳，岂可例以热药治之乎。详其所由，皆在胃脘，而实不在于心也。”后世医家逐渐将胃脘痛与心痛范畴区别开来，并提出了明确的鉴别诊断，确立了“胃脘痛”的病名，并逐渐规范了胃脘痛的含义、病因病机以及治法方药。

2 中药复方治疗 HPAG 的临床研究

《2022 中国幽门螺杆菌感染治疗指南》^[2]中建议的质子泵抑制剂联合 2 种抗生素的三联方案或者质子泵抑制剂、铋剂联合 2 种抗生素的四联杀菌方案是目前临床上较为普遍的根除 *H.pylori* 方案，但随着耐药性的逐渐增加，以及抗生素刺激胃肠道带来的患者服药依从性的降低使得 *H.pylori* 初次根除失败率逐渐增加，此时介入中药防治 HPAG 不失为合适的时机。中药介入 HPAG 的治疗不仅可提高 *H.pylori* 的根除率，同时可缓解服用抗生素带来的胃部不适感，从而提高患者的服药依从性，提高 *H.pylori* 首次根除率。

中药复方常为含有两种或者两种以上的中草药组成，疗效比单一中药来说较好，中药以其副作用较少更为国人所接受。目前中药复方主要分为以下三类，古代经典名方、经验方以及中成药^[15]。

2.1 古代经典名方治疗 HPAG 的临床疗效

古代经典名方是古代医家长期临床经验的积累之作，体现了古代医家的用药智慧，是中药经历了数百年临床疗效验证并流传下来，呈现给我们的财富。这些方剂是时间、实践、智慧、经验、历史和人文精神多方面积淀结合的产物，在理论依据、方剂组成、剂量控制、给药方法以及临床疗效方面具有独到的优势和特点。

以半夏泻心汤为代表的古代经典名方在临床治疗 HPAG 方面取得较为明显的效果。半夏泻心汤最早的记载源于东汉张仲景的《伤寒论》^[6]，其方证原文是“但满而不痛者，此为痞，柴胡不中与之，宜半夏泻心汤。”原文方药组成为半夏半升，黄芩、干姜、人参、炙甘草各三两、黄连一两、大枣十二枚，此方是治疗中焦脾胃失和，升降失常的代表方剂。研究显示，半夏泻心汤联合三联、四联疗法在 HPAG 的 *H.pylori* 根除率、改善胃部不适症状、不良反应发生率、生活质量评分等方面均优于单纯的西药三联、四联疗法，同时联合疗法较单纯西药能更明显降低炎症水平^[16-18]。研究显示，半夏泻心汤可能的作用机制是其抑制 toll 样受体（toll-like receptors, TLRs）和核因子- κ B（nuclear factor-kappa B, NF- κ B）信号通路。

连朴饮出自清代医家王孟英的《随息居重订霍乱论》^[19]，原文中对其主治“治湿热蕴伏而成霍乱，兼能行食涤痰。”组方为制厚朴二钱，黄连（姜汁炒），石菖蒲、制半夏各一钱，香豉、焦山栀各三钱，芦根二两。证因感受湿热病邪，蕴伏中焦，气机升降失常，脾不升清，胃不降浊。现代医家根据其病机湿热邪气蕴伏中焦，气机升降失常，将此方用于治疗符合脾胃湿热型 *H.pylori* 感染。研究表明，连朴饮联合四联疗法高于单纯四联疗法的 *H.pylori* 根除率、临床总有效率^[20]，且用药不良反应发生率低于单纯四联疗法^[21]。

藿朴夏苓汤方药组成最初出自石寿棠《医原·湿气论》^[22]“湿气弥漫，本无形质，宜用体轻而味辛淡者治之，辛如杏仁、薏仁、半夏、厚朴、藿梗，淡如苡仁、通草、茯苓、猪苓、泽泻之类。”书中本无方名，后根据《感证辑要》^[23]补上方名，治以湿温初

起，恶寒发热，身热不扬，肢体困倦，肌肉烦疼，面色垢腻，口不渴或渴不欲饮，胸次痞闷，大便溏而不爽，舌苔白滑或腻，脉濡缓或沉细似伏。现代研究将此方常用于治疗脾胃湿热型 HPAG。谢梅娟等人观察 118 例 HPAG 患者，使用藿朴夏苓汤联合四联疗法作为观察组，常规四联疗法作为对照组各 59 例，结果显示，观察组 *H.pylori* 根除率为 93.22%，明显高于对照组 79.66%，同时观察组对于改善患者临床症状表现良好^[24]。

2.2 经验方及中成药治疗 HPAG 的临床研究

经验方是中医师在长期临床实践中积累得到的有效方剂，成分相对稳定，其疗效较为明确，是反映名老中医临床经验和学术思想的重要载体。但由于中医在整体观以及辨证论治的指导下，经验方大不相同，浩如烟海。研究显示，铋剂四联方案加入以大黄、黄连、黄芩为主要成分的中药方剂，可能提高 *H.pylori* 根除率^[2]。

中成药具有生物利用度高、贮藏携带方便、服药方法便捷等优点，其克服了中药传统汤剂需煎煮方可服用的缺点，满足了中药现代化发展的要求。中成药品种日趋丰富，随着其剂型不断创新，质量的逐步提高，收到广大患者的青睐。市售治疗 HPAG 常见的中成药有荆花胃康胶丸、胃苏颗粒、气滞胃痛颗粒、安胃疡胶囊等。多项研究显示，荆花胃康胶丸联合三联的 *H.pylori* 根除率在 90.78%，胃苏颗粒联合三联的根除率在 89.30%，气滞胃痛颗粒的 *H.pylori* 根除率在 85.14%，安胃疡胶囊联合三联的根除率在 85.07%。研究结果显示，中成药联合三联的 *H.pylori* 根除率均优于单用三联疗法，但相应的药物成本也会提高，运用成本-效果分析后得到，荆花胃康胶丸联合三联与胃苏颗粒联合三联是比较具有经济性的方案^[25]。

与单纯的西药治疗 *H.pylori* 相比，中药联合西药治疗能够更有效的根除 *H.pylori*。中医防治 HPAG 的优势更主要体现在一是以改善症状为核心的综合控制优势，不仅是根除 *H.pylori* 外来邪气，同时注意顾护脾胃正气，以临床症状的改善与人身整体的调整作为辨证论治的理念，治疗理念以人为本，体现出中医治疗是关注生病的“人”而不是这个“疾病”本身；另一方面，中药联合西药根除 *H.pylori* 改善西药的不适症状以及耐药性是中药的特殊优势，由于耐药性以及药物不良反应，在根除 *H.pylori* 的治疗上已经从传统的三联疗法（两种抗生素+质子泵抑制剂）转变为含铋剂的四联疗法作为一线治疗。然目前科学研究讲究成分-靶点明确，中药复方具有多成分、多靶点、多途径的特点，

因此在未来我们应该在明确中药成分、验证药物靶点方面作出更大的努力，为中药防治 *H.pylori* 提供更具有力的证据。

3 中药单药及其活性成分治疗幽门螺杆菌感染机制

研究发现，单一中药同样具有抗 *H.pylori* 的作用，且大多具有明确的化学结构，这为临床复方用药提供了更多的选择。此外，中药单药同样具有多靶点和调节人身整体的功能，避免耐药性的产生以及胃肠道菌群的失衡，且副作用尚不明显。因此，从中药中寻找更安全、更有效的抗 *H.pylori* 活性成分是预防和治疗 *H.pylori* 感染的一种新方法。越来越多的实验研究表明，清热解毒类中药在抗 *H.pylori* 治疗中具有更大的优势，被称为“植物抗生素”^[26]。在本综述中，将详细的介绍黄连、黄芩、大黄等苦寒中药及其主要活性成分抗 *H.pylori* 机制研究。

3.1 黄连

黄连为毛茛科植物黄连 (*Coptis Chinensis* Franch)、三角叶黄连 (*C.deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao) 或云连 (*C. teeta* Wall) 的干燥根及根茎，以上三种习称“味连”、“雅连”、“云连”。黄连属清热解毒类中药，性寒，味苦，入心、脾、胃、大肠、胆经。其功效为清热燥湿，泻火解毒。临床常用于湿热痞满、呕吐吞酸、湿热泻痢、高热神昏、心烦不寐、血热吐衄、痈肿疔疮、目赤牙痛、消渴等内治用途，以及湿疹、湿疮、耳道流脓等外治用途。现代中医临证中常将其广泛应用于治疗菌痢、腹泻、肠胃炎等细菌性胃肠道疾病。

黄连中主要含有异喹啉类生物碱，包括原小檗碱类、苯菲啶类、阿朴菲类、双苜基异喹啉类等^[27]。其中原小檗碱类生物碱小檗碱 (Berberine, Ber) 占黄连总生物碱的 44% 左右，被认为是黄连发挥药效的主要活性成分^[28]。临床研究中，Ber 联合标准三联疗法与单纯标准三联疗法相比，可显著提高 *H.pylori* 根除率，增加消化性溃疡愈合率，缓解临床症状，并降低不良事件发生率^[29]。这为临床治疗 *H.pylori* 开辟了新的途径。动物实验研究显示，Ber 干预 *H.pylori* 诱导的慢性萎缩性胃炎大鼠模型后，白介素-17 (Interleukin-17, IL-17)、趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1) 和 CXCL9 等炎症因子水平下调，而血清中胃泌素 17 (Gastrin-17, G-17) 水平显著升高，*H.pylori* 诱发的胃黏膜组织学损伤也得到了缓解。同时，细胞实验证实，

小檗碱改善了 GES-1 细胞的细胞活力和形态。体内与体外研究表明小檗碱可抑制促炎基因及其相关蛋白的表达^[30]。

3.2 黄芩

黄芩为唇形科 (Labiatae) 植物黄芩属 (Scutellaria) 多年生草本植物黄芩 (Scutellaria baicalensisGeorgi) 的干燥根, 与黄连同属清热解毒类药物, 味苦, 性寒, 归肺、胆、脾、胃、大肠、小肠经, 其功效为清热燥湿、泻火解毒, 止血、安胎, 中医临床常应用于湿温、暑湿、胸闷呕恶、湿热痞满、黄疸泻痢、肺热咳嗽、高热烦渴、血热吐衄、痈肿疮毒、胎动不安等。黄芩的主要化学成分为黄酮类化合物, 在已发现的 41 种黄酮类化合物中, 含量较高并具有明显药理作用的是黄芩苷 (baicalin)、黄芩素 (baicalein)、汉黄芩素 (wogonin) 和汉黄芩苷 (wogonoside) ^[31], 其中黄芩苷对 *H.pylori* 的抑制作用研究较为广泛。研究发现, 黄芩苷可非竞争性抑制 *H.pylori* 脲酶巯基活性, 尤其是脲酶活性位点周围的 Cys321, 是作为脲酶抑制剂治疗 *H.pylori* 感染的潜在药物成分^[32]。此外, 体外药敏试验显示, 黄芩苷与黄芩乙醇提取物均表现出较好的体外抗 *H.pylori* 活性, 且黄芩苷的抑菌效果优于黄芩乙醇提取物^[33]。在黄芩苷对 *H.pylori* 诱导人胃黏膜上皮 GES-1 细胞损伤的机制研究中^[34], 发现黄芩苷可通过抗炎、促增殖并抗凋亡减轻 *H.pylori* 诱导的 GES-1 细胞损伤, 可能通过抑制 p38 MAPK 通路发挥作用。

3.3 大黄

大黄为蓼科植物掌叶大黄、唐古特大黄或药用大黄的干燥根及根茎。掌叶大黄和唐古特大黄称为北大黄, 药用大黄称南大黄, 主产于四川, 其性寒, 味苦, 归脾、胃、大肠、肝、心包经, 属攻下药范畴, 其主要功效为泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经, 临床主要用于治疗积滞便秘、血热吐衄、目赤咽肿、热毒疮疡、烧烫伤、各类瘀血证以及湿热痢疾、黄疸、淋证等, 可“破痰实”, 通脏腑, 降湿浊。现代药理学研究其主要化学成分包括大黄蒽醌衍生物和二蒽酮类及苷类。大黄蒽醌衍生物主要包括芦荟大黄素 (Aloeemodin)、大黄素 (Emodin, 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌)、大黄酚 (Chrysophanol)、大黄酸 (Rhein) 等^[35]。其中芦荟大黄素作为大黄作用最强的抗菌活性成分, 可抑制 *H.pylori* 生长^[36]。有体外研究显示, 芦荟大黄素可破坏 *H.pylori* 生物膜形成, 这为大黄在临床应用中根除 *H.pylori* 提供了有力的证据^[37]。

4 小结

诚如前文所述，全球抗生素耐药率的升高使 *H.pylori* 根除效果面临着巨大挑战，我国 *H.pylori* 感染率仍居高不下，并且 *H.pylori* 感染根除率不断降低，这带来的沉重的公共卫生负担；同时，使用铋剂四联方案在 *H.pylori* 根除过程中带来的胃部不适症状降低了服药的依从性，以上两点给 *H.pylori* 的成功根除带来了极大的挑战。中药以其多靶点、副作用小等优势介入到 HPAG 的防治工作中，通过提高 *H.pylori* 根除率以及调节机体的免疫力达到治疗疾病的目的，不失为潜在治疗 *H.pylori* 感染的新疗法。然而，目前中医药对于防治 HPAG 尚存在着一定的缺陷，辨证论治处于中医治疗疾病的核心地位，*H.pylori* 感染的中医证候相对复杂，鉴于其 *H.pylori* 具有不同的菌株分型、不同地区环境因素等造成目前很难形成一个被广泛接受的 HPAG 中医证候分型，这也是在本综述中并未涉及 HPAG 中医证候分型的原因，因此后续应进行更多大规模的 *H.pylori* 感染患者的证候学调查，以规范 HPAG 的证候，建立统一的中药疗效评价标准，促进中医药在 HPAG 治疗中的现代化。

综述二 *H.pylori* 依赖 Paligenosis 介导细胞自噬完成胃上皮细胞的 SPEM 转化

1 *H.pylori* 定植胃上皮细胞造成胃黏膜持续损伤的机制

1.1 *H.pylori* 的病理生理学 (Helicobacter pylori pathophysiology)

H.pylori 是革兰阴性、微需氧型微生物。其在光学显微镜下呈 S 形、螺旋形或弧形；在电镜下呈螺旋形弯曲，长度约 1.5 μm -5 μm ，宽度约 0.3 μm -1.0 μm ，菌体表面光滑，末端钝圆，在螺杆菌的一端由 2-6 条带鞘鞭毛形成鞘状鞭毛束而具有高度运动功能^[38]，在 *H.pylori* 分裂时，两端均可见鞘状鞭毛束，长度约为菌体的 1-1.5 倍，粗约 30nm，其鞘状鞭毛束在液体环境下可以游动或者在定居时起到锚定作用。

H.pylori 是由一个编码了~1600 个蛋白质的单个环状染色体组成的容量为~1.6-Mbp 的基因组^[39-40]。*H.pylori* 的核心基因组是由所有 *H.pylori* 菌株中共有的~1100 个基因构成，菌株亚群中发现的其他基因组成了基因组的其余附属部分。

高突变率和由于不同组合导致的高重组率造成 *H.pylori* 菌株之间的基因组内容和基因序列的广泛差异，这是 *H.pylori* 的一个突出特征^[41]。*H.pylori* 的高突变率是因为其缺乏经典的错配修复途径以及其 DNA 聚合酶 I 的促诱变特性^[42-43]。由于菌株之间的重组，DNA 序列多样性使得 *H.pylori* 可以在种群中迅速传播^[44-45]。*H.pylori* 侵入人体后，其 DNA 可以基于同源性整合到染色体中，并且这种染色体的导入具有独特的双峰长度分布，使得 *H.pylori* 能够以极其有效的方式使其基因组适应新环境^[46]，可谓是“真正的强者，从不抱怨环境”。

1.2 *H.pylori* 定植于胃黏膜的发病机制

1) 趋化性

H.pylori 在胃上皮和约 300 μm 厚的黏液中繁殖，这是一个对几乎所有微生物都不友好的特殊生态位。灵长类动物胃腔的 pH 值在 1-5 之间，在这种环境下 *H.pylori* 只能存活 30 分钟，同时，胃内容物也在被定期清除，胃黏膜在不断的更新，因此，*H.pylori* 必须迅速开始定植，同时要定位在更宜居的地方，也就是在距离胃上皮细胞 15 μm 以内^[47]，以及胃腺深处^[48]。趋化性促进 *H.pylori* 定植，趋化性系统能将控制鞭毛旋转与感知环境信号相结合，调节 *H.pylori* 运动以远离有害条件并转向有利条件。*H.pylori* 能够通

过胃粘液中的 pH 值和碳酸氢盐梯度完成定向定植^[47]，这对于其进入粘液层并维持粘液量至关重要。

趋化性在早期感染的前三个月内是至关重要的，趋化性缺失的突变体 (*che*⁻) 在胃窦处出现明显的定植缺陷。*che*⁻型 *H.pylori* 能够在感染后一个月达到正常的定植水平，在感染后 6 个月内保持相当的水平^[49]，因此可以说 *H.pylori* 定植的一个标志是其实现了慢性感染的能力。

2) 脲酶 (Urease)

H.pylori 可以产生大量的脲酶，*H.pylori* 由于脲酶的活性而能够在酸休克条件下存活，并具有感染胃黏膜的能力。*H.pylori* 对酸休克最大的反应之一是脲酶的镍化^[50]，辅助蛋白系统可获取所需的镍元素，镍对脲酶全酶活性至关重要，可以保护细菌免受镍毒性，并通过控制尿素流入细菌细胞来调节脲酶活性^[51]。

脲酶是促进 *H.pylori* 在胃黏膜内定植的关键因素，脲酶阴性突变体在生理 pH 值下不能像脲酶阳性 *H.pylori* 菌株在胃黏膜上定植，很可能是因为脲酶通过将尿素裂解成氨和二氧化碳，在 *H.pylori* 传播过程中遇到非常低的 pH 值时，可以短时间内存活^[52]。通过脲酶活性，尿素为 *H.pylori* 提供始终可用的氮源。

3) 粘附性

H.pylori 可以通过将锚定在其外膜上的表面分子 (粘附素) 附着在宿主细胞受体上，从而粘附到胃上皮细胞上。尽管上皮细胞脱落、粘液层周转以及胃排空这些物理力量都尽量降低 *H.pylori* 定植，但粘附性使得 *H.pylori* 能够实现高定植。

外膜蛋白 (outer membrane protein, OMP) 家族包括唾液酸结合粘附素 (Sialic acid-binding adhesin, SabA)、血型抗原结合粘附素 (Blood group antigen-binding adhesin, BabA)、外层炎症蛋白 A (Outer inflammatory protein A, OipA) 和粘附相关脂蛋白 A 和 B (Adherence-Associated Lipoprotein A and B, AlpA/AlpB)^[53]，OMPs 对于胃中细菌的定植和炎症的持续存在具有重要意义。

BabA 是一种毒力因子，可使 *H.pylori* 粘附在胃上皮上，并将毒素 (如细胞毒素相关基因 A (Cytotoxin-Associated Gene A, CagA)、空泡细胞毒素 A (Vacuolating Cytotoxin A, VacA)) 或其他毒力因子输送到宿主细胞中，通过炎症或免疫反应促进宿主组织的直

接或间接损伤。有研究表明, BabA2 可作为一种诊断 *H.pylori* 感染的生物标志物。BabA 可粘附在胃上皮中表达 H-type1 和 ABO/Lewis (Le^b) 的血型抗原上, 促进 TSS4 活性, 释放过量的促炎因子, 刺激癌变。BabA、CagA、VacA 具有协同作用, 可加重胃炎患者的严重程度和临床结局^[54]。

SabA 是一种属于 OMPs 家族的粘附素, 通过与 Le^x 抗原结合促进 *H.pylori* 粘附在胃上皮细胞上, SabA 存在于大约 40% 的 *H.pylori* 菌株中。在胃微环境中, *H.pylori* 诱导的炎症状态下, SabA 的表达显著增加。SabA 的表达与 *H.pylori* 感染期间胃部疾病的进展、中性粒细胞过度浸润以及萎缩有关, 同时, SabA 的表达与 *H.pylori* 定植密度存在关系^[55-56]。

由 hopH 基因编码的 OipA 属于 OMPs 家族。由于 OipA 被证明是宿主上皮细胞产生 IL-8 所必需的, 因此被命名为外层炎症蛋白^[57]。OipA 作为 *H.pylori* 毒力因子, 与 *H.pylori* 的粘附、定植、诱导和胃肠道疾病的进展密切相关, 并可能影响 *H.pylori* 感染者的临床预后。与 OipA 阴性 *H.pylori* 菌株相比, OipA 阳性 *H.pylori* 菌株更容易在胃黏膜中诱发更严重的炎症。与单纯胃炎患者相比, 胃癌前病变患者的胃活检标本可以更普遍地检测到 OipA。OipA 能够促进多种促炎细胞因子的分泌, 如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-11、IL-17、基质金属蛋白酶 I (Matrix Metalloproteinase 1, MMP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 以及 RANTES 等^[58-60]。在基因 CagA、VacA 以及 OipA 共表达的 *H.pylori* 菌株中, 毒力因子之间存在着较强的协同作用。CagA 和 VacA 的合成被认为受到 OipA 基因表达的调控^[61]。

AlpA/AlpB 是参与 *H.pylori* 粘附到胃上皮和进一步刺激细菌定植的蛋白质^[62]。与表达高水平 AlpA/AlpB 的菌株相比, AlpA/AlpB 缺陷的 *H.pylori* 突变体与胃上皮细胞的结合能力显著降低。AlpA/AlpB 可以调节多种细胞因子及促炎因子 (IL-6、IL-8) 的释放, 并可能参与 ERK、c-Fos、c-Jun、CREB、AP-1、NF- κ B 等通路的激活^[63]。

4) 细胞毒素相关基因 A

H.pylori 菌株可分为两种亚型—细胞毒素相关基因 A (Cytotoxin-associated gene A, CagA) 阳性和 CagA 阴性 *H.pylori* 菌株。CagA 致病性岛 (Cag pathogenicity island, cagPAI) 在致癌过程中起到关键作用, 编码了 CagA 和 4 型分泌系统 (type 4 secretion system, T4SS)。携带有 cagPAI 的 *H.pylori* 附着在宿主细胞上, 通过 T4SS 形成的菌毛注入到细

胞中, 诱导细胞改变从而损害细胞运动、细胞增殖和凋亡, 并且改变整个细胞骨架的排列。*H.pylori* 粘附在胃上皮细胞促进 CagA 上调的过程受到 Fur 蛋白的控制^[64]。CagA 与炎症反应和胃黏膜损伤呈正相关, 但 CagA 并不是 *H.pylori* 诱导胃黏膜进一步损伤的唯一决定性毒力因素。

与 CagA 阴性菌株相比, CagA 阳性菌株具有运动性, 这表明 CagA 与 *H.pylori* 的运动具有一定的关系^[65]。运动是 *H.pylori* 定植所必需的条件, 是能够持续感染胃黏膜上皮的重要因素。胃上皮细胞中 CagA 的上调需要鞭毛调节系统, 这说明 *H.pylori* 运动与 CagA 之间存在着协作关系^[66]。

CagA 阳性 *H.pylori* 菌株感染与患者较差的临床严重程度以及结果有关。CagA 阳性的 *H.pylori* 菌株可刺激促炎细胞因子 IL-8 分泌; 此外, T4SS 可能通过肽聚糖片段递送至宿主细胞中来参与这一复杂过程, 宿主细胞能够激活 Nod1, 从而诱导 IL-8 的分泌^[67]。特定的 CagA 基因型在胃上皮细胞中表现出 IL-8 分泌、炎症反应或凋亡的不同严重程度。同时感染表达 CagA 阳性 *H.pylori* 菌株的患者发生胃癌前病变和胃癌的风险增加^[68], 这可能与 CagA 启动子区域变异有关^[69]。

CagA 通过多种途径促进癌变。CagA 具有抗凋亡的作用, 刺激鞭毛运动, 诱导宿主细胞生长增殖。有研究表明, CagA 阳性 *H.pylori* 菌株刺激 CDX1 过表达可能促进胃癌的发生和进展^[70]。此外, CagA 与胃黏膜的上皮-间充质转化 (the Epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的诱导和进展高度相关, 从而造成更大的侵袭性, 该过程可能通过下调程序性细胞死亡蛋白 4 (Programmed cell death protein 4, PDCD4) 的水平^[71]、诱导癌症干细胞样特性的表达^[72]、降低糖原合成酶激酶 3 (Glycogen synthase kinase 3, GSK-3) 的活性^[73]、过度激活成纤维细胞^[74]、抑制 microRNA-134 的活性^[75]、激活 yes 相关蛋白 (the Yes-associated protein, YAP) ^[76] 通路以及下调 Afadin 蛋白水平^[77]。EMT 是致瘤的标志, 其特征是从上皮表型转变为间充质表型, 上皮细胞失去细胞间粘附并获得间充质性状。在这个过程中, 上皮细胞发生了显著的变化, 包括加强细胞延伸、丧失极性并获得迁移性和侵袭性细胞行为。

5) 空泡细胞毒素 A

VacA 是一种参与孔隙形成的细胞毒素, 其作用机制和最终致病性根据暴露与宿主

细胞的时间略有不同。在急性暴露的情况下, VacA 促进细胞中的自噬途径, 而在慢性暴露期间, VacA 促进受损自噬体的出现, 并诱导细胞内空泡的形成, 使 *H.pylori* 在宿主细胞中存活^[78]。VacA 是使 *H.pylori* 在胃上皮细胞中定植和存活的最关键的毒力因子之一, VacA 基因存在于所有的 *H.pylori* 菌株中。VacA 结合的主要受体类型有受体样蛋白酪氨酸磷酸酶 α 和 β (Receptor-like protein tyrosine phosphatases α and β , RPTP-RPTP α and RPTP β)、低密度脂蛋白受体相关蛋白-1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein-1, LRP-1) 以及鞘磷脂^[79-80]。VacA 基因型已知的包括 s1、s2、m1、m2、s1m1、s1m2、s2m2 和 s2m1。VacA m1 基因型是 *H.pylori* 感染患者中最常见的基因型之一, 该基因型与消化性溃疡疾病之间存在关联^[81]; VacA s1m1 常见于 *H.pylori* 感染的慢性胃炎患者, 而在 *H.pylori* 诱导的胃癌中, s1 和 m1 基因型最为普遍^[82-83]。

不同的 VacA 基因型与不同的胃肠道疾病 (如胃癌、消化性溃疡病) 发病率以及患者的临床结局进一步相关。VacA 阳性菌株与胃癌前病变和胃癌的更高患病率相关^[84]。不同的 VacA 基因型也可能与 *H.pylori* 诱导炎症的严重程度有关。与 CagA 类似的是, VacA 的表达同样依赖 Fur 蛋白^[64]。与 CagA 毒力因子不同的是, VacA 的多态性可能与胃癌的组织学类型相关。

有研究表明^[85], VacA 与 CagA 之间存在着协同作用, 慢性暴露于 VacA 破坏细胞自噬途径, 导致致癌 CagA 在有缺陷的自噬体中积累而无法被蛋白酶体降解, 从而起到协同致癌的作用。同时, 也有证据表明, VacA、CagA 和 BabA 之间存在着系统作用, 这些毒力因素之间的相互作用会显著加重炎症反应, 并与较高的肠上皮化生发生率有关^[86]。

除了细胞自噬以及破坏内体与溶酶体功能外, VacA 还参与许多其他损害胃上皮细胞的过程, 如线粒体功能的改变, 以及细胞凋亡和细胞坏死。此外, VacA 在人胃上皮细胞内吞凹点被吸收汇集, 导致外周核内体的聚集, 这些核内体在更深的细胞质中扩大并相互融合, 形成含有 VacA 的大液泡。这些大液泡直接进入内质网池, 内质网池依次包裹线粒体并与高尔基体接触, 这些被大液泡接触的细胞器伴随着结构的损伤, 从而导致含有不能降解产物的持续细胞的积累。此外, VacA 被证明参与多种免疫反应, 如通过抑制 IFN- β 信号转导通路抑制 T 细胞和 B 细胞的活化和增殖并诱导巨噬细胞凋亡^[87];

同时 VacA 还诱导 IL-8 的过度释放^[88]；VacA 刺激调节性 T 细胞分化为效应 T 细胞，此过程有助于 *H.pylori* 感染的持续存在^[89]。

研究表明，与表达 VacA s2 菌株相比，VacA s1 菌株更容易被根除^[90]。然而，VacA 参与细胞 *H.pylori* 内储存库的形成，在根除 *H.pylori* 治疗后，由于 VacA 产生的细胞内生态位的存在，可以保护 *H.pylori* 免受抗生素的治疗，从而导致治疗后感染复发，因此 *H.pylori* 也能在胃环境中存活^[91]。

2 胃上皮细胞损伤后的细胞修复机制

H.pylori 定植于胃黏膜上诱导胃上皮细胞发生促炎反应，从而将多种免疫细胞募集到黏膜下层，导致慢性活动性胃炎的发生，在大多数患者中，*H.pylori* 定植到胃黏膜数十年是无症状的。胃黏膜的炎症程度是具有个体差异的，这取决于 *H.pylori* 类型、宿主以及环境因素。

H.pylori 菌株是否具有促炎活性在于其是否拥有一个功能性的 CagPAI。在其他毒力因子与宿主相互作用的机制下，如宿主受体与 *H.pylori* 粘附素相结合，促进 *H.pylori* 与上皮细胞的强结合，从而促进了 *H.pylori* 和宿主细胞之间的串扰，有助于 *H.pylori* 在单个宿主中引起反应。胃黏膜长达数十年的炎症状态被认为是导致胃黏膜萎缩的重要驱动力，在慢性炎症状态下，正如 Correa 级联反应概述一般，最终导致胃腺癌的形成。Correa 级联反应描述的是一个多阶段、多因素的过程，从浅表性胃炎开始，进展为慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生（Intestinal Metaplasia, IM）、异型增生，最终发展为胃腺癌。

越来越多的证据表明，在根除 *H.pylori* 后，胃黏膜中依旧存在导致胃上皮细胞癌变的成分，胃上皮细胞在损伤后进行可塑性的修复，并有进展为肿瘤的潜力。

胃上皮细胞可以根据不同的细胞类型划分为不同的区域，正常的、组成活跃的祖细胞在空间上可以与已分化的细胞进行很好的分离，这些分化细胞在损伤后可以被募集成祖细胞。解构胃上皮细胞的组成有助于了解胃黏膜的稳态以及损伤诱导的细胞可塑性。

（图 1）

胃腺体的底部，细胞通过再生的方式成为具有分化能力的祖细胞，这个过程可以在小鼠体内模拟发生，此化生的过程模拟了人类 Correa 级联反应胃腺癌发生的进展过程。

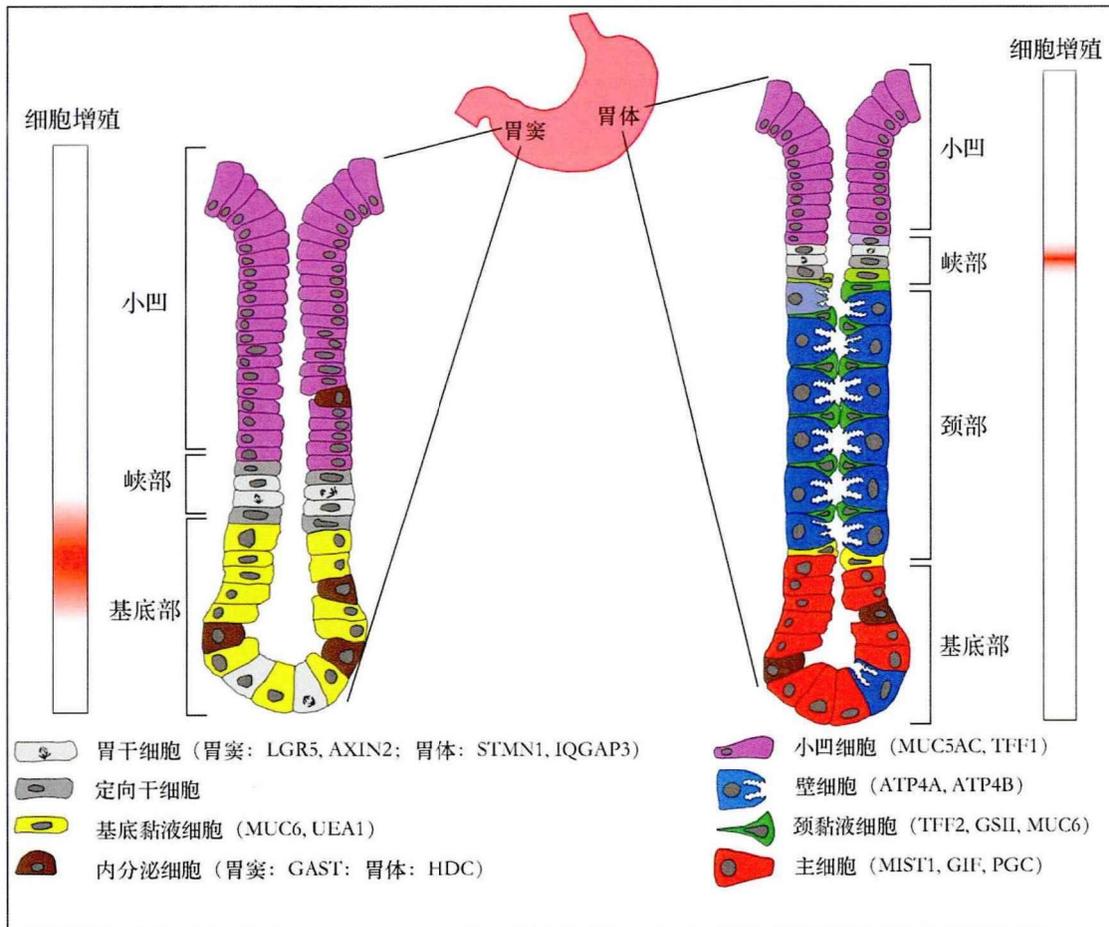


图1 胃窦及胃体腺体细胞谱系构成。胃窦腺体可分为三个区域，由小凹细胞、增殖峡部的干细胞以及基底的深层黏液细胞构成。胃体腺体由小凹细胞构成的凹区、活性干细胞构成的峡部、颈黏液细胞及壁细胞组成的颈部以及主细胞构成的基部这四部分构成。胃窦部分泌胃泌素以及胃体部分泌组胺的腺体可见到少见的内分泌细胞。

在 *H.pylori* 刺激下，胃黏膜处于持续的慢性炎症刺激中，胃体腺体产酸壁细胞的损伤和丢失加速了 Correa 级联过程。随着壁细胞的丢失，整个胃体腺体的结构会发生化生性的变化，这种变化被称为“胃窦化”。即使在根除 *H.pylori* 后，异常的促炎和遗传毒性因子会驱动位于胃体腺体基部的主细胞细胞重编程为增殖、修复化生状态，此时的主细胞具有了胚胎样祖细胞的功能，这一过程称为“Paligenosis”程序^[92]。这是一种保守程序，在该程序的驱动下，成熟的、完全分化的细胞可以重编程为祖细胞，得以重新进入细胞周期并修复受损的组织。主细胞经过 Paligenosis 后增殖并表达了黏蛋白（Mucins 6, MUC6）和伤口愈合蛋白如三叶因子 2（Trefoil Factor 2, TFF2，又名解痉多肽）和胃因子 3（Gastrokeine 3, GKN3），而主细胞标志物，如消化酶胃蛋白酶原 C

(Pepsinogen C, PGC) 的表达减少, 此时的主细胞已经经过重编程再生, 被称为解痉多肽表达化生 (Spasmolytic Ploypeptide Expressing Metaplasia, SPEM), 与正常的胃窦腺体深层的黏液细胞相似。因此, 壁细胞丢失和 SPEM 细胞形成的过程被称为幽门腺或假幽门腺化生。(图 2)

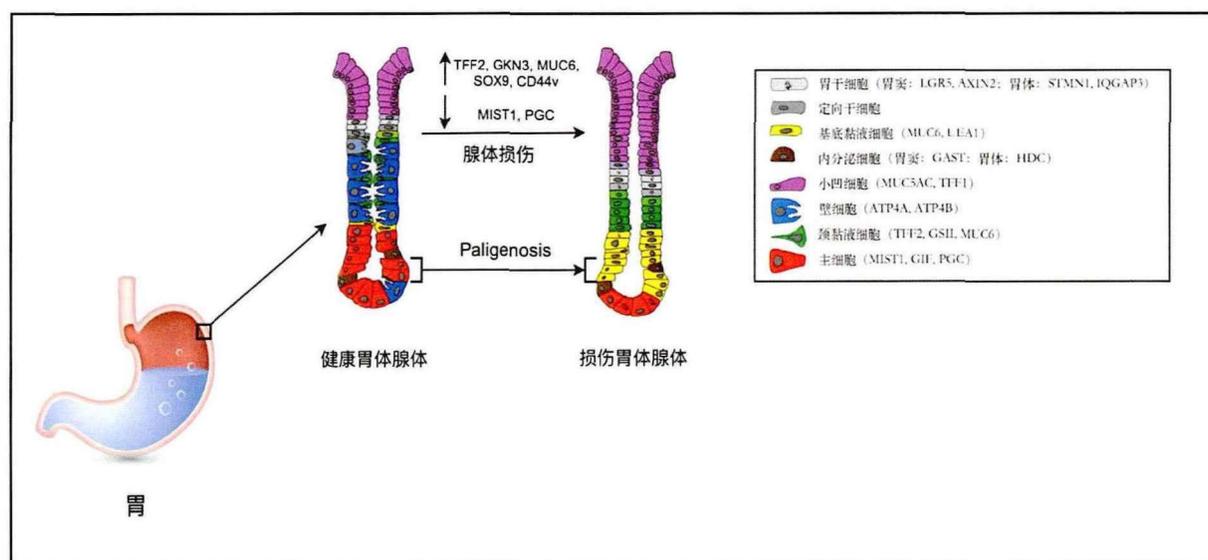


图 2 胃的腺体损伤, 成熟细胞去分化形成化生细胞。胃黏膜损伤后, 胃体失去壁细胞, 并在峡部和基底部增殖修复。主细胞去分化形成 SPEM 细胞, 具有分泌黏蛋白的特性, 主细胞标志物 MIST1、PGC 减少, SPEM 细胞标志物 TFF2、GKN3 等表达增加。

3 mTORC1 介导细胞自噬通过 Panligenosis 完成 SPEM 细胞的转化

研究表明, 在 *H.pylori* 损伤胃黏膜早期, DNA 损伤诱导转录 4 (DNA damage-induced transcript 4, DDIT4) 抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mTOR complex 1, mTORC1) 的活性, 此时胃腺体成熟的分泌细胞 (如主细胞) 自噬水平提高, 细胞内的细胞器进行自降解过程, 细胞结构的自降解可以释放关键的大分子, 如内质网 (网状吞噬)、核糖体 (核糖吞噬) 和酶生成分泌颗粒 (酶吞噬), 这些大分子既能刺激 mTORC1 的再激活, 又能重新进入细胞周期, 为细胞的复制提供“原材料”, 此为 Paligenosis 的第一阶段^[93], 主细胞标志物 MIST1 及其靶点内体/溶酶体相关的细胞凋亡和自噬调节因子 1 (Endosome/lysosome-associated apoptosis and autophagy regulator 1, ELAPOR1)、miR-148a 的表达开始下降^[92, 94-95]。

在此阶段中, ①DDIT4 是抑制 mTORC1 信号转导和诱导细胞自噬必需的上游调节因子, 其通过抑制 mTORC1 来防止具有 DNA 损伤的细胞重新进入细胞周期^[93, 96-97]。②

激活转录因子 3 (Activating transcription factor 3, ATF3) 水平升高, 抑制促分泌分化因子 MIST1 并诱导自噬体和溶酶体运输蛋白 RAB7, 缺乏 ATF3 的去分化细胞会在 Paligenosis 的第二阶段向第三阶段过渡期间死亡^[95]。③ELAPOR1 是调节分泌细胞成熟的 MIST1 靶标, MIST1 相应的减少, 表明去分化细胞中成熟特征的消失^[98]。④由于 DDIT4 抑制了 mTORC1 的活性, 大量的溶酶体及自噬体激活, 上调细胞自噬的水平, 自降解机制的启动, 不仅可以清除成熟细胞, 同时还可以降低活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的毒性, ROS 诱导 ATF3, 结合细胞表面蛋白 CD44v 的胱氨酸/谷氨酸逆转运蛋白 (Cystine/Glutamate Antiporter, xCT) 减轻了 ROS 的积累。与 ATF3 一样, xCT 是此阶段所必需的调节因子。研究表明, xCT 缺失的小鼠无法激活细胞自噬并完成 Paligenosis 进展^[99]。

MicroRNA (miRNAs) 参与各种系统中的细胞分化, 可能在成熟分泌细胞的去分化中发挥一定的作用以再生增殖干细胞^[100-101]。miR-148a 与 MIST1 一样, 是主细胞的标志分子, 在去分化过程早期水平即下降。研究显示, 抑制 miR-148a 的活性诱导了 SPEM 标志物以及 xCT 相互作用分子 CD44v 的表达, 这表明降低 miR-148a 水平是促使 Paligenosis 早期发生的重要事件^[94]。

在 Paligenosis 的第二阶段时, 去分化细胞表达了各种黏蛋白、祖细胞和 SPEM 细胞的标志, 包括 TFF2、GKN3、SOX9 和 GS-II^[92,102-103]。在此阶段, 随着细胞自噬过程的发展, DDIT4 水平逐渐降低, mTORC1 仍然不会重新激活, 因为在此阶段中 p53 水平达到峰值。p53 对于抑制 mTORC1 再激活至关重要, 第二阶段向第三阶段过渡期间, 也即是第二阶段后期, 干扰素相关发育调节因子 1 (Interferon-related developmental regulator 1, IFRD1) 诱导了 p53 的脱乙酰化, 降低了其活性, p53 水平开始降低, 此时 mTORC1 完全重新激活, 并开始在整个细胞周期中进展^[97]。

双链 RNA (Double-stranded RNA, dsRNA) 在成熟分泌细胞主细胞内积累, 在进入 Paligenosis 周期后, 主细胞重新编程为增殖、修复化生状态, 去分化为 SPEM 细胞, 在这个过程中, 腺苷 RNA 脱氨酶 (Adenosine RNA deaminase, ADAR1) 协调了细胞内源性、上皮自主和干扰素信号独立的 dsRNA 的清除^[104], 由此进入了 Paligenosis 的第三个阶段, 去分化的细胞重新进入了细胞周期进行增殖, 这是细胞存活与 SPEM 是否进展为

胃腺癌的重要环节。在此环节中，每次进入细胞周期的去分化细胞都有可能突变，这些积累的突变在增殖的细胞中表达，使得本该成为修复、愈合损伤的 Paligenosis 过程向胃腺癌发展。ADAR1 是调节去分化细胞进入细胞周期的关键，其次 ADAR1 还可能通过其作为 RNA 编辑酶的作用，在基因突变负荷方面发挥作用^[105]。因此可以说明 ADAR1 在 Correa 级联反应中关键的癌前状态期间的细胞决策方面发挥着关键的作用。

DDIT4 和 IFRD1 是 Paligenosis 过程第一阶段 (mTORC1 抑制剂) 和第三阶段 (mTORC1 再激活剂) 的上游调节因子^[106]。DDIT4 在 DNA 损伤后被激活，抑制 mTORC1 来防止具有 DNA 损伤的细胞重新进入细胞周期而发挥作用；p53 是一种已知的 mTORC1 抑制剂，IFRD1 通过抑制 p53，得以间接激活 mTORC1，并可以再次进入细胞周期。(Paligenosis 三阶段过程见图 3)^[107]

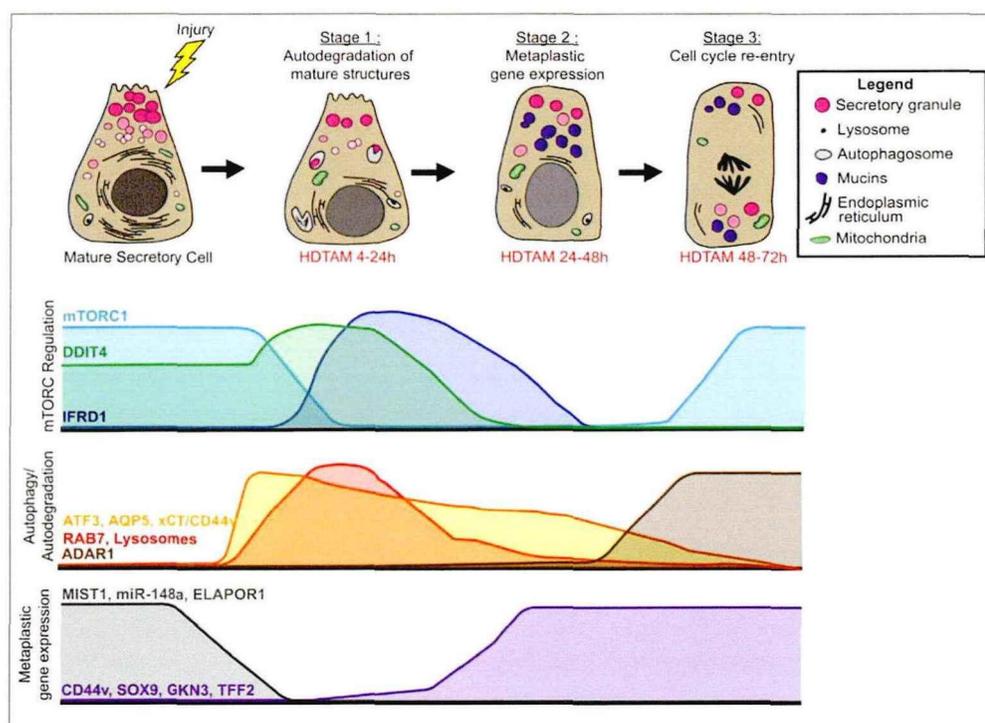


图 3 Paligenosis 动态过程示意图。第 1 阶段，在胃腺损伤后，成熟的分泌细胞（主细胞）在 DDIT4 的作用下激活细胞自噬并抑制 mTORC1 活性以降解分泌细胞；在第 2 阶段，过渡细胞表达各种黏蛋白、祖细胞和 SPEM 细胞的标记物；在第 2-3 阶段过渡期间，IFRD1 破坏 p53 的稳态，从而减轻对 mTORC1 活性的抑制作用；第 3 阶段，mTORC1 重新被激活，细胞重新进入细胞周期增殖并修复受损的组织。

4 结论与展望

H.pylori 作为一种生长缓慢的革兰氏阴性、具有鞭毛的微需氧细菌，其具有的多种毒力因子相互作用使其能够与宿主细胞达到长期的动态平衡以实现其在胃中实现永久定植的状态，但是胃黏膜中持续的炎症状态，使得胃上皮细胞启动 Paligenosis 程序，胃体腺体结构发生化生性的变化以此修复胃黏膜的损伤，Paligenosis 通过调节 mTORC1 的活性重新编程细胞完成胃体腺体 SPEM 细胞的转化。*H.pylori* 作为胃“炎-癌转化”的启动因子，然而即使在根除 *H.pylori* 后，仍有进展为胃癌的风险，那么探究决定胃黏膜进展的关键因素尤为重要。

越来越多的证据表明，SPEM 与肠上皮化生 (Intestinal metaplasia, IM) 同属胃癌前病变，但 SPEM 向胃癌进展的风险要高于 IM，虽然 SPEM 并不是 Correa 级联过程中的一个胃黏膜病变阶段，但越来越多的临床研究表明，Paligenosis 形成的 SPEM 可以直接发展为不典型增生。正如前文所述，细胞自噬在 Paligenosis 三个阶段中起着重要的作用，且关键调节因子 DDIT4 以及 IFRD1 调控着 Paligenosis 的进程，因此找到阻断 Paligenosis 过程中的关键靶点以破坏 SPEM 形成过程对于防治 *H.pylori* 相关的胃癌前病变特别是胃癌具有重要的意义。

课题组前期研究表明参白颗粒能够改善 *H.pylori* 相关胃癌前病变黏膜的胃镜下状态以及组织学表现，在本课题中拟探究 *H.pylori* 相关胃癌前病变放大内镜下的表现以更加准确的判定病变性质，识别高危病变甚至恶性病变，提高病变黏膜的诊断效能，从宏观上把握癌前病变黏膜的形态变化；进一步通过单细胞测序技术绘制 *H.pylori* 相关胃癌前病变黏膜上皮细胞的单细胞图谱与演化轨迹，探究 *H.pylori* 相关性胃癌前病变上皮细胞的异常分化途径，再以细胞实验探究参白颗粒干预 *H.pylori* 的靶通路从而防治 *H.pylori* 相关性胃癌前病变。

参考文献

- [1] Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on Helicobacter pylori gastritis[J]. Gut, 2015, 64(9): 1353-67.
- [2] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组. 2022 中国幽门螺杆菌感染治疗指南[J]. 中华消化杂志, 2022, 42(11): 745-756.

- [3] 房静远,杜奕奇,刘文忠等.中国慢性胃炎诊治指南(2022年,上海)[J].胃肠病学,2023,28(03): 149-180.
- [4] 王萍,卞立群,杨倩等.慢性胃炎中医诊疗专家共识(2023)[J].中华中医药杂志,2023,38(12): 5904-5911.
- [5] 国家技术监督局.中华人民共和国国家标准·中医病证分类与代码.北京:中国标准出版社,1995.
- [6] 张仲景.伤寒论[M].北京:人民卫生出版社,2017: 59-61.
- [7] 龚廷贤.万病回春[M].北京:人民卫生出版社,1984: 164.
- [8] 张介宾.景岳全书[M].北京:人民卫生出版社,1991: 514.
- [9] 林珮琴.类证治裁[M].上海:上海中医药大学出版社,1997: 187.
- [10] 梁方信.胃痞与慢性萎缩性胃炎——全国第五届脾胃病学术会侧析[J].山东中医杂志,1990,(04): 58-60.
- [11] 孙思邈.备急千金要方[M].山西:山西科学技术出版社,2020: 216-217.
- [12] 陈言(无择).三因极一病证方论[M].北京:人民卫生出版社,1957: 125.
- [13] 李杲.兰室秘藏[M].北京:中国古籍出版社,1986: 18-19.
- [14] 虞抟.医学正传[M].北京:人民卫生出版社,1984: 181.
- [15] Li Y, Li X, Tan Z. An overview of traditional Chinese medicine therapy for Helicobacter pylori-related gastritis[J]. Helicobacter, 2021, 26(3): e12799.
- [16] 刘婉,汪湃,晋颖,等.半夏泻心汤加味联合四联疗法对脾胃湿热型Hp相关慢性胃炎患者Hp清除率及胃肠黏膜功能的影响[J].天津中医药,2024,41(01): 29-33.
- [17] 陈利帮,王桐生,何春远,等.半夏泻心汤联合三联疗法治疗Hp相关性慢性胃炎肝胃郁热型疗效分析[J].山西中医药大学学报,2023,24(11): 1227-1230+1235.
- [18] 余忠妹,陈加飞,谭瑞.半夏泻心汤、三联疗法联合作用于幽门螺杆菌胃炎临床研究[J].湖北中医药大学学报,2023,25(04): 51-54.
- [19] 王士雄.随息居重订霍乱论[M].北京:人民卫生出版社,1993, 81.
- [20] 吴雪艳.连朴饮联合四联疗法治疗幽门螺杆菌(Hp)相关性胃炎患者的临床研究[J].临床医药文献电子杂志,2020,7(01): 162-163.

- [21] 王曦宇.连朴饮加减联合四联疗法治疗幽门螺杆菌相关性胃炎脾胃湿热证的临床研究[J].中国医药指南, 2019, 17(01): 153-154.
- [22] 石寿棠.医原[M].江苏:江苏科学技术出版社, 1983: 94.
- [23] 严鸿志.感证辑要[M].北京:中国医药科技出版社. 2019(2): 126.
- [24] 谢梅娟,徐国良,朱翠英,等.藿朴夏苓汤加减联合四联疗法治疗幽门螺杆菌相关性胃炎脾胃湿热证效果及根除率评价[J].中国现代药物应用, 2018, 12(23): 213-214.
- [25] 夏如玉,梁婉娴,刘春晖,等.7种口服中成药联合三联疗法治疗幽门螺杆菌相关性消化性溃疡和胃炎的经济学评价[J].中国药物经济学, 2022, 17(04): 29-38.
- [26] Huang YQ, Huang GR, Wu MH, et al. Inhibitory effects of emodin, baicalin, schizandrin and berberine on hefA gene: treatment of Helicobacter pylori-induced multidrug resistance[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(14): 4225-31.
- [27] Ma BL, Ma YM, Shi R, et al. Identification of the toxic constituents in Rhizoma Coptidis[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128(2): 357-64.
- [28] Li Q, Chen Z, Zhang J, et al. The colonic metabolism differences of main alkaloids in normal and colitis mice treated with Coptis chinensis Franch. and Sophora flavescens Ait. herbal pair using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method combined with chemometrics[J]. J Sep Sci, 2023, 46(14): e2300094.
- [29] Hu Q, Peng Z, Li L, et al. The Efficacy of Berberine-Containing Quadruple Therapy on Helicobacter Pylori Eradication in China: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials[J]. Front Pharmacol, 2020, 10: 1694.
- [30] Yang T, Wang R, Zhang J, et al. Mechanism of berberine in treating Helicobacter pylori induced chronic atrophic gastritis through IRF8-IFN- γ signaling axis suppressing[J]. Life Sci, 2020, 248: 117456.
- [31] 李欣,魏朔南.黄芩的生物学研究进展[J].中国野生植物资源, 2006, (06): 11-15.
- [32] Yu XD, Zheng RB, Xie JH, et al. Biological evaluation and molecular docking of baicalin and scutellarin as Helicobacter pylori urease inhibitors[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162: 69-78.

- [33] 吴静,胡东,王克霞.黄芩和黄芩苷对幽门螺杆菌的体外抗菌活性研究[J].中药材, 2008, (05): 707-710.
- [34] 邓志燕,万强.黄芩苷对幽门螺杆菌诱导人胃黏膜上皮 GES-1 细胞损伤的保护作用及机制[J].中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 145-149.
- [35] 苟奎斌,孙丽华,娄卫宁,等.大黄中 4 种蒽醌类化合物抑幽门螺杆菌效果比较[J].中国药理学杂志, 1997, (05): 24-26.
- [36] 杨小红,陆锦,骆询,等.黄芩、黄连和大黄对幽门螺杆菌抑菌作用的研究进展[J].中国药房, 2015, 26(14): 2014-2016.
- [37] Zhao Y, Chen Z, Cai Y, et al. Aloe-emodin destroys the biofilm of *Helicobacter pylori* by targeting the outer membrane protein 6[J]. *Microbiol Res*, 2024, 278: 127539.
- [38] 谷青,胡伏莲.幽门螺杆菌的生物学特性及其感染的胃粘膜病理学特点[J].中国医刊, 2001, (05): 19-20.
- [39] Alm RA, Ling LS, Moir DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. *Nature*, 1999, 397(6715): 176-80.
- [40] Tomb JF, White O, Kerlavage AR, et al. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*[J]. *Nature*, 1997, 388(6642): 539-47.
- [41] Suerbaum S, Josenhans C. *Helicobacter pylori* evolution and phenotypic diversification in a changing host[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(6): 441-52.
- [42] Kang J, Blaser MJ. Bacterial populations as perfect gases: genomic integrity and diversification tensions in *Helicobacter pylori*[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 4(11): 826-36.
- [43] García-Ortíz MV, Marsin S, Arana ME, et al. Unexpected role for *Helicobacter pylori* DNA polymerase I as a source of genetic variability[J]. *PLoS Genet*, 2011, 7(6): e1002152.
- [44] Suerbaum S, Smith JM, Bapumia K, et al. Free recombination within *Helicobacter pylori*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(21): 12619-12624.
- [45] Kennemann L, Didelot X, Aebischer T, et al. *Helicobacter pylori* genome evolution during human infection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(12): 5033-5038.
- [46] Bubendorfer S, Krebs J, Yang I, et al. Genome-wide analysis of chromosomal import

patterns after natural transformation of *Helicobacter pylori*[J]. *Nat Commun*, 2016,7: 11995.

[47] Schreiber S, Konradt M, Groll C, et al. The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(14): 5024-5029.

[48] Howitt MR, Lee JY, Lertsethtakarn P, et al. ChePep controls *Helicobacter pylori* Infection of the gastric glands and chemotaxis in the Epsilonproteobacteria[J]. *mBio*, 2011, 2(4): e00098-11.

[49] Johnson KS, Ottemann KM. Colonization, localization, and inflammation: the roles of *H. pylori* chemotaxis in vivo[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, 41: 51-57.

[50] Maroney MJ, Ciurli S. Nickel as a virulence factor in the Class I bacterial carcinogen, *Helicobacter pylori*[J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 76: 143-155.

[51] Weeks DL, Eskandari S, Scott DR, et al. A H⁺-gated urea channel: the link between *Helicobacter pylori* urease and gastric colonization[J]. *Science*, 2000, 287(5452): 482-5.

[52] Eaton KA, Brooks CL, Morgan DR, et al. Essential role of urease in pathogenesis of gastritis induced by *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets[J]. *Infect Immun*, 1991, 59(7): 2470-5.

[53] Matsuo Y, Kido Y, Yamaoka Y. *Helicobacter pylori* Outer Membrane Protein-Related Pathogenesis[J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(3): 101.

[54] Rad R, Gerhard M, Lang R, et al. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response[J]. *J Immunol*, 2002, 168(6): 3033-41.

[55] Yanai A, Maeda S, Hikiba Y, et al. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* sabA genotype in Japanese clinical isolates[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(12): 2228-32.

[56] Sheu BS, Odenbreit S, Hung KH, et al. Interaction between host gastric Sialyl-Lewis X and *H. pylori* SabA enhances *H. pylori* density in patients lacking gastric Lewis B antigen[J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(1): 36-44.

[57] Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (oipA) of *Helicobacter pylori*[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(13): 7533-8.

[58] Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, et al. Gastric mucosal interleukin-17 and -18 mRNA

expression in *Helicobacter pylori*-induced Mongolian gerbils[J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11): 2152-9.

[59] Sakurai Y, Otani Y, Kameyama K, et al. Expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) in gastric cancers[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1997, 88(4): 401-6.

[60] Sugimoto M, Ohno T, Graham DY, et al. *Helicobacter pylori* outer membrane proteins on gastric mucosal interleukin 6 and 11 expression in Mongolian gerbils[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26(11): 1677-84.

[61] Al-Maleki AR, Loke MF, Lui SY, et al. *Helicobacter pylori* outer inflammatory protein A (OipA) suppresses apoptosis of AGS gastric cells in vitro[J]. *Cell Microbiol*, 2017, 19(12).

[62] Odenbreit S, Faller G, Haas R. Role of the alpAB proteins and lipopolysaccharide in adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue[J]. *Int J Med Microbiol*, 2002, 292(3-4): 247-56.

[63] Lu H, Wu JY, Beswick EJ, et al. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesin from Western and East Asian strains[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(9): 6242-54.

[64] Raghwan, Chowdhury R. Host cell contact induces fur-dependent expression of virulence factors CagA and VacA in *Helicobacter pylori*[J]. *Helicobacter*, 2014, 19(1): 17-25.

[65] Figura N, Trabalzini L, Mini R, et al. Inactivation of *Helicobacter pylori* cagA gene affects motility[J]. *Helicobacter*, 2004, 9(3): 185-93.

[66] Baidya AK, Bhattacharya S, Chowdhury R. Role of the Flagellar Hook-Length Control Protein FliK and σ_{28} in cagA Expression in Gastric Cell-Adhered *Helicobacter pylori*[J]. *J Infect Dis*, 2015, 211(11): 1779-89.

[67] Kim SY, Lee YC, Kim HK, et al. *Helicobacter pylori* CagA transfection of gastric epithelial cells induces interleukin-8[J]. *Cell Microbiol*, 2006, 8(1): 97-106.

[68] González CA, Figueiredo C, Lic CB, et al. *Helicobacter pylori* cagA and vacA genotypes as predictors of progression of gastric preneoplastic lesions: a long-term follow-up in a high-risk area in Spain[J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106(5): 867-74.

[69] Ferreira RM, Pinto-Ribeiro I, Wen X, et al. *Helicobacter pylori* cagA Promoter Region

Sequences Influence CagA Expression and Interleukin 8 Secretion[J]. *J Infect Dis*, 2016, 213(4): 669-73.

[70] Choi SI, Yoon C, Park MR, et al. CDX1 Expression Induced by CagA-Expressing *Helicobacter pylori* Promotes Gastric Tumorigenesis[J]. *Mol Cancer Res*, 2019, 17(11): 2169-2183.

[71] Yu H, Zeng J, Liang X, et al. *Helicobacter pylori* promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer by downregulating programmed cell death protein 4 (PDCD4) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105306.

[72] Lin L, Wei H, Yi J, et al. Chronic CagA-positive *Helicobacter pylori* infection with MNNG stimulation synergistically induces mesenchymal and cancer stem cell-like properties in gastric mucosal epithelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(10): 17635-17649.

[73] Lee DG, Kim HS, Lee YS, et al. *Helicobacter pylori* CagA promotes Snail-mediated epithelial-mesenchymal transition by reducing GSK-3 activity[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4423.

[74] Krzysiek-Maczka G, Targosz A, Szczyrk U, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition-inducing transcription factors in the mechanism of *Helicobacter pylori*-induced fibroblasts activation[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2019, 70(5).

[75] Huang L, Wang ZY, Pan DD. Penicillin-binding protein 1A mutation-positive *Helicobacter pylori* promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer via the suppression of microRNA-134[J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(3): 916-928.

[76] Li N, Feng Y, Hu Y, et al. *Helicobacter pylori* CagA promotes epithelial mesenchymal transition in gastric carcinogenesis via triggering oncogenic YAP pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, 37(1): 280.

[77] Marques MS, Melo J, Cavadas B, et al. Afadin Downregulation by *Helicobacter pylori* Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Gastric Cells[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2712.

[78] Raju D, Hussey S, Ang M, et al. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans[J]. *Gastroenterology*,

2012, 142(5): 1160-71.

[79] Wada A, Yamasaki E, Hirayama T. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA, is responsible for gastric ulceration[J]. *J Biochem*, 2004, 136(6): 741-6.

[80] McClain MS, Beckett AC, Cover TL. *Helicobacter pylori* Vacuolating Toxin and Gastric Cancer[J]. *Toxins (Basel)*, 2017, 9(10): 316.

[81] Keikha M, Ali-Hassanzadeh M, Karbalaei M. Association of *Helicobacter pylori* vacA genotypes and peptic ulcer in Iranian population: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2020, 20(1): 266.

[82] Atrisco-Morales J, Martínez-Santos VI, Román-Román A, et al. vacA s1m1 genotype and cagA EPIYA-ABC pattern are predominant among *Helicobacter pylori* strains isolated from Mexican patients with chronic gastritis[J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(3): 314-324.

[83] Román-Román A, Martínez-Carrillo DN, Atrisco-Morales J, et al. *Helicobacter pylori* vacA s1m1 genotype but not cagA or babA2 increase the risk of ulcer and gastric cancer in patients from Southern Mexico[J]. *Gut Pathog*, 2017, 9: 18.

[84] Ferreira RM, Machado JC, Figueiredo C. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* vacA and cagA genotypes in gastric carcinoma[J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2014, 28(6): 1003-15.

[85] Abdullah M, Greenfield LK, Bronte-Tinkew D, et al. VacA promotes CagA accumulation in gastric epithelial cells during *Helicobacter pylori* infection[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 38.

[86] Zambon CF, Navaglia F, Basso D, et al. *Helicobacter pylori* babA2, cagA, and s1 vacA genes work synergistically in causing intestinal metaplasia[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(4): 287-91.

[87] Chauhan N, Tay ACY, Marshall BJ, et al. *Helicobacter pylori* VacA, a distinct toxin exerts diverse functionalities in numerous cells: An overview[J]. *Helicobacter*, 2019, 24(1): e12544.

[88] Link A, Langner C, Schirrmeister W, et al. *Helicobacter pylori* vacA genotype is a predominant determinant of immune response to *Helicobacter pylori* CagA[J]. *World J*

Gastroenterol, 2017, 23(26): 4712-4723.

[89] Djekic A, Müller A. The Immunomodulator VacA Promotes Immune Tolerance and Persistent Helicobacter pylori Infection through Its Activities on T-Cells and Antigen-Presenting Cells[J]. Toxins (Basel), 2016, 8(6): 187.

[90] Wang D, Li Q, Gong Y, et al. The association between vacA or cagA status and eradication outcome of Helicobacter pylori infection: A meta-analysis[J]. PLoS One, 2017, 12(5): e0177455.

[91] Capurro MI, Greenfield LK, Prashar A, et al. VacA generates a protective intracellular reservoir for Helicobacter pylori that is eliminated by activation of the lysosomal calcium channel TRPML1[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(8): 1411-1423.

[92] Willet SG, Lewis MA, Miao ZF, et al. Regenerative proliferation of differentiated cells by mTORC1-dependent paligenesis[J]. EMBO J, 2018, 37(7): e98311.

[93] Miao ZF, Cho CJ, Wang ZN, et al. Autophagy repurposes cells during paligenesis[J]. Autophagy, 2021, 17(2): 588-589.

[94] Shimizu T, Sohn Y, Choi E, et al. Decrease in MiR-148a Expression During Initiation of Chief Cell Transdifferentiation[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2020, 9(1): 61-78.

[95] Radyk MD, Spatz LB, Peña BL, et al. ATF3 induces RAB7 to govern autodegradation in paligenesis, a conserved cell plasticity program[J]. EMBO Rep, 2021, 22(9): e51806.

[96] Miao ZF, Sun JX, Adkins-Threats M, et al. DDIT4 Licenses Only Healthy Cells to Proliferate During Injury-induced Metaplasia[J]. Gastroenterology, 2021, 160(1): 260-271.e10.

[97] Miao ZF, Lewis MA, Cho CJ, et al. A Dedicated Evolutionarily Conserved Molecular Network Licenses Differentiated Cells to Return to the Cell Cycle[J]. Dev Cell, 2020, 55(2): 178-194.e7.

[98] Cho CJ, Park D, Mills JC. ELAPOR1 is a secretory granule maturation-promoting factor that is lost during paligenesis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2022, 322(1): G49-G65.

[99] Meyer AR, Engevik AC, Willet SG, et al. Cystine/Glutamate Antiporter (xCT) Is

Required for Chief Cell Plasticity After Gastric Injury[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 8(3): 379-405.

[100] Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(1): 36-41.

[101] Pascale E, Caiazza C, Paladino M, et al. MicroRNA Roles in Cell Reprogramming Mechanisms[J]. *Cells*, 2022, 11(6): 940.

[102] Bockerstett KA, Lewis SA, Wolf KJ, et al. Single-cell transcriptional analyses of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia arising from acute drug injury and chronic inflammation in the stomach[J]. *Gut*, 2020, 69(6): 1027-1038.

[103] Bockerstett KA, Lewis SA, Noto CN, et al. Single-Cell Transcriptional Analyses Identify Lineage-Specific Epithelial Responses to Inflammation and Metaplastic Development in the Gastric Corpus[J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(6): 2116-2129.e4.

[104] Sáenz JB, Vargas N, Cho CJ, et al. Regulation of the double-stranded RNA response through ADAR1 licenses metaplastic reprogramming in gastric epithelium[J]. *JCI Insight*, 2022, 7(3): e153511.

[105] Chan TH, Qamra A, Tan KT, et al. ADAR-Mediated RNA Editing Predicts Progression and Prognosis of Gastric Cancer[J]. *Gastroenterology*, 2016, 151(4): 637-650.e10.

[106] Johnson NM, Lengner CJ. mTORC1 and the Rebirth of Stemness[J]. *Dev Cell*, 2020, 55(2): 113-115.

[107] Adkins-Threats M, Mills JC. Cell plasticity in regeneration in the stomach and beyond[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2022, 75: 101948.

前言

*H.pylori*已被归类为I类致癌物,越来越多的证据表明,*H.pylori*是慢性非萎缩性胃炎(Chronic Non-Atrophic Gastritis, CNAG)-慢性萎缩性胃炎(Chronic Atrophic Gastritis, CAG)-肠上皮化生(Intestinal Metaplasia, IM)-异型增生(Dysplasia, Dys)/低级别上皮内瘤变(Low-Grade Intraepithelial Neoplasia, LGIN)-高级别上皮内瘤变(High-Grade Intraepithelial Neoplasia, HGIN)/胃癌(Gastric Cancer, GC)这一Correa级联反应过程的启动因子,是公认的可以导致胃癌的环境危险因素^[1-2]。*H.pylori*全球感染率达60%以上,对其进行有针对性的监测及根除,能够控制全球的胃癌发病率^[3]。*H.pylori*感染后,胃黏膜的慢性活动性炎症持续存在,导致CAG及IM的发展。进展中的CAG、IM以及上皮内瘤变属于胃癌前病变的范畴^[4-6],与胃癌的发生密切相关,尽管根除*H.pylori*可以降低胃癌的发生率,但目前的现状是即使根除*H.pylori*和治疗胃炎后,*H.pylori*导致的胃黏膜损伤持续存在且有部分患者仍有发生胃癌的风险^[7]。因此,对*H.pylori*造成的胃黏膜损伤导致的胃癌前病变进行定期的内镜筛查是必要的,提高内镜下诊断胃癌前病变的效能对于识别早期胃癌(Early Gastric cancer, EGC)至关重要。

在宏观上认识胃癌前病变后,针对*H.pylori*相关的胃癌前病变上皮细胞类群分化轨迹的研究将在微观层面上进一步揭示胃黏膜上皮细胞的异常增殖分化途径,解释胃癌前病变发生发展过程,同时能够深入探索*H.pylori*在胃癌前病变中的作用机制。

本研究拟通过OLGA/OLGIM系统对患者进行风险分层,建立内镜下高危型OLGA/OLGIM诊断模型,同时运用单细胞测序技术绘制*H.pylori*相关的胃癌前病变上皮细胞分化图景,并通过构建*H.pylori*与GES-1细胞共培养模型来模拟*H.pylori*在胃中急性感染与慢性感染过程中上皮细胞的增殖、分化、凋亡及自噬变化过程,同时加入临床疗效确定的参白颗粒进行干预,以期预测并筛选有效的靶点及通路为下一步药效研究作基础。

研究流程图

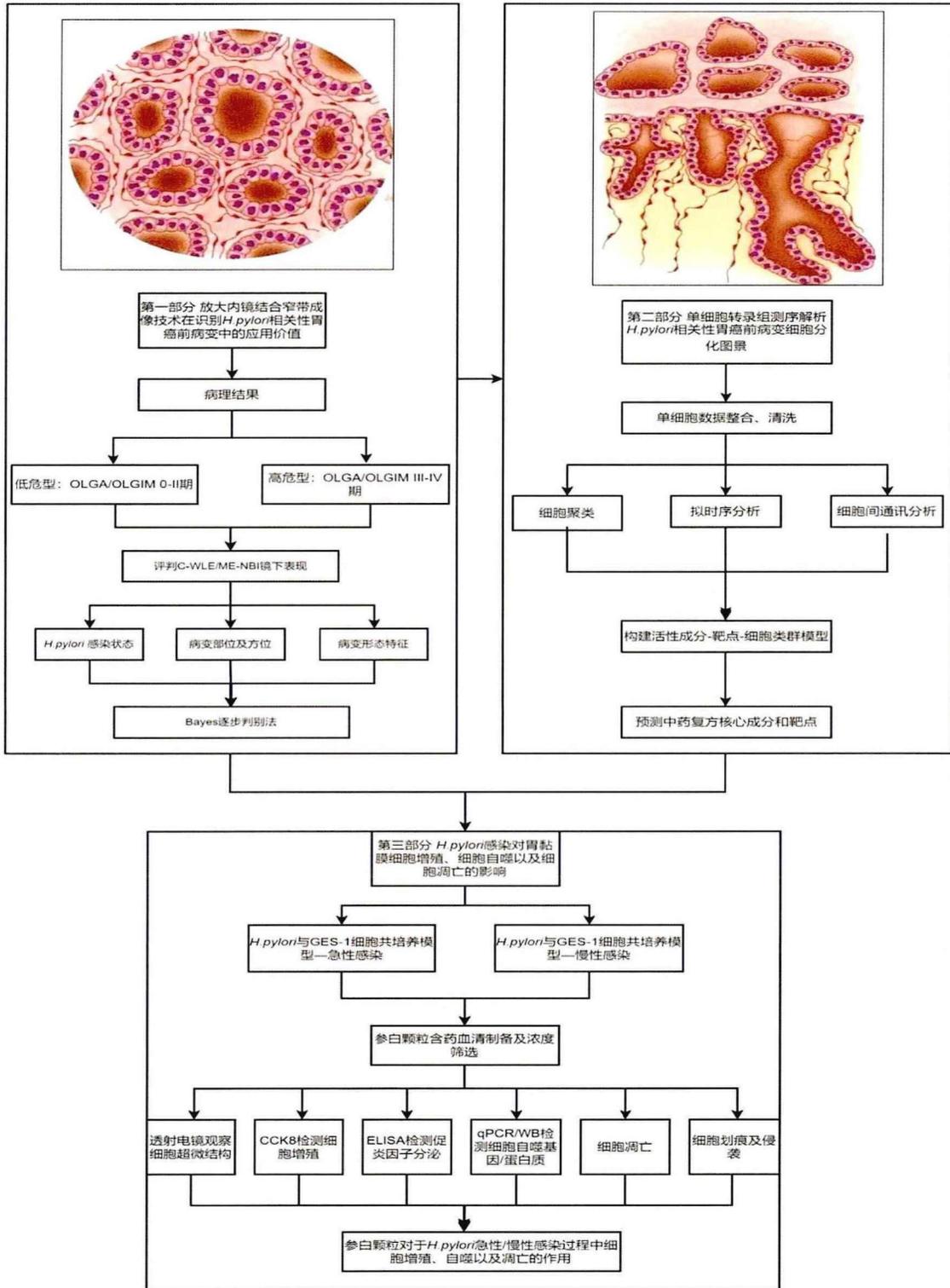


图1 本研究论文总流程图

第一部分 放大内镜结合窄带成像技术在识别 *H.pylori* 相关性胃癌前病变中的应用价值

胃上皮病变性质的判断主要通过内镜检查医师在操作过程中观察胃黏膜的形态特征，对可疑的病变部位组织进行活检钳活检（Endoscopic Forceps Biopsy, EFB）后进行病理诊断。虽然EFB组织病理诊断被认为是诊断胃上皮病变的金标准，是作为目前临床使用最广泛的诊断方法。然而EFB作为定“点”取材，其提供的病理标本相对较小，由于肿瘤细胞的异质性，仅通过EFB的定点判断难以窥见病变全貌，研究表明，EFB病理诊断与最终诊断之间有1.5%-8.0%的偏离^[8-10]，容易导致采取不合适的处理方式。设若通过增加EFB的次数以及多点取材，的确能提高EFB病理诊断的准确性，但是EFB作为一种有创性诊断方法，其造成的人为黏膜破损使得胃黏膜在后续的愈合过程中形成纤维化/瘢痕组织，影响后续的内镜治疗操作。因此，通过内镜下胃黏膜的特征能够更准确的判定病变性质、病变范围，敏锐地识别高危胃黏膜，同时可以针对性地进行EFB取材，提高内镜下胃黏膜上皮病变诊断能力、更好地识别胃癌前病变、合理地制定胃癌前病变治疗决策或随访方案是重中之重。

内镜检查相比于EFB病理组织学检查能够更为全面的获取胃黏膜病变的信息，补充EFB组织过小而给诊断带来的困扰。内镜医生的最终目标是在不需要活检的情况下进行高度准确的诊断，减少不必要的活检次数，降低活检后出血的风险^[11]。目前国内常规使用的是传统的白光内镜（Conventional White-Light Imaging Endoscopy, C-WLE）、放大内镜（Magnifying Endoscopy, ME）以及图像增强内镜。ME可将胃黏膜放大几十倍，实现观察黏膜表面腺管以及血管变化。图像增强内镜比C-WLE能够更清楚地显示黏膜腺管表面结构以及表面微血管形态，其国内应用最常见的方式是窄带成像技术（Narrow band imaging, NBI）。ME与NBI技术相结合，能更加清晰地观察胃黏膜的表面特征。ME-NBI已广泛应用于诊断恶性病变的临床实践中，在EGC的定性诊断中，ME-NBI具有很高的诊断效能，这已经通过多个临床试验的结果得到了验证。如果内镜医生真正拥有了较高的内镜下诊断恶性病变的技能，势必对临床实践工作产生影响，那么“胃放大内镜代替EFB成为光学活检”这一目标就有可能实现，仅通过内镜检查就能做出定性的诊断，这是所有内镜医生应该追求的目标。

但是这并不意味着不需要EFB，在EGC治疗方针的决策过程中，必须明确组织病理类型，当前的EGC诊疗指南中，建议参照组织活检的组织病理学诊断而进行治疗^[12]。就是在一般情况下，在癌的诊断过程中不以减少活检例数为目的，而在非癌症诊断过程中减少活检例数具有临床意义。

日本病理学专家中村恭一教授在《胃癌的构造》一书中提出“胃癌三角”理论，认为“胃固有黏膜发生胃型胃癌的未分化型腺癌，肠上皮化生会发生肠型胃癌的分化型胃癌。并且，胃癌发生的背景黏膜（场）-肉眼型-组织型三个要素紧密地联系在一起。”通俗的讲，就是“什么样子的地（背景黏膜（场）），就会长出什么样子的庄稼（不同类型的胃癌）”胃癌的发生是在特定的“场”发生，没有“场”的存在就不可能发生胃癌，故在中村时代即提出要重视背景黏膜。此理论在1980年提出，由于时代的局限性，尚无过多的研究*H.pylori*感染与胃癌之间关系，并未涉及到胃底腺型胃癌、小凹上皮型胃癌以及神经内分泌肿瘤等特殊类型的胃癌，但此理论提到的“背景黏膜”是内镜诊断所要重视的内容。从2000年至2013年，随着日本*H.pylori*除菌治疗的费用纳入医保，*H.pylori*感染率显著下降，*H.pylori*除菌后的胃癌增加，加之内镜技术的进步，早癌筛查的普及，使得EGC的肉眼形态以及胃癌的类型发生了变化。此时胃癌的背景黏膜发生了变化，需在“胃癌三角”理论上加入*H.pylori*感染状态作为新的内容，由此组成“胃癌四角”，再次强调根据背景胃黏膜状态诊断EGC是内镜检查过程中的重点。

在20世纪20年代Schindler确立的胃镜胃炎诊断学基础上，纳入了内镜下表现的胃炎分类—“京都胃炎分类”成为了更客观、简便诊断并可评价胃癌风险的标准。胃癌极少的发生在正常的胃黏膜背景下，内镜下即判定*H.pylori*的感染状态，可即时的引导除菌治疗的进行，同时也可以更好的评估胃癌发生的风险。

在EGC的诊断体系中，日本内镜专家八尾建史教授（Kenshi Yao）提出了VS理论，是EGC诊断体系研究的基础^[13]，其后制定了EGC的放大内镜诊断简化流程（Magnifying Endoscopy Simple Diagnostic Algorithm for Early Gastric Cancer, MESDA-G）^[14]，此理论极大的提高了EGC的内镜检出率，尤其针对分化型癌，但是由于ME-NBI的原理只是透视黏膜浅表层，对于起源于腺颈部横向以及深层发展的未分化癌诊断稍有欠缺，这是由于在未分化癌往往表层覆盖着非癌上皮，这是目前的难点。其后小山恒男教授细化

VS理论中的S（表面微结构），提出了PIT-VILLI理论，其更注重表面结构并结合其提出的简化血管分型network以及non-network作为辅助；八木一芳教授则是偏向以VS系统中的V（微血管构造）进行判定，分化癌中将血管分为MESH-LOOP，未分化癌中将血管分为corkscrew pattern、wavy micro-vessels、raimon vessels，再辅以腺管白区（White zone, WZ）的是否可见给予细化及分型。可以说小山恒男的PIT-VILLI和八木一芳的血管分型是VS理论的延伸和细化，十分有必要。通过各个理论，我们发现，早癌的内镜下观察围绕着两个关键的因素：表面微结构（microsurface pattern, MSP）以及微血管构造（microvascular pattern, MVP）。ME-NBI可以提高EGC的阳性预测值，减少判定非癌性质病变的活检数目^[15-16]。

前述ME-NBI在EGC诊断过程中的诸多应用，且具有较为优越的EGC的诊断效能，那么我们是否可以提出：ME-NBI在判断胃癌前病变患者中也会有更好的表现，以及ME-NBI在判定胃癌前病变分级中不同内镜下表现所带来的诊断效能如何，尚有待进一步研究。基于以上背景和问题，我们纳入了由北京中医药大学东直门医院脾胃病科进行C-WLE、ME-NBI检查以及EFB的患者的内镜图像以及病理结果。拟通过胃癌风险评估系统OLGA（operating link for gastritis assessment, OLGA）/OLGIM（operating link for gastric intestinal metaplasia, OLGIM）对患者进行风险分层^[17]，重点研究高危型胃癌前病变患者的内镜特征，评估C-WLE联合ME-NBI在识别*H.pylori*相关性胃癌前病变患者的临床应用价值，以期为内镜下判别高危型胃癌前病变提供诊断依据。

1 研究对象

1.1 入组标准

本研究回顾了2022年1月至2023年9月就诊于北京中医药大学东直门医院脾胃病科胃镜室患者的临床基本信息、内镜检查结果以及活检病理组织学结果，纳入了使用C-WLE、ME-NBI技术以及具有活检病理组织学结果的患者共计461例。结合患者的临床病史，排除了病理证实患有自身免疫性胃炎者30例，曾有胃部手术史5例，曾患有消化道肿瘤史4例，共纳入初诊时同时完成C-WLE、ME-NBI评估的患者422例。

本研究根据《赫尔辛基宣言》进行，并得到北京中医药大学东直门医院伦理委员会批准（No.2021DZMEC-091-04）。本研究为回顾性研究，且不涉及可识别患者的临床信

息，因此无需患者签署知情同意书。

1.2 排除标准

- (1) 自身免疫性胃炎（A型慢性萎缩性胃炎）；
- (2) 病理结果未按标准取材，无法判定OLGA/OLGIM分级者；
- (3) 合并有胃及十二指肠溃疡、上消化道出血者；
- (4) 既往有胃部手术史或曾有消化道肿瘤史者；
- (5) 研究者认为不适宜入选的其他情况。

2 方法

2.1 研究设计

本研究是一项回顾性研究，以OLGA/OLGIM危险分层（低危或高危）为因变量，*H. pylori*感染状态、C-WLE、ME-NBI下内镜下各种表现为自变量，筛选高危型人群的相关风险因素。

2.2 内镜检查及内镜下病变特征评估

初始时C-WLE以及ME-NBI的检查由有资质的内镜医师（近5年累计完成消化内镜诊疗病例不少于5000例）操作GIF-H260Z（Olympus, Tokyo, Japan）内镜完成。内镜检查过程中使用*H. pylori*快速尿素酶检测*H. pylori*感染状态。选取活检前拍摄的内镜图片纳入分析。由内镜操作医师在不了解患者临床病史和病理诊断的情况下，根据C-WLE、ME-NBI内镜图片，对病变形态特征进行描述。首先根据京都胃炎分类判定*H. pylori*感染的状态^[18]，其次描述病变部位及方位，病变的形态特征。

2.2.1 *H. pylori*感染状态：根据京都胃炎分类^[18]将胃黏膜镜下状态分为三种。

(1) 无*H. pylori*感染胃黏膜（*H. pylori* uninfected gastric mucosa=正常胃）：①ME-NBI可观察到胃角及胃体下部小弯侧可见规律排列的集合小静脉（Regular Arrangement of Collecting Venules, RAC）；②内镜下胃窦无萎缩征象，另外，胃体大弯侧的皱襞细小，呈直线走行，有时可见到胃底腺息肉、陈旧性出血斑附着、胃体或胃窦可见到脊状发红等特征性表现；③*H. pylori*检测结果为阴性（接受过一项或几项*H. pylori*检测结果均显示阴性）；④既往无*H. pylori*根除史；⑤既往活检病理结果无萎缩和肠化。

以上条件均满足方可符合*H. pylori*阴性（从未感染过*H. pylori*，且既往无任何*H. pylori*

i感染的证据)。以上条件有1条不满足即视为可疑*H.pylori*感染(*H.pylori*现症感染/既往感染)。

(2) *H.pylori*现症感染(*H.pylori* infected gastric mucosa=慢性活动性胃炎): ①没有*H.pylori*除菌史; ②*H.pylori*检测结果为阳性(接受过一项或几项*H.pylori*检测结果有任一项显示为阳性), 也包括病理组织学显示有*H.pylori*感染的间接证据, 但未行检测者; ③C-WLE下可见到胃体-胃底部的点状发红、弥漫性发红, 皱襞异常(肿大、蛇行、消失)、黏膜肿胀、黏稠的白色浑浊黏液等特征的现症感染表现; ④ME-NBI下胃体下部小弯侧至胃角RAC消失。

以上①②④项为必要条件, ③为可选条件, 满足以上条件即可判定为*H.pylori*现症感染内镜下表现。

(3) *H.pylori*既往感染(*H.pylori* past infected gastric mucosa): ①既往有*H.pylori*除菌史; ②*H.pylori*检测结果为阴性(接受过一项或几项*H.pylori*检测结果均显示阴性); ③C-WLE可见到地图样发红、斑状发红等内镜下既往感染表现; ④ME-NBI下胃体下部小弯侧至胃角RAC消失。

以上①②④项为必要条件, ③为可选条件, 满足以上条件即可判定为*H.pylori*既往感染内镜下表现。

2.2.2 病变部位及方位: 根据日本胃癌协会分类标准^[19], 将胃分为三个部分, 把胃大弯、小弯三等分后, 分别连接两侧的对点, 自口侧依次为上部、中部、下部(病变部位)(见图2)。病变方位则为大弯、小弯、前壁、后壁。

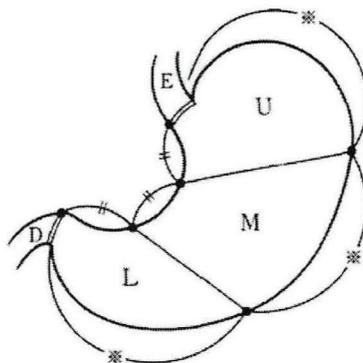


图2 胃的三个部分。U代表upper, 上部, M代表middle, 中部, L代表lower, 下部。

2.2.3 病变的形态特征: C-WLE下观察病变边界是否清晰、规则; 病变的大体类型(根据巴黎分型, 可分为隆起型、平坦型以及凹陷型); 病变色泽(与周围黏膜相比, 色泽

相同、褪色或发红)；以及周围黏膜是否有明显的炎症、萎缩或者肠化斑。ME-NBI下首先观察背景黏膜与病变之间的分界线 (Demarcation Line, DL) 的有无，其次观察病变内部是否存在不规则的微血管结构 (irregular microvascular pattern, IMVP,) 或不规则的表面微细结构 (irregular microsurface pattern, IMSP)、亮蓝嵴 (Light Blue Crest, LBC) 的有无，白色不透明物质 (White Opaque Substance, WOS) 的有无、白球征 (White Globe Appearance, WGA) 的有无、上皮环内血管模式 (Vessels within Epithelial Circle pattern, VEC pattern) 的有无、在由背景黏膜的小凹边缘上皮环绕的内侧有凸出的明显的分界线 (Multiple Convex Demarcation Line, MCDL) 的有无，其中MCDL需在DL存在的条件下满足：①被背景胃黏膜的小凹边缘上皮环绕；②在其内侧呈多数凸出的形状。各项内镜特征的代表性图片见图3、图4。

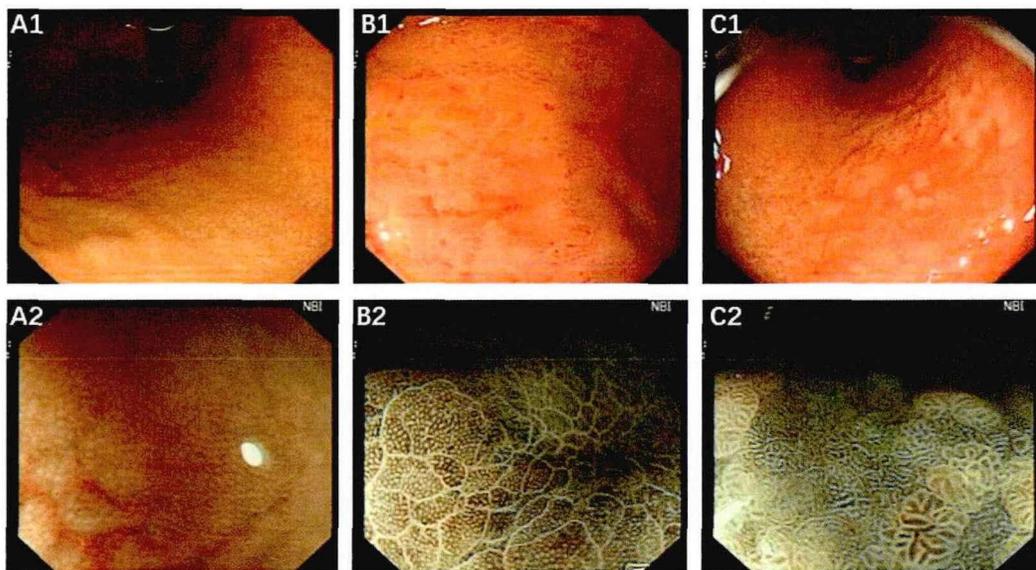


图3 *H. pylori*感染状态特征性图。A1为未感染者C-WLE镜下RAC清晰可见，A2为未感染者ME-NBI镜下腺窝开口清晰可见；B1为现症感染者C-WLE镜下弥漫性发红，B2为ME-NBI镜下腺窝开口模糊，小凹边缘上皮水肿；C1为C-WLE镜下地图样发红表现；C2为ME-NBI下对应表现。

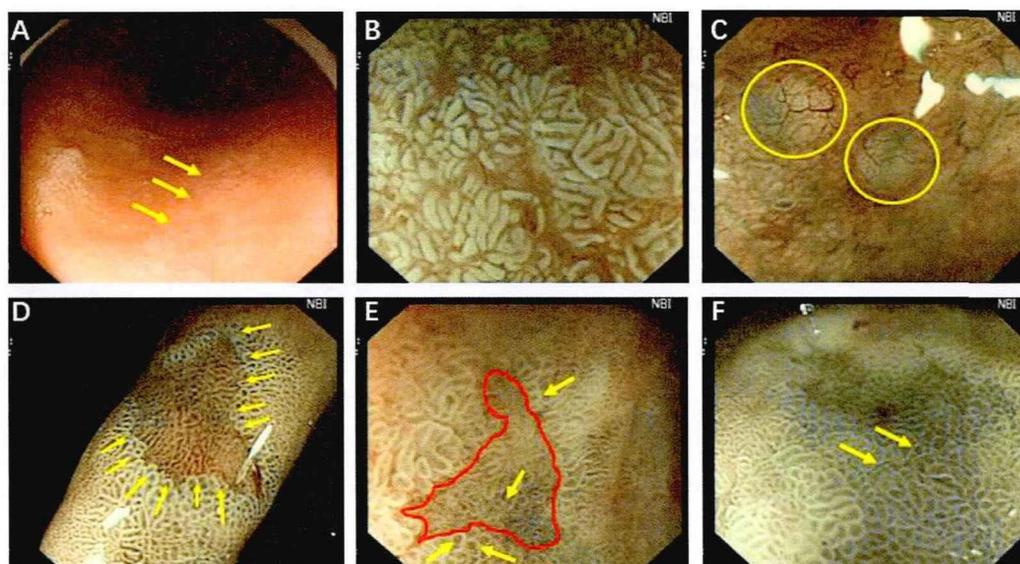


图4 C-WLE及ME-NBI下病变典型特征图。A图为C-WLE可见平坦肠化斑（黄色箭头所指），B图为ME-NBI下A图对应肠化斑的放大表现，C图为ME-NBI下可见的WGA（黄圈部分框出）；D图为清晰规整的DL（黄色箭头所指），E图为DL边界不规整（红线描出部分）以及可见VEC（黄色箭头所指），F图为ME-NBI下可见LBC（黄色箭头所指）。

2.3 病变的病理组织学诊断标准

内镜检查操作过程中对病变部位进行EFB得到活检组织，迅速固定于10%福尔马林溶液中，经HE（Hematoxylin and eosin）染色后，由资深的胃肠病理领域的专家进行病理诊断。病理诊断分级标准参照我国慢性胃炎病理诊断标准以及新悉尼系统胃炎分类方法^[20]。慢性胃炎的组织学变化有5种，包括*H.pylori*、慢性炎症、活动性、萎缩和肠化生。慢性胃炎分为CNAG和CAG两类。CAG的诊断标准为：病理显示固有层腺体萎缩即可诊断，而不必考虑活检标本的萎缩块数和程度。CAG常伴有IM，胃固有腺体减少，肠腺样腺体增生修复，IM修复过程中发生发育异常，形成异型增生或上皮内瘤变，出现细胞的异型性和腺体结构的紊乱。OLGA与OLGIM分期可用于胃癌风险分层^[20-22]，能反应胃黏膜萎缩、肠化生的程度与范围。根据2019年《欧洲胃癌前状态和病变的管理指南》^[23]及2022年《中国慢性胃炎诊治指南》^[20]，定义OLGA/OLGIM 0-II期为低危患者，OLGA/OLGIM III-IV期为高危患者，诊断方法见表1、表2。

表1 OLGA分期分级诊断表

胃窦（含胃角）萎 缩评分	胃体萎缩评分			
	无	轻度	中度	重度
无	0	I	II	II
轻度	I	I	II	III
中度	II	II	III	IV
重度	III	III	IV	IV

注：OLGA: Operating Link for Gastritis Assessment, 胃炎评估系统。

表2 OLGIM分期分级诊断表

胃窦（含胃角）肠 化生评分	胃体肠化生评分			
	无	轻度	中度	重度
无	0	I	II	II
轻度	I	I	II	III
中度	II	II	III	IV
重度	III	III	IV	IV

注：OLGIM: operative link on gastritis assessment based on intestinal metaplasia, 基于肠化生的胃炎评价系统。

2.4 质量控制

由两位主要从事*H.pylori*相关胃癌前病变的高年资内镜医师对收集的病例胃镜图像进行判读；若两位内镜医师的意见不统一，则根据第三位内镜医师的结果作为判读结果。

2.5 统计学分析

描述性统计特征值由频数（百分比）表示，使用分类变量的卡方检验进行组间差异性分析，将组间有统计学意义（ $P < 0.05$ ）的指标进行多重共线性诊断，筛选可以入组贝叶斯（Bayes）逐步判别分析法的变量，剔除不能入组的变量，建立基于C-WLE及ME-NBI结合的OLGA/OLGIM分期胃癌前病变的综合诊断模型，并采用自身检验法和留一交叉验证法检验模型的准确率，最后构建受试者工作特征（receiver operating characteristic, ROC）曲线对诊断模型效能进行评价，评价指标包括ROC曲线下面积（Area under the receiver operating characteristic curve, AUC）、灵敏度、特异性。特殊说明：由于患者病变部位并不是有且只有一处，因此在具体的病变部位中采用频数（行百分比）表

示，并且不计算 P 值。

本研究中使用SPSS软件（版本号29.0；IBM, Armonk, NY, USA）进行统计分析。双侧检验 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

本研究共纳入422例患者有效C-WLE及ME-NBI图像，病理诊断均由中心病理盲法评估得出，根据OLGA/OLGIM分期计算，其中低危型OLGA 374例，高危型OLGA 48例；低危型OLGIM 306例，高危型OLGIM 116例。

3.1 入组患者的人口学特征及病变情况

低危型及高危型OLGA患者在年龄、性别人口学特征方面无显著差异，（ $P > 0.05$ ），在C-WLE下病变部位的色泽、表面类结节感、溃疡有无，病变边界是否清晰以及ME-NBI镜下IMVP、IMSP、WGA、VEC pattern等特征的有无均无明显差异， $P > 0.05$ 。而*H.pylori*感染状态类目中，高危型既往感染者有48例，无未感染及现症感染者；在高危型患者中，以多灶性病变为多，有48例；病变部位发生在胃体小弯、胃角及胃窦的人数较多；高危型病变的镜下大体形态以凹陷性最多，具有统计学意义，（ $P < 0.05$ ）。在C-WLE下观察，病变表面的糜烂、肠化斑是否可见、病变是否超过1cm以及病变不同的镜下表现，对判别低危、高危型患者具有显著的统计学差异，（ $P < 0.05$ ）。ME-NBI观察病变DL、LBC、WOS的有无、病变MCDL的范围以及MCDL边界是否清晰对高危型和低危型OLGA具有显著的统计学差异，（ $P < 0.05$ ），其中48例高危型患者均可见到LBC，44例（91.7%）可见到WOS，36例患者的MCDL边界不规整，占75%，MCDL边界 $\geq 2/3$ 者在高危型中人数为0。（表3）

表3 基于OLGA分期的人口学特征及病变情况

	总数 n (%)	低危型 OLGA (n = 374)	高危型 OLGA (n = 48)	P 值
年龄				0.351
≤40	29 (6.9%)	28 (7.5%)	1 (2.1%)	
<40-≤50	82 (19.4%)	74 (19.8%)	8 (16.7%)	
<50-≤60	156 (37.0%)	139 (37.2%)	17 (35.4%)	
>60	155 (36.7%)	133 (35.6%)	22 (45.8%)	
性别				0.281
女	189 (44.8%)	171 (45.7%)	18 (37.5%)	
男	233 (55.2%)	203 (54.3%)	30 (62.5%)	
<i>H.pylori</i> 感染状态				<0.001
未感染	74 (17.5%)	74 (19.8%)	0 (0.0%)	
现症感染	49 (11.6%)	49 (13.1%)	0 (0.0%)	
既往感染	299 (70.9%)	251 (67.1%)	48 (100.0%)	
病变数目				<0.001
无	32 (7.6%)	32 (8.6%)	0 (0.0%)	
单灶	95 (22.5%)	95 (25.4%)	0 (0.0%)	
多灶	295 (69.9%)	247 (66.0%)	48 (100.0%)	
病变部位				N/A
贲门直下	24	17 (70.8%)	7 (29.2%)	
胃体小弯侧	188	148 (78.7%)	40 (21.3%)	
胃底	4	4 (100%)	0 (0.0%)	
胃角	269	224 (83.3%)	45 (16.7%)	
胃窦	322	276 (85.7%)	46 (14.3%)	
胃体上部前壁、后壁	4	4 (100%)	0 (0.0%)	
胃体下部大弯侧	12	5 (41.7%)	7 (58.3%)	
幽门前区	40	39 (97.5%)	1 (2.5%)	

表3 基于OLGA分期的人口学特征及病变情况 (续表)

	总数 <i>n</i> (%)	低危型 OLGA (<i>n</i> = 374)	高危型 OLGA (<i>n</i> = 48)	<i>P</i> 值
大体形态				<0.001
无	32 (7.6%)	32 (8.6%)	0 (0.0%)	
隆起型	49 (11.6%)	49 (13.1%)	0 (0.0%)	
平坦型	177 (41.9%)	164 (43.9%)	13 (27.1%)	
凹陷型	164 (38.9%)	129 (34.5%)	35 (72.9%)	
		C-WLE		
色泽				0.133
无	32 (7.6%)	32 (8.6%)	0 (0.0%)	
同色	18 (4.3%)	17 (4.5%)	1 (2.1%)	
褪色	69 (16.4%)	59 (15.8%)	10 (20.8%)	
发红	303 (71.8%)	266 (71.1%)	37 (77.1%)	
糜烂				0.042
无	392 (92.9%)	344 (92.0%)	48 (100.0%)	
有	30 (7.1%)	30 (8.0%)	0 (0.0%)	
表面结节感				0.731
无	381 (90.3%)	337 (90.1%)	44 (91.7%)	
有	41 (9.7%)	37 (9.9%)	4 (8.3%)	
溃疡				0.612
无	420 (99.5%)	372 (99.5%)	48 (100.0%)	
有	2 (0.5%)	2 (0.5%)	0 (0.0%)	
清晰边界				0.082
无	308 (73.0%)	278 (74.3%)	30 (62.5%)	
有	114 (27.0%)	96 (25.7%)	18 (37.5%)	
肠化斑				<0.001
无	383 (90.8%)	350 (93.6%)	33 (68.8%)	
有	39 (9.2%)	24 (6.4%)	15 (31.2%)	
大小				<0.001
无	42 (10.0%)	42 (11.2%)	0 (0.0%)	
<1cm	231 (54.7%)	222 (59.4%)	9 (18.8%)	
≥1cm	149 (35.3%)	110 (29.4%)	39 (81.3%)	

表3 基于OLGA分期的人口学特征及病变情况 (续表)

	总数 <i>n</i> (%)	低危型 OLGA (<i>n</i> = 374)	高危型 OLGA (<i>n</i> = 48)	<i>P</i> 值
镜下表现				<0.001
无	259 (61.4%)	246 (65.8%)	13 (27.1%)	
斑状发红	43 (10.2%)	43 (11.5%)	0 (0.0%)	
地图样发红	91 (21.6%)	57 (15.2%)	34 (70.8%)	
弥漫性发红	21 (5.0%)	20 (5.3%)	1 (2.1%)	
黏膜水肿	7 (1.7%)	7 (1.9%)	0 (0.0%)	
鸡皮样改变	1 (0.2%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	
		ME-NBI		
DL				<0.001
无	240 (56.9%)	228 (61.0%)	12 (25.0%)	
有	182 (43.1%)	146 (39.0%)	36 (75.0%)	
IMVP				0.477
无	389 (92.2%)	346 (92.5%)	43 (89.6%)	
有	33 (7.8%)	28 (7.5%)	5 (10.4%)	
IMSP				0.835
无	390 (92.4%)	346 (92.5%)	44 (91.7%)	
有	32 (7.6%)	28 (7.5%)	4 (8.3%)	
LBC				<0.001
无	71 (16.8%)	71 (19.0%)	0 (0.0%)	
有	351 (83.2%)	303 (81.0%)	48 (100.0%)	
WOS				0.001
无	117 (27.7%)	113 (30.2%)	4 (8.3%)	
有	305 (72.3%)	261 (69.8%)	44 (91.7%)	
WGA				0.808
无	407 (96.4%)	361 (96.5%)	46 (95.8%)	
有	15 (3.6%)	13 (3.5%)	2 (4.2%)	
MCDL				<0.001
0	238 (56.4%)	226 (60.4%)	12 (25.0%)	
>0 且 <1/3	47 (11.1%)	26 (7.0%)	21 (43.8%)	
≥1/3 且 <2/3	50 (11.8%)	35 (9.4%)	15 (31.2%)	
≥2/3	87 (20.6%)	87 (23.3%)	0 (0.0%)	

表3 基于OLGA分期的人口学特征及病变情况 (续表)

	总数 <i>n</i> (%)	低危型 OLGA (<i>n</i> = 374)	高危型 OLGA (<i>n</i> = 48)	<i>P</i> 值
MCDL 边界是否规整				<0.001
无	239 (56.6%)	227 (60.7%)	12 (25.0%)	
是	91 (21.6%)	91 (24.3%)	0 (0.0%)	
否	92 (21.8%)	56 (15.0%)	36 (75.0%)	
VEC pattern				0.35
无	399 (94.5%)	355 (94.9%)	44 (91.7%)	
有	23 (5.5%)	19 (5.1%)	4 (8.3%)	

注: OLGA: Operating Link for Gastritis Assessment, 胃炎评估系统; *H.pylori*: *Helicobacter pylori*, *H.pylori*; C-WLE: Conventional White-Light Imaging Endoscopy, 传统白光内镜; ME-NBI: Magnifying Endoscopy-Narrow Band Imaging, 放大内镜-窄带成像技术; DL: Demarcation Line, 分界线; IMVP: Irregular Microvascular Pattern, 不规则的微血管结构; IMSP: Irregular Microsurface Pattern, 不规则的表面微细结构; LBC: Light Blue Crest, 亮蓝嵴; WOS: White Opaque Substance, 白色不透明物质; WGA: White Globe Appearance, 白球征; MCDL: Multiple Convex Demarcation, 由背景黏膜的小凹边缘上皮环绕的内侧有凸出的明显的分界线; VEC pattern: Vessels within Epithelial Circle pattern, 上皮环内血管模式。

OLGIM高危型患者共计116例, 占总纳入人数的27.5%, 比OLGA高危型(11.4%)统计人数多。其中人口学特征年龄、性别等无统计学意义($P > 0.05$)。在*H.pylori*感染状态类目中, 既往感染者为299例, 占70.9%; 病变多灶性发病者为295例; 在病变的大体形态方面, 平坦型病变占比最大, 为41.9%; C-WLE观察下, 病变色泽($P < 0.001$), 表面是否有糜烂($P = 0.002$), 病变表面是否有结节感($P=0.021$)、边界是否清晰($P < 0.001$)、是否可见明显肠化斑($P < 0.001$)、病变是否大于1cm($P < 0.001$)以及病变的镜下表现等特征均有统计学意义。ME-NBI观察下, 病变DL是否存在、LBC、WOS、WGA、VEC pattern的有无以及MCDL的不同界定范围、MCDL边界是否规整均具有统计学意义($P < 0.05$)。在116例OLGIM高危型患者中, 88例(75.9%)具有明显的DL边界, 115例(99.1%)具有LBC、108例(93.1%)具有WOS、85例(73.3%)患者的MC

DL边界清晰规整。而IMVP以及IMSP组间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。(表4)

表4 基于OLGIM分期的人口学特征及病变情况

	总数 <i>n</i> (%)	低危型 OLGIM (<i>n</i> = 306)	高危型 OLGIM (<i>n</i> = 116)	<i>P</i> 值
年龄				0.076
≤40	29 (6.9%)	27 (8.8%)	2 (1.7%)	
<40 且 ≤50	82 (19.4%)	60 (19.6%)	22 (19.0%)	
<50 且 ≤60	156 (37.0%)	110 (35.9%)	46 (39.7%)	
>60	155 (36.7%)	109 (35.6%)	46 (39.7%)	
性别				0.081
女	189 (44.8%)	145 (47.4%)	44 (37.9%)	
男	233 (55.2%)	161 (52.6%)	72 (62.1%)	
<i>H.pylori</i> 感染状态				<0.001
未感染	74 (17.5%)	74 (24.2%)	0 (0.0%)	
现症感染	49 (11.6%)	45 (14.7%)	4 (3.4%)	
既往感染	299 (70.9%)	187 (61.1%)	112 (96.6%)	
病变数目				<0.001
无	32 (7.6%)	32 (10.5%)	0 (0.0%)	
单灶	95 (22.5%)	92 (30.1%)	3 (2.6%)	
多灶	295 (69.9%)	182 (59.4%)	113 (97.4%)	
病变部位				N/A
贲门直下	24	11 (45.8%)	13 (54.2%)	
胃体小弯侧	188	91 (48.4%)	97 (51.6%)	
胃底	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)	
胃角	269	166 (61.7%)	103 (38.3%)	
胃窦	322	212 (65.8%)	110 (34.2%)	
胃体上部前壁、后壁	4	2 (50.0%)	2 (50.0%)	
胃体下部大弯侧	12	0 (0.0%)	12 (100.0%)	
幽门前区	40	38 (95.0%)	2 (5.0%)	

表 4 基于 OLGIM 分期的人口学特征及病变情况 (续表)

	总数 <i>n</i> (%)	低危型 OLGIM (<i>n</i> = 306)	高危型 OLGIM (<i>n</i> = 116)	<i>P</i> 值
大体形态				<0.001
无	32 (7.6%)	32 (10.5%)	0 (0.0%)	
隆起型	49 (11.6%)	47 (15.4%)	2 (1.7%)	
平坦型	177 (41.9%)	145 (47.4%)	32 (27.6%)	
凹陷型	164 (38.9%)	82 (26.8%)	82 (70.7%)	
		C-WLE		
色泽				<0.001
无	32 (7.6%)	32 (10.5%)	0 (0.0%)	
同色	18 (4.3%)	16 (5.2%)	2 (1.7%)	
褪色	69 (16.4%)	51 (16.7%)	18 (15.5%)	
发红	303 (71.8%)	207 (67.6%)	96 (82.8%)	
糜烂				0.002
无	392 (92.9%)	277 (90.5%)	115 (99.1%)	
有	30 (7.1%)	29 (9.5%)	1 (0.9%)	
表面结节状				0.021
无	381 (90.3%)	270 (88.2%)	111 (95.7%)	
有	41 (9.7%)	36 (11.8%)	5 (4.3%)	
溃疡				0.475
无	420 (99.5%)	305 (99.7%)	115 (99.1%)	
有	2 (0.5%)	1 (0.3%)	1 (0.9%)	
清晰边界				<0.001
无	308 (73.0%)	247 (80.7%)	61 (52.6%)	
有	114 (27.0%)	59 (19.3%)	55 (47.4%)	
肠化斑				<0.001
无	383 (90.8%)	295 (96.4%)	88 (75.9%)	
有	39 (9.2%)	11 (3.6%)	28 (24.1%)	

表 4 基于 OLGIM 分期的人口学特征及病变情况 (续表)

	总数 <i>n</i> (%)	低危型 OLGIM (<i>n</i> = 306)	高危型 OLGIM (<i>n</i> = 116)	<i>P</i> 值
大小				<0.001
无	42 (10.0%)	42 (13.7%)	0 (0.0%)	
<1cm	231 (54.7%)	192 (62.7%)	39 (33.6%)	
≥1cm	149 (35.3%)	72 (23.5%)	77 (66.4%)	
镜下表现				<0.001
无	259 (61.4%)	234 (76.5%)	25 (21.6%)	
斑状发红	43 (10.2%)	34 (11.1%)	9 (7.8%)	
地图样发红	91 (21.6%)	11 (3.6%)	80 (69.0%)	
弥漫性发红	21 (5.0%)	20 (6.5%)	1 (0.9%)	
黏膜水肿	7 (1.7%)	6 (2.0%)	1 (0.9%)	
鸡皮样改变	1 (0.2%)	1 (0.3%)	0 (0.0%)	
		ME-NBI		
DL				<0.001
无	240 (56.9%)	212 (69.3%)	28 (24.1%)	
有	182 (43.1%)	94 (30.7%)	88 (75.9%)	
IMVP				0.111
无	389 (92.2%)	286 (93.5%)	103 (88.8%)	
有	33 (7.8%)	20 (6.5%)	13 (11.2%)	
IMSP				0.364
无	390 (92.4%)	285 (93.1%)	105 (90.5%)	
有	32 (7.6%)	21 (6.9%)	11 (9.5%)	
LBC				<0.001
无	71 (16.8%)	70 (22.9%)	1 (0.9%)	
有	351 (83.2%)	236 (77.1%)	115 (99.1%)	
WOS				<0.001
无	117 (27.7%)	109 (35.6%)	8 (6.9%)	
有	305 (72.3%)	197 (64.4%)	108 (93.1%)	
WGA				<0.001
无	407 (96.4%)	302 (98.7%)	105 (90.5%)	
有	15 (3.6%)	4 (1.3%)	11 (9.5%)	

表 4 基于 OLGIM 分期的人口学特征及病变情况 (续表)

	总数 <i>n</i> (%)	低危型 OLGIM (<i>n</i> = 306)	高危型 OLGIM (<i>n</i> = 116)	<i>P</i> 值
MCDL				<0.001
0	238 (56.4%)	210 (68.6%)	28 (24.1%)	
>0 且 <1/3	47 (11.1%)	4 (1.3%)	43 (37.1%)	
≥1/3 且 <2/3	50 (11.8%)	8 (2.6%)	42 (36.2%)	
≥2/3	87 (20.6%)	84 (27.5%)	3 (2.6%)	
MCDL 边界是否规整				<0.001
无	239 (56.6%)	211 (69.0%)	28 (24.1%)	
是	91 (21.6%)	88 (28.8%)	3 (2.6%)	
否	92 (21.8%)	7 (2.3%)	85 (73.3%)	
VEC pattern				0.001
无	399 (94.5%)	296 (96.7%)	103 (88.8%)	
有	23 (5.5%)	10 (3.3%)	13 (11.2%)	

注: OLGIM: operative link on gastritis assessment based on intestinal metaplasia, 基于肠化生的胃炎评价系统; 余标注见表3。

3.2 Bayes逐步判别分析法胃癌前病变诊断模型的建立、验证及效能评价

3.2.1 诊断模型的建立

以OLGA/OLGIM低危型、高危型为因变量, 纳入3.1病变基本特征中差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的变量作为自变量, 分别进行赋值 (表5); 在进行Bayes判别方法前, 对筛选的变量进行共线性诊断, 以避免筛选的变量之间存在强烈的共线性关系, 使得Bayes判别方程的参数估计不准确, 方差膨胀因子 (variance inflation factor, VIF) < 30者即认为纳入的变量间不存在多重共线性, 进行下一步的Bayes逐步判别分析, 剔除不能入组的变量后, 建立基于OLGA/OLGIM分期的胃癌前病变的综合诊断模型。

表5 各变量及赋值表

变量	赋值
OLGA/OLGIM低危型、高危型 (Y)	0=低危型, 1=高危型
<i>H.pylori</i> 感染状态 (X ₁)	0=未感染, 1=现症感染, 2=既往感染
病变数目 (X ₂)	0=无, 1=单灶, 2=多灶
病变部位-贲门直下 (X ₃)	0=无, 1=有
病变部位-胃体小弯侧 (X ₄)	0=无, 1=有
病变部位-胃底 (X ₅)	0=无, 1=有
病变部位-胃角 (X ₆)	0=无, 1=有
病变部位-胃窦 (X ₇)	0=无, 1=有
病变部位-胃体上部前壁、后壁 (X ₈)	0=无, 1=有
病变部位-胃体下部大弯侧 (X ₉)	0=无, 1=有
病变部位-幽门前区 (X ₁₀)	0=无, 1=有
大体形态 (X ₁₁)	0=无, 1=隆起型, 2=平坦型, 3=凹陷型
色泽 (X ₁₂)	0=无, 1=同色, 2=褪色, 3=发红
糜烂 (X ₁₃)	0=无, 1=有
表面结节状 (X ₁₄)	0=无, 1=有
溃疡 (X ₁₅)	0=无, 1=有
清晰边界 (X ₁₆)	0=无, 1=有
肠化斑 (X ₁₇)	0=无, 1=有
大小 (X ₁₈)	0=无, 1=<1cm, 2= \geq 1cm
镜下表现 (X ₁₉)	0=无, 1=地图样发红, 2=斑状发红, 3=鸡皮样改变, 4=弥漫性发红, 5=黏膜水肿
DL (X ₂₀)	0=无, 1=有
IMVP (X ₂₁)	0=无, 1=有
IMSP (X ₂₂)	0=无, 1=有
LBC (X ₂₃)	0=无, 1=有
WOS (X ₂₄)	0=无, 1=有
WGA (X ₂₅)	0=无, 1=有
MCDL (X ₂₆)	0=0, 1= >0 且 $<1/3$, 2= $\geq 1/3$ 且 $<2/3$, 3= $\geq 2/3$
MCDL边界是否规整 (X ₂₇)	0=无, 1=是, 2=否
VEC pattern (X ₂₈)	0=无, 1=有

注: 标注见表3。

对上述OLGA低危型/高危型组间对比结果差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的变量包括 X_1 、 X_2 、 X_3 - X_{10} 、 X_{11} 、 X_{13} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{23} 、 X_{24} 、 X_{26} 、 X_{27} 等进行多重共线性诊断, 见表6, 根据临床实际内镜下表现, DL与MCDL存在一定的联系, 此时DL (X_{20}) VIF为30.588, MCDL边界是否规整 (X_{27}) 为13.859, 仍将以上变量纳入到Bayes判别分析法中进行研究, 使用逐步输入法尽量的减少对判别方程参数估计的不准确性, 逐步输入可以使总体威尔克Lambda最小化的变量, 其中需满足要输入的最小偏F为3.84, 要除去的最大偏F为2.71, 最终将变量 X_9 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{26} 、 X_{27} 纳入诊断方程, 此时威尔克Lambda值最小, 为0.712, $P < 0.001$, 这提示此系列变量得到的判别方程是有效的。最后根据Bayes判别方法, 得到分类函数系数判别方程: OLGA低危型 $= -2.300 - 0.579X_9 - 0.174X_{17} + 3.329X_{18} + 0.524X_{26} - 0.106X_{27}$; OLGA高危型 $= -8.287 + 3.069X_9 + 1.433X_{17} + 4.519X_{18} - 0.556X_{26} + 2.487X_{27}$ (表7)。

表6 内镜下特征诊断OLGA分期的多因素的共线性诊断

变量	β	标准误	β'	t 值	P 值	共线性分析	
						容差	VIF
常量	-0.034	0.046	-	-0.728	0.467	-	-
<i>H.pylori</i> 感染状态 (X_1)	0.018	0.026	0.045	0.717	0.474	0.436	2.296
病变数目 (X_2)	-0.069	0.058	-0.135	-1.196	0.233	0.135	7.425
病变部位-贲门直下 (X_3)	0.084	0.06	0.061	1.387	0.166	0.89	1.124
病变部位-胃体小弯侧 (X_4)	0.004	0.036	0.006	0.102	0.919	0.531	1.883
病变部位-胃底 (X_5)	-0.225	0.14	-0.069	-1.603	0.11	0.94	1.063
病变部位-胃角 (X_6)	0.061	0.049	0.092	1.246	0.213	0.315	3.179
病变部位-胃窦 (X_7)	0.038	0.056	0.051	0.67	0.503	0.302	3.311
病变部位-胃体上部前壁、后壁 (X_8)	-0.218	0.141	-0.067	-1.545	0.123	0.927	1.079
病变部位-胃体下部大弯侧 (X_9)	0.317	0.086	0.166	3.698	0	0.852	1.174

表6 内镜下特征诊断 OLGA 分期的多因素的共线性诊断 (续表)

变量	β	标准误	β'	t 值	P 值	共线性分析	
						容差	VIF
病变部位-幽门前区 (X_{10})	0.019	0.068	0.018	0.287	0.774	0.442	2.265
大体形态 (X_{11})	0.003	0.023	0.008	0.122	0.903	0.4	2.499
糜烂 (X_{13})	-0.042	0.054	-0.034	-0.768	0.443	0.888	1.126
肠化斑 (X_{17})	0.117	0.049	0.107	2.392	0.017	0.86	1.162
大小 (X_{18})	0.087	0.029	0.171	2.995	0.003	0.525	1.906
镜下表现 (X_{19})	-0.009	0.012	-0.032	-0.729	0.466	0.904	1.106
DL (X_{20})	-0.126	0.147	-0.197	-0.858	0.391	0.033	30.588
LBC (X_{23})	0.003	0.046	0.003	0.064	0.949	0.595	1.681
WOS (X_{24})	-0.013	0.036	-0.019	-0.369	0.712	0.659	1.517
MCDL (X_{26})	-0.05	0.032	-0.194	-1.561	0.119	0.111	8.981
MCDL 边界是否规整 (X_{27})	0.22	0.06	0.564	3.654	0	0.072	13.859

注：因变量为OLGA低危型/高危型分期。VIF: variance inflation factor, 方差膨胀因子; 余标注见表3。

表7 据OLGA分期判别分析模型分类函数系数

组别	胃体下部大弯侧 (X_9)	肠化斑 (X_{17})	大小 (X_{18})	MCDL (X_{26})	MCDL 边界是否规整 (X_{27})	常量
OLGA 低危型	-0.579	-0.174	3.329	0.524	-0.106	-2.300
OLGA 高危型	3.069	1.433	4.519	-0.556	2.487	-8.287

注：标注见表3。

对3.1部分OLGIM低危型/高危型组间对比结果差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的变量包括 X_1 、 X_2 、 X_3 - X_{10} 、 X_{11} 、 X_{12} 、 X_{13} 、 X_{14} 、 X_{16} 、 X_{17} 、 X_{18} 、 X_{19} 、 X_{20} 、 X_{23} 、 X_{24} 、 X_{25} 、 X_{26} 、 X_{27} 、 X_{28} 等进行多重共线性诊断, 见表8, 同OLGA的共线性诊断, 此时虽DL (X_{20}) VIF为31.539, MCDL边界是否规整 (X_{27}) 为14.150, 仍输入到Bayes逐步判别分析中, 逐步规定输入/排除值同OLGA分析, 最终将 X_4 、 X_9 、 X_{18} 、 X_{20} 、 X_{25} 、 X_{27} 、 X_{28} 共计7个变量纳入到诊断方程中, 此时得到最小的威尔克Lambda值0.335, $P < 0.001$ 。

根据Bayes判别方法, 得到分类函数系数判别方程: OLGIM低危型=-2.380-0.261 X_4 -0.96

$2X_9+3.392X_{18}+2.457X_{20}+0.536X_{25}-0.877X_{27}+0.002X_{28}$; OLGIM高危型= $-10.128+1.403X_4+3.899X_9+4.484X_{18}-9.699X_{20}+3.505X_{25}+10.252X_{27}+3.310X_{28}$ (表9)。

表8 内镜下特征诊断OLGIM分期的多因素的共线性诊断

变量	β	标准误	β'	t 值	P 值	共线性分析	
						容差	VIF
常量	-0.098	0.070		-1.395	0.164		
<i>H.pylori</i> 感染状态 (X_1)	0.043	0.025	0.074	1.723	0.086	0.435	2.300
病变数目 (X_2)	-0.066	0.057	-0.092	-1.150	0.251	0.126	7.936
病变部位-贲门直下 (X_3)	0.037	0.058	0.019	0.639	0.523	0.884	1.131
病变部位-胃体小弯侧 (X_4)	0.105	0.035	0.116	2.977	0.003	0.526	1.902
病变部位-胃底 (X_5)	0.031	0.136	0.007	0.226	0.822	0.924	1.082
病变部位-胃角 (X_6)	0.023	0.048	0.024	0.471	0.638	0.302	3.308
病变部位-胃窦 (X_7)	0.038	0.056	0.036	0.672	0.502	0.284	3.517
病变部位-胃体上部前壁、后壁 (X_8)	0.104	0.137	0.023	0.761	0.447	0.907	1.102
病变部位-胃体下部大弯侧 (X_9)	0.313	0.085	0.117	3.670	0.000	0.796	1.257
病变部位-幽门前区 (X_{10})	0.002	0.068	0.001	0.028	0.978	0.400	2.501
大体形态 (X_{11})	-0.008	0.027	-0.016	-0.290	0.772	0.274	3.654
色泽 (X_{12})	0.014	0.024	0.028	0.585	0.559	0.339	2.946
糜烂 (X_{13})	-0.060	0.055	-0.035	-1.096	0.274	0.806	1.241
表面结节状 (X_{14})	-0.083	0.050	-0.055	-1.652	0.099	0.721	1.386
清晰边界 (X_{16})	0.030	0.036	0.030	0.836	0.404	0.629	1.590
肠化斑 (X_{17})	0.060	0.048	0.039	1.262	0.208	0.847	1.180
大小 (X_{18})	0.054	0.028	0.075	1.907	0.057	0.516	1.939
镜下表现 (X_{19})	0.008	0.012	0.022	0.727	0.468	0.888	1.126
DL (X_{20})	-0.626	0.144	-0.695	-4.362	0.000	0.032	31.539
LBC (X_{23})	0.040	0.045	0.033	0.883	0.378	0.561	1.783
WOS (X_{24})	0.026	0.035	0.026	0.740	0.460	0.640	1.562
WGA (X_{25})	0.186	0.074	0.077	2.529	0.012	0.861	1.161
MCDL (X_{26})	-0.053	0.031	-0.146	-1.693	0.091	0.108	9.229
MCDL 边界是否规整 (X_{27})	0.660	0.058	1.203	11.280	0.000	0.071	14.150
VEC pattern (X_{28})	0.190	0.059	0.097	3.219	0.001	0.892	1.121

表9 据OLGIM分期判别分析模型分类函数系数

组别	胃体小	胃体下部	大小 (X ₁₈)	DL (X ₂₀)	WGA (X ₂₅)	MCDL 边 界是否规 整 (X ₂₇)	VEC pattern (X ₂₈)	常量
	弯侧 (X ₄)	大弯侧 (X ₉)						
OLGIM 低危型	-0.261	-0.962	3.392	2.457	0.536	-0.877	0.002	-2.380
OLGIM 高危型	1.403	3.899	4.484	-9.699	3.505	10.252	3.310	-10.128

注：标注见表3。

3.2.2 诊断模型的验证

在本研究中，分别采用了自身验证法以及留一交叉验证对3.2.1结果部分提出的诊断模型进行验证。OLGA分期采用自身验证法得到的正确率为88.6%，误判率是11.4%（表10），使用交叉验证得到的正确率是88.2%，误判率是11.8%（表11），具有较高的正确率；OLGIM分期使用自身验证及交叉验证后得到的正确率均为92.2%，误判率为7.8%（表12、表13），显示了较高的正确率。

表10 OLGA分期判别分析模型的自身验证法结果

判别分析模型预测结果	预测信息		合计
	OLGA 低危型	OLGA 高危型	
OLGA 低危型	350	24	374
OLGA 高危型	24	24	48
合计	374	48	422

注：标注见表3。

表11 OLGA分期判别分析模型的交叉验证结果

判别分析模型预测结果	预测信息		合计
	OLGA 低危型	OLGA 高危型	
OLGA 低危型	350	24	374
OLGA 高危型	26	22	48
合计	376	46	422

注：标注见表3。

表12 OLGIM分期判别分析模型的自身验证法结果

判别分析模型预测结果	预测信息		合计
	OLGIM 低危型	OLGIM 高危型	
OLGIM 低危型	298	8	306
OLGIM 高危型	25	91	116
合计	323	99	422

注：标注见表3。

表13 OLGIM分期判别分析模型的交叉验证结果

判别分析模型预测结果	预测信息		合计
	OLGIM 低危型	OLGIM 高危型	
OLGIM 低危型	298	8	306
OLGIM 高危型	25	91	116
合计	323	99	422

注：标注见表3。

3.2.3 诊断模型的效能评价

在此部分中，拟构建ROC曲线对3.2.1提出的OLGA/OLGIM分期诊断模型的诊断效能进行评价。运用OLGA/OLGIM分期诊断模型得到的判别得分进行ROC分析。结果显示，OLGA的AUC为0.904（95% CI, 0.870~0.939）， $P < 0.05$ ，根据最大约登指数得到其敏感度为87.5%，特异性为81.6%（图5-A）；OLGIM的AUC值为0.950（95% CI, 0.926~0.974）， $P < 0.05$ ，根据最大的约登指数得到其敏感度为82.8%，特异性为95.8%（图5-B）。

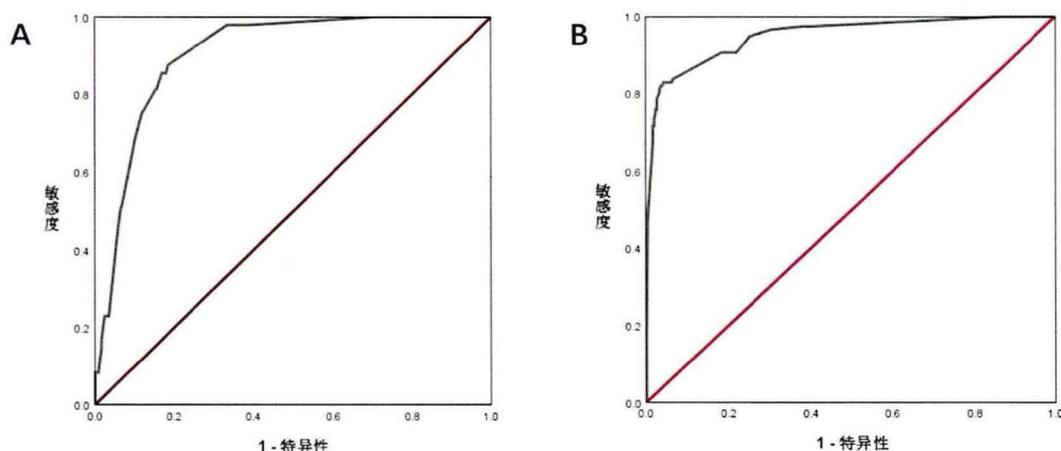


图5 OLGA/OLGIM分期诊断模型效能评价(ROC曲线)。OLGA分期诊断模型ROC曲线(A)和OLGIM

分期诊断模型ROC曲线 (B)

4 讨论

4.1 人口学特征分析

在本研究中,人口学特征部分显示,在年龄及性别方面,OLGA/OLGIM 低危型、高危型不存在统计学意义,我们将年龄转变为分类变量后发现纳入的 422 例患者年龄在 50 岁以上者有 311 例,随着年龄的增加,高危型 OLGA/OLGIM 患者人次逐渐上升,胃癌前病变的发病率随着年龄的增长而增加,这与胃癌的流行病学研究调查结果一致,胃癌在 < 50 岁的人群中发病率较低,在 55-80 岁之间的发病率较为平稳^[24]。这可能是在本次研究中低危型、高危型组间差异无统计学意义的主要原因;在多项胃癌的流行病学研究中,结果均显示男性胃癌的发病率是女性的两到三倍^[24-26],然本研究结果显示,在性别方面并无统计学意义,这可能是由于本研究中 OLGA/OLGIM III-IV 期作为胃癌前病变,距离发展为胃癌是一个较为漫长的过程,女性在发病过程中对于疾病的发生发展较为敏感,在就医行为上对比男性会更多的选择及时就医^[27],这得以解释,虽高危型胃癌前病变患病率相同,但男性人口患“致命性”一胃癌的比率比女性要高^[28]。

4.2 高危型 OLGA 分期的相关因素分析

本研究发现,*H.pylori* 感染状态、病变数目、病变大体形态、表面是否有糜烂、C-WLE 下是否可见肠化斑、镜下表现、病变大小,ME-NBI 下 DL、LBC、WOS、MCDL 的有无以及 MCDL 边界是否规整在低危/高危型组间具有显著差异,将以上变量进一步使用 Bayes 判别法探究与因变量(低危型/高危型)的关系后,我们得到与高危型 OLGA 关系密切的变量有病变部位(胃体下部大弯侧)(X_9)、C-WLE 下可见明显肠化斑(X_{17})、病变大小(X_{18})、MCDL 的有无(X_{26})以及 MCDL 边界是否规整(X_{27}),得到方程 $OLGA_{\text{高危型}} = -8.287 + 3.069X_9 + 1.433X_{17} + 4.519X_{18} - 0.556X_{26} + 2.487X_{27}$ 。通过对以上的诊断模型进行验证,得到 OLGA 的 AUC 为 0.904 (95% CI, 0.870~0.939), 其特异性为 81.6%, 敏感性为 87.5%, 表现出较高的胃癌前病变的诊断效能。

内镜下胃黏膜萎缩的严重程度与萎缩范围有一定的相关性,木村-竹本分型将胃黏膜的内镜分类分为闭合型(close type)与开放型(open type)两种,又将其进一步细分三个亚型,其中 O-3 代表萎缩已蔓延至胃体大弯侧,认为其是重度萎缩^[29-30]。在本研究中,病变部位涉及到胃体大弯侧被纳入到高危型 OLGA 的诊断模型中,这与前述研究结

论一致，病变已蔓延及胃体大弯侧，表明已达重度萎缩的范畴，属于高危型 OLGA。

进展期的 IM 作为胃癌前病变是进展为胃腺癌的前兆，IM 准确的诊断对早癌的筛查具有重要意义。一般来说，在平常筛查很难用 C-WLE 诊断 IM，内镜专家常使用 NBI 技术以提高 IM 的镜下诊断准确性。在本研究中，我们对胃镜图进行分类整理时发现，在某些患者中，C-WLE 下可以观察到白色的成片状的绒毛样白斑，冲洗后不褪色，换用 ME-NBI 观察发现腺体存在 LBC、WOS 等肠化特征，因此我们对这类 C-WLE 观察到的表现作为一个重要的变量：C-WLE 下可见的肠化斑（图 4B）。这种内镜下表现并不多发，在本研究纳入的 422 例患者中，仅发现 39 例患者存在此表现，其中有 15 例被证实为 OLGA 高危型。我们将这一变量纳入分析后发现，白光下可见肠化斑作为最后的变量纳入到高危型 OLGA 的诊断模型中。查阅文献发现，目前尚无对这一内镜下表现进行深入探讨的研究出现，本研究首次提出“白光下可见肠化斑”是高危型 OLGA 的风险因素，在内镜检查过程中当提起重视这一现象。

在本研究中，我们将病变大小划分为三类：无、 $< 1\text{cm}$ 和 $\geq 1\text{cm}$ ，在诊断模型中的系数为 4.519，权重较大，这提示病变 $\geq 1\text{cm}$ 是高危型病变的预测因素。这一与国内的一项研究结果相符，均提示了病变最大径超过 1cm 具有较高的恶变风险^[31]。

在本研究中，需要特殊说明的是 MCDL 这一变量存在的前提条件是 DL 的存在，因此在共线性诊断的条件下，即使 DL 与 MCDL 的 VIF 超过 10，我们根据临床实际情况，依然将其纳入诊断模型中。在最后得到的诊断模型中，可以看到 MCDL 范围的系数为 -0.556，这表明被更多的小凹上皮环绕是一个保护因素，即 $\text{MCDL} \geq 2/3$ 是一个保护性因素，风险越低。这一研究结果与日本学者的一项结果一致，均提示 MCDL 与癌性病变更呈负相关^[32]。因此，虽然 DL 的存在与癌呈正相关，但 $\text{MCDL} \geq 2/3$ 确是保护性因素，这提示我们在内镜操作过程中，根据 MESDA-G 简化流程仅是判断 DL 后即进行下一步的判别并不完全可靠，细致的对 DL 进行观察同样重要。

由于 DL 的观察相对主观，同样将 MCDL 边界分类为 0、 > 0 且 $< 1/3$ 、 $\geq 1/3$ 且 $< 2/3$ 、 $\geq 2/3$ 更具有主观性，因此，在本研究中，我们纳入了一种相对客观的变量—MCDL 的边界是否规整，在实际对内镜表现进行判别时，观察 MCDL 的边界是否规整较为可行，在最后的 OLGA 高危型诊断模型中，MCDL 边界是否规整这一变量的系数为 2.487，占

据较大的权重，这表明 MCDL 边界不规整具有较高的恶变风险，是高危型病变的预测因素。到目前，对于 MCDL 的研究依然较少，我们认为更加准确、细致地研究内镜下特征对于判别高危型胃癌前病变具有重要的社会意义，真正地实现对高危患者的筛查，并制定出相应的随访策略。

4.3 高危型 OLGIM 分期的相关因素分析

在本研究中得到病变部位（胃体小弯侧）（ X_4 ）、病变部位（胃体下部大弯侧）（ X_9 ）、病变大小（ X_{18} ）、DL 的有无（ X_{20} ）、WGA 的有无（ X_{25} ）、MCDL 边界是否规整（ X_{27} ）以及 VEC pattern 的有无（ X_{28} ）等 7 个变量与高危型 OLGIM 相关，通过 Bayes 判别法得到诊断模型的判别方程为高危型 OLGIM $= -10.128 + 1.403X_4 + 3.899X_9 + 4.484X_{18} - 9.699X_{20} + 3.505X_{25} + 10.252X_{27} + 3.310X_{28}$ ，然后对方程进行验证后发现，OLGIM 诊断模型的 AUC 值为 0.950（95% CI, 0.926~0.974），敏感度为 82.8%，特异性为 95.8%，显示了较高的诊断效能。

与高危型 OLGA 不同的是，高危型 OLGIM 诊断模型还涉及到病变部位—胃体小弯侧。有研究显示，随着 IM 程度以及范围逐渐扩大，在胃体小弯侧、胃窦小弯侧出现的概率更大^[33]，即可以理解为 IM 更多发生在胃体小弯侧、胃窦小弯侧；同时有研究结果表明，随着胃体小弯侧 IM 的发现，患胃癌的风险逐渐增加^[34]；后又有研究提出，对 3 个活检部位（胃体小弯侧、胃窦小弯侧及胃角）活检与新悉尼推荐^[35]的标准方案 5 个活检部位评判 OLGA/OLGIM 的一致性达到 95%^[36]，这也侧面反应重视胃体小弯侧这一疾病好发部位对于高危型胃癌前病变筛查的重要性。以上研究结果与本研究结果相一致，均提出了胃体小弯侧 IM 是高危型 OLGIM 的风险因素，这也提示我们在内镜检查过程中翻转内镜后对胃体小弯侧要进行更加细致耐心的检查。

WGA 的定义是“在 ME-NBI 观察中见到的存在于上皮正下方的小白色球形表现”^[37]。在本研究中，WGA 的提示了其可能是 OLGIM 高危型的风险因素，作为定性诊断，我们可以认为 WGA 的出现代表了高风险，但是正如很多研究提示，胃炎、消化性溃疡或 ESD 术后的良性溃疡中同样可以见到 WGA，因此在本研究中 WGA 能否作为恶性病变的标志因素同样应该结合 ME-NBI 诊断体系进行评判，WGA 是较为容易判定的内镜下表现的现象，所以后续应该收集更多的病例探究 WGA 的评判效能以及对 WGA 与相

关性胃疾病的关系进行探索。

VEC pattern 指血管存在于被圆形的小凹边缘上皮所包围的圆形的窝间部上皮下的间质中这一特征性表现。最初报道这一内镜下表现的是日本学者金光高雄 (Takao Kanemitsu) [38], 他提出关于 VEC pattern 有两个注意要点, 第一是 VEC pattern 阳性的小凹边缘上皮应该是规整的正圆形而不是类圆形 (见图 4E 黄色箭头所指处); 第二点是 VEC pattern 是诊断组织学上乳头状结构的指标而不是鉴别癌与非癌的指标。在本研究中纳入的 422 例患者, 仅有 23 例发现了 VEC pattern, 比例仅为 5.5%, 在高危型 OLGIM 诊断模型中其系数为 3.310, 这提示了 VEC pattern 可以作为高危型 OLGIM 的风险因素, 可以作为有用的标志物对高危型 OLGIM 进行检测。但是今后需要进行前瞻性研究, 收集更多的病例全方位的进行 C-WLE 联合 ME-NBI 观察病变, 研究其组织学与内镜下表现的相关性。

4.4 OLGA 与 OLGIM 分类系统的侧重及差异

OLGA 分类是根据胃黏膜萎缩的组织学进行判定分期, 而病理学家在评判腺体萎缩方面存在显著差异, 因此会存在可重复性差的问题; 而 OLGIM 是根据胃黏膜肠上皮化生的水平进行评估, 对于肠上皮化生程度的判定并不会存在显著的差异, 因为它是基于胃黏膜中出现的杯状细胞/潘氏细胞的多少进行判别, 这些是很容易识别的表现。因此 OLGIM 分类会比 OLGA 更易于应用, 且具有更好的可重复性, 但 OLGIM 分类系统缺乏对非化生性萎缩胃黏膜的评判, 因此可能会低估某些萎缩患者的风险。两种分类系统对胃癌风险评估具有相互补充, 相互印证的作用, 所以在临床中应当结合二者来对高危患者进行评判并制定合适的内窥镜监测周期。

此外, 本研究尚存在以下几点局限性: ①本研究纳入的数据仅为单中心的数据, 患者人群以及病种具有一定的局限性, 且纳入的病例数较少, 未对得到的诊断模型进行外部验证; ②在纳入的人口学的基本资料中, 对于患者的个人起居史、生活习惯嗜好、胃肠道肿瘤家族史等资料未进行相应的收集, 需在之后的研究中进行优化, 进一步完善多中心、大样本的调查, 同时标准量化调查问题。

第二部分 单细胞转录组测序解析 *H.pylori* 相关性胃癌前病变上皮细胞分化图景

概述

在第一部分结果中，我们已经介绍了在 ME-NBI 下 *H.pylori* 相关性胃癌前病变的镜下表现，确定与高危型 OLGA/OLGIM 密切相关的变量类目，然而 ME-NBI 只能通过观察病变黏膜表面的异型腺管、微血管形态来明确病变的发生，对于腺颈部及其以下细胞异常分化的观察无法实现，因此，在本章节中将通过单细胞测序技术解析 *H.pylori* 相关性胃癌前病变腺体组成细胞的分化图景，并绘制异常增殖细胞的分化轨迹以揭示胃癌前病变的发生发展基础。

有研究结果显示，在 *H.pylori* 及其毒素持续刺激下，胃黏膜处于慢性炎症状态，导致胃腺体产酸的壁细胞损伤、消失从而加速了 Correa 的进程。随着壁细胞的丢失，*H.pylori* 诱导了适应性应答，整个胃体腺体的结构会发生化生性的变化，这种变化被称为“胃窦化”。所以即使在根除 *H.pylori* 后，异常的促炎和遗传毒性因子会驱动位于胃腺体基底部的细胞重编程为增殖、修复化生状态，此现象称为“返祖”现象，目前研究认为，胃腺体细胞返“祖”是平衡感染和再生所必需的过程，其异常的增殖分化过程才是肿瘤发生的细胞生物学基础。然而目前对于这些具有了胚胎样干细胞功能的祖细胞的分化来源及恶性转化的分子机制仍不清楚。

传统的 RNA 测序技术是对小块 (bulk) 组织进行转录组分析，这是探究一群/一类细胞的表达性基因，即 Bulk RNA sequencing (Bulk RNA-seq)，但是由于 bulk 组织由不同的细胞构成，例如，正常的胃底腺组织就由小凹细胞、干细胞、颈黏液细胞、壁细胞以及主细胞构成，每种细胞的代表性基因存在着差异，但使用 Bulk RNA-seq 测序无法揭示特定细胞类群或细胞状态的信号，而这些不同的细胞类群的分化轨迹正是亟需我们解开的“谜”。因此，单细胞 RNA 测序技术 (single-cell RNA sequencing, scRNA-seq) 克服了 Bulk RNA-seq 掩盖细胞成分之间的关键差异的缺陷，使得对单个细胞的转录组进行研究成为可能。该研究可以解析不同细胞演化轨迹以及不同细胞类群之间的时空关系，这与我们想要探究的胃癌前病变细胞转化的主题不谋而合，在本研究中，我们拟通过对不同时期的胃癌前病变细胞组织进行 scRNA-seq，以此探究 *H.pylori* 感染对胃黏膜

上皮细胞类群的影响并识别新的细胞类型，绘制 *H.pylori* 相关性胃癌前病变细胞分化图谱，以期找到胃癌前病变发生发展过程中的关键步骤与关键细胞群，为胃癌的由“治”转“防”提供新的理解。

1 材料与方法

1.1 数据下载

本研究纳入的单细胞测序数据部分来源于 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) 中的 GSE134520 芯片数据，共计 10 例，另有 4 例来源于临床样本收集制作，因此用于本次分析的样本共计 14 例。其中，4 例 CSG 作为对照组，4 例 CAG，5 例 IM 以及 1 例早期胃癌 (early gastric cancer, EGC) 组织标本，纳入的患者年龄、性别以及病理类型见表 14。

1.2 单细胞 RNA-seq 数据分析及数据挖掘过程

1.2.1 单细胞 RNA-seq 数据预处理

首先，使用 CellRanger (v2.1.0) 以及默认和推荐参数对样本测序进行深度标准化。使用 STAR 算法将 Illumina 测序输出产生的 FASTQ 序列文件与人类的参考基因序列 hg19 版本进行比对。接下来，通过计数唯一分子标识符 (unique molecular identifier, UMI) 和过滤非细胞相关条形码，为每个单独的样本生成基因条形码矩阵。最后，我们生成一个包含条形码细胞和基因表达计数的基因条形码矩阵 feature-barcode matrix。然后将该矩阵导入 Seurat (v4.1.3) R 工具包，用于单细胞 RNA-seq 数据的质量控制和下游分析。由于本研究中我们分析的单细胞 RNA-seq 是多个批次生成的数据，在单细胞处理过程中会出现“批次效应”，因此我们在多样本整合 (merge) 后对整合后的样本使用 Harmony 去批次效应后进行数据过滤，我们排除了表达基因少于 500 个或超过 6000 个的细胞 (其中每个基因必须在至少三个细胞中排列至少一个 UMI)。使用 Seurat 包的 PercentageFeatureSet 函数计算线粒体基因的表达。为了去除低活性细胞，排除线粒体基因表达超过 10% 的细胞。进行归一化数据 (Seurat 包中的 NormalizeData 函数) 以提取可变基因的子集，最终共计 35557 个细胞通过质量控制，并被纳入到下游分析。

1.2.2 细胞聚类及构建细胞亚群分型图

使用 R 工具包 Seurat (v4.1.3) 进行细胞聚类、差异基因表达分析和可视化处理。

使用“FindNeighbors”函数对细胞进行分群，然后使用“RunTSNE”对分类后的细胞亚群进行可视化，使用“FindAllMarkers”功能找到所有细胞亚群的特异性基因后根据文献进行人工注释，然后对细胞亚群进行命名。

1.2.3 拟时序方法构建细胞发育轨迹

我们使用了 Monocle2 程序包研究上皮细胞亚群之间的分化轨迹和潜在关系。我们从 Seurat 对象中提取构建 CDS 对象所需要的 3 个输入文件：表达矩阵信息、基因信息和表型信息，然后对得到的 cds 文件进行标准化，过滤低质量的细胞（过滤掉在小于 10 个细胞中表达的基因），然后使用“dpFeature”方法将数据中的基因进行排序，根据基因表达量，选择前 1000 个基因用于排序，然后使用反向图嵌入法“DDRTree”算法对数据进行降维。根据选择基因的表达趋势，将细胞排序并完成轨迹构建。

1.2.4 细胞间通讯分析（Cellchat）

我们使用 Cellchat 程序包分析信号配体、受体以及辅助因子基因的表达与互作关系，同时可视化处理。首先我们构建 Cellchat 对象，然后导入 CellchatDB 公共知识库里相关信息学，对数据进行预处理后用于细胞间的通讯分析，然后通过为每个相互作用分配一个概率值并进行置换检验来推断生物意义上的细胞与细胞之间的通信，统计分析部分结束后，我们将细胞互作关系使用网络图、层次图进行展示。

1.2.5 构建中药复方干预胃黏膜上皮细胞类群表达基因的网络拓扑模型

在中药系统药理学数据库及分析平台（TCMSP, <https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>）中对本课题组前期临床确有疗效的中药复方参白颗粒中“柴胡、紫苏梗、太子参、白花蛇舌草、薏苡仁、莪术”的药物组成进行检索，设置“口服生物利用度（OB） $\geq 30\%$ ”且“药物相似性（DL） ≥ 0.18 ”，筛选出上述中药复方活性成分的作用靶点信息。然后将参白颗粒的活性成分作用靶点与单细胞 RNA-seq 得到的各类胃黏膜上皮细胞类群表达基因取交集，构建参白颗粒干预胃黏膜上皮细胞类群表达基因的网络拓扑模型。将该模型导入到 Cytoscape 3.10.1 软件中，构建参白颗粒治疗 *H.pylori* 相关胃黏膜上皮细胞类群的“活性成分-靶点-细胞类群”关联网络可视化。

2 统计方法

本研究中所有统计分析均使用 R 语言^[30]（版本号 4.2.3, the R Foundation for Statistical

Computing, Vienna, Austria) 进行统计分析。双侧检验 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般资料

本研究纳入了 12 例患者共计 14 个组织样本的单细胞测序结果, 患者的临床样本一般特征见表 14。

表 14 患者临床样本一般特征

样本 ID	患者 ID	年龄	性别	取材部位	<i>H.pylori</i> 感染状态	组织类型	细胞数目
CSG1	P1	58	男	胃窦	-	CSG	1791
CSG2	P2	56	女	胃窦	-	CSG	1446
CSG3	P3	62	男	胃窦	-	CSG	1028
CSG4	P4	51	女	胃体下部 小弯侧	现症 感染	CSG	1914
CAG1	P5	51	男	胃窦	既往 感染	CAG	2225
CAG2	P6	62	女	胃窦	既往 感染	CAG	5290
CAG3	P6	62	女	胃窦	既往 感染	CAG	6393
CAG4	P7	60	男	胃体下部 大弯侧	既往 感染	CAG	4720
IM1	P8	63	男	胃窦	现症 感染	IM with mild level	793
IM2	P9	68	男	胃窦	现症 感染	IM with severe level	1263
IM3	P9	68	男	胃窦	现症 感染	IM with severe level	1339
IM4	P10	69	男	胃窦	既往 感染	IM with severe level	1721
IM5	P11	58	男	胃窦	现症 感染	IM with severe level	4460
EGC	P12	67	男	胃窦	-	EGC	1174

注：CSG, Chronic superficial gastritis, 慢性浅表性胃炎；CAG, Chronic atrophic gastritis, 慢性萎缩性胃炎；IM, Intestinal metaplastic, 肠上皮化生；EGC, Early gastric cancer, 早期胃癌。

3.2 单细胞图谱细胞类群鉴定及细胞比例分析

我们分析了 14 例组织样本的单细胞转录图谱。通过前期的单细胞测序分析，对多组数据进行整合、去批次以及数据质控后，我们一共获得 35557 个细胞进行后续数据分析。其中 14 例样本单独的细胞数目及分组表现见表 14，图 6A，我们根据病理类型对 35557 个细胞进行分类，其中 CSG 组有 6179 个细胞，CAG 组有 18628 个细胞，IM 组有 9576 个细胞，EGC 组有 1174 个细胞（图 6B）。然后我们对所有的细胞进行了无监督聚类分析，根据细胞的表达谱的相似程度进行聚类细胞亚群共得到 24 个细胞亚群，通过对每种细胞亚群的特异性标记基因进行人工注释后，将 24 个细胞亚群归属于 17 个细胞类型，包括 T 细胞、B 细胞、LGR5+ stem 细胞、小凹细胞(Pit cells)、内皮细胞(Endothelial cells)、巨噬细胞 (Macrophage cells)、肠内分泌细胞 (Endocrine cells)、颈黏液细胞 (Mucous neck cells)、主细胞 (Chief cells)、MKI67+ progenitor 细胞、DCKL1+ progenitor 细胞、肿瘤细胞 (Cancer cells)、潘氏细胞 (Paneth cells)、Goblet progenitor 细胞、肥大细胞 (Mast cells)、Pit progenitor 细胞以及壁细胞 (Parietal cells) (图 6C)。

同时我们发现 14 例样本组织中并不是全部都存在这 17 种细胞类型，每例组织中各个细胞类型的数目有所不同（图 7A），同时我们可以发现在 IM 的 5 例样本组织及 EGC 的 1 例样本组织中，几乎不含巨噬细胞（表 15）。此外，在四种不同的组别中 17 种细胞类型也存在不同比例的分布（图 7B）。

表 15 细胞类型数目在不同样本中的分布

细胞类型	样本 ID													
	CSG1	CSG2	CSG3	CSG4	CAG1	CAG2	CAG3	CAG4	IM1	IM2	IM3	IM4	IM5	EGC
T 细胞	3	19	6	295	72	310	705	2516	67	13	3	200	1718	25
LGR5+ stem	135	190	594	11	635	2148	379	109	60	416	867	95	236	867
B 细胞	6	134	30	591	378	314	40	1554	33	319	161	714	1388	2
小凹细胞	134	68	18	0	305	288	2249	0	9	1	0	2	0	0
内皮细胞	1319	765	45	0	1	38	38	0	2	2	2	0	0	1
巨噬细胞	6	4	8	0	3	0	1285	0	0	0	1	0	0	0
肠内分泌细胞	64	35	156	12	256	614	676	4	20	20	28	4	172	256
颈黏液细胞	5	27	54	6	285	572	144	0	95	7	5	6	1	3
主细胞	0	0	0	821	0	0	2	7	8	2	0	78	281	0
MKI67+ progenitor	95	124	81	101	217	734	374	192	130	52	27	86	130	3
DCKL1+ progenitor	2	46	14	0	49	180	348	0	142	81	51	0	5	2
肿瘤细胞	1	0	0	59	0	0	0	22	2	0	0	488	153	0
潘氏细胞	20	24	22	9	4	13	29	210	47	45	26	14	136	4
Goblet progenitor	0	2	0	7	0	3	1	0	160	277	143	1	3	3
肥大细胞	1	3	0	2	2	30	73	65	12	11	21	25	48	8
Pit progenitor	0	0	0	0	0	0	0	33	0	0	0	1	188	0
壁细胞	0	5	0	0	18	46	50	8	6	17	4	7	1	0

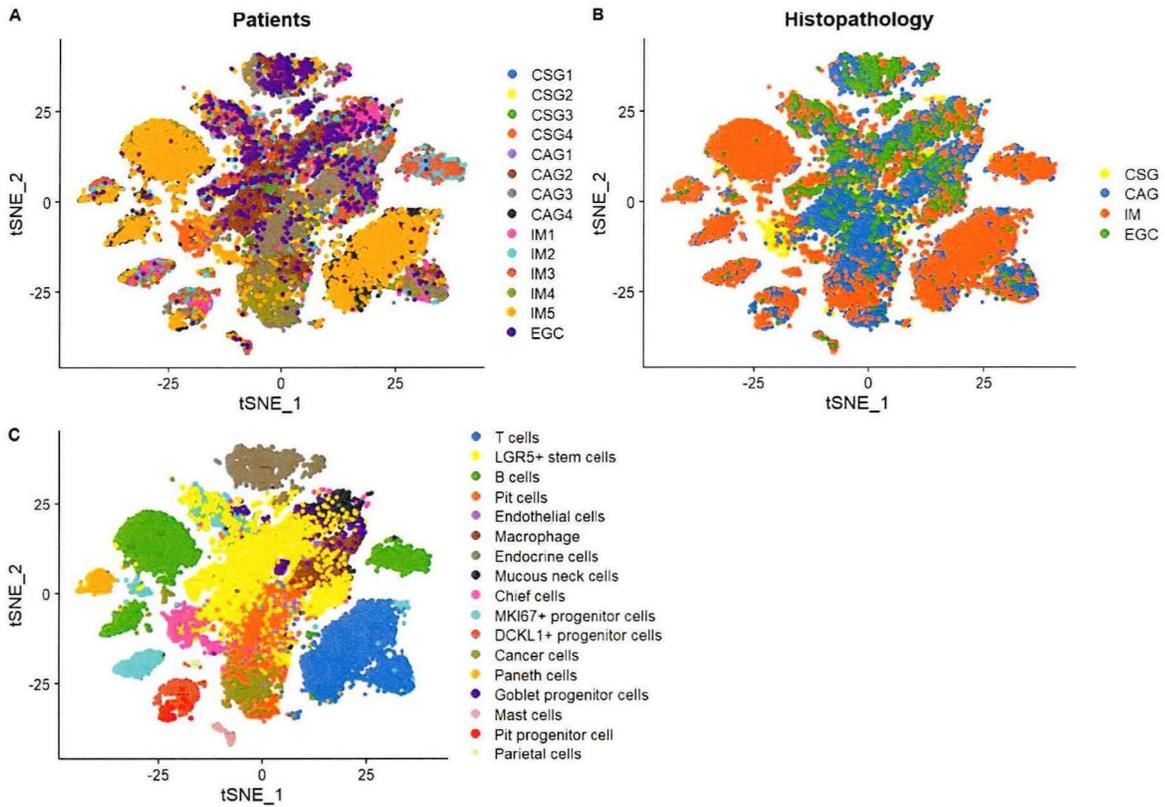


图 6 细胞类群分群鉴定。14 例样本的单细胞分群图。A. 不同样本 ID 的所有单细胞 tSNE 图（每种颜色代表一个样本）。B. 不同组别的所有单细胞 tSNE 图（每种颜色代表一个组别）。C. 不同细胞亚群的 tSNE 图（每种颜色代表一个细胞亚群）。

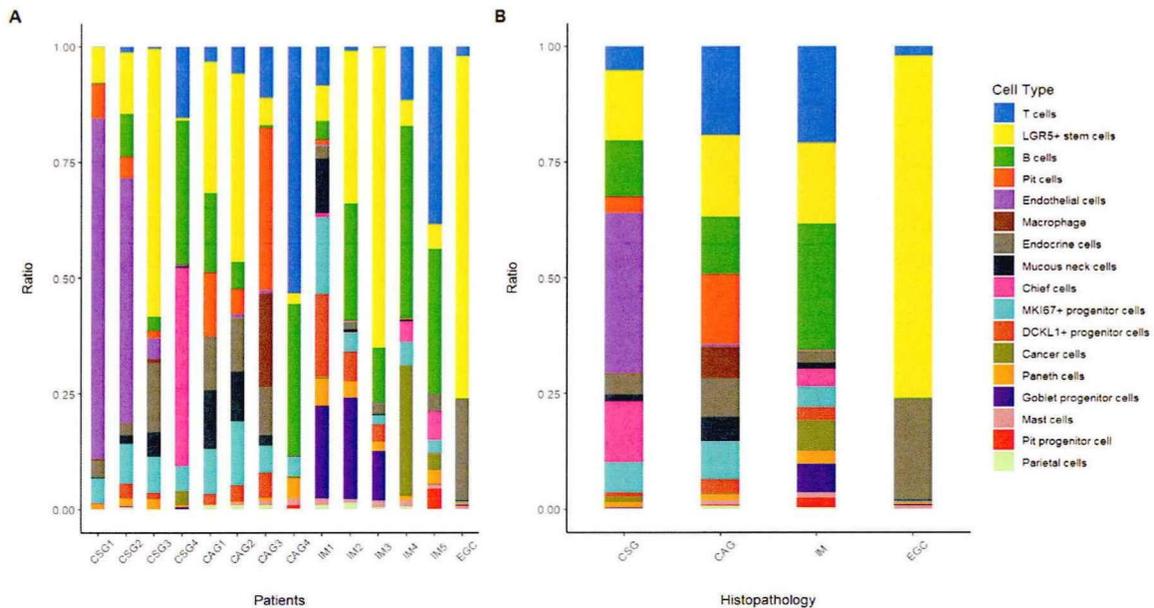


图 7 17 种细胞类型在不同样本及组别中所占比例分析。A. 17 种细胞类型在 14 例样本中所占比例。B. 17 种细胞类型在 4 组不同病理类型中所占比例。

3.3 *H.pylori* 不同感染状态的单细胞分析及关键基因通路鉴定

3.3.1 *H.pylori* 不同感染状态的单细胞类群鉴定

我们从前述 14 例样本中取出 10 例 *H.pylori* 相关的单细胞数据将其分类为 *H.pylori* 现症感染组 (*H.pylori*-Positive, 简称为 HP, 下同) 5 例以及 *H.pylori* 既往感染组 (*H.pylori*-Negative, 简称为 HN, 下同) 5 例, 对多样本进行整合、去批次以及数据质控后一共获得 20266 个细胞, 单细胞样本鉴定图见图 8A。我们根据 *H.pylori* 不同的感染状态进行分组, 其中 HN 组有 10497 个细胞, *H.pylori* 组有 9769 个细胞 (图 8B)。对所有细胞进行聚类分析共得到 19 个细胞亚群, 使用人工注释方法注释每种细胞亚群的标记基因, 共归属 14 个细胞类型, 包括 T 细胞、B 细胞、LGR5+ stem 细胞、主细胞 (Chief cells)、Pit mucous 细胞、成纤维细胞 (Fibroblast cells)、肿瘤细胞 (Cancer cells)、内分泌细胞 (Endocrine cells)、潘氏细胞 (Paneth cells)、MKI67+ progenitor 细胞、肠上皮细胞 (Enterocyte cells)、肥大细胞 (Mast cells)、杯状细胞 (Goblet cells) 以及壁细胞 (Parietal cells) (图 8C)。

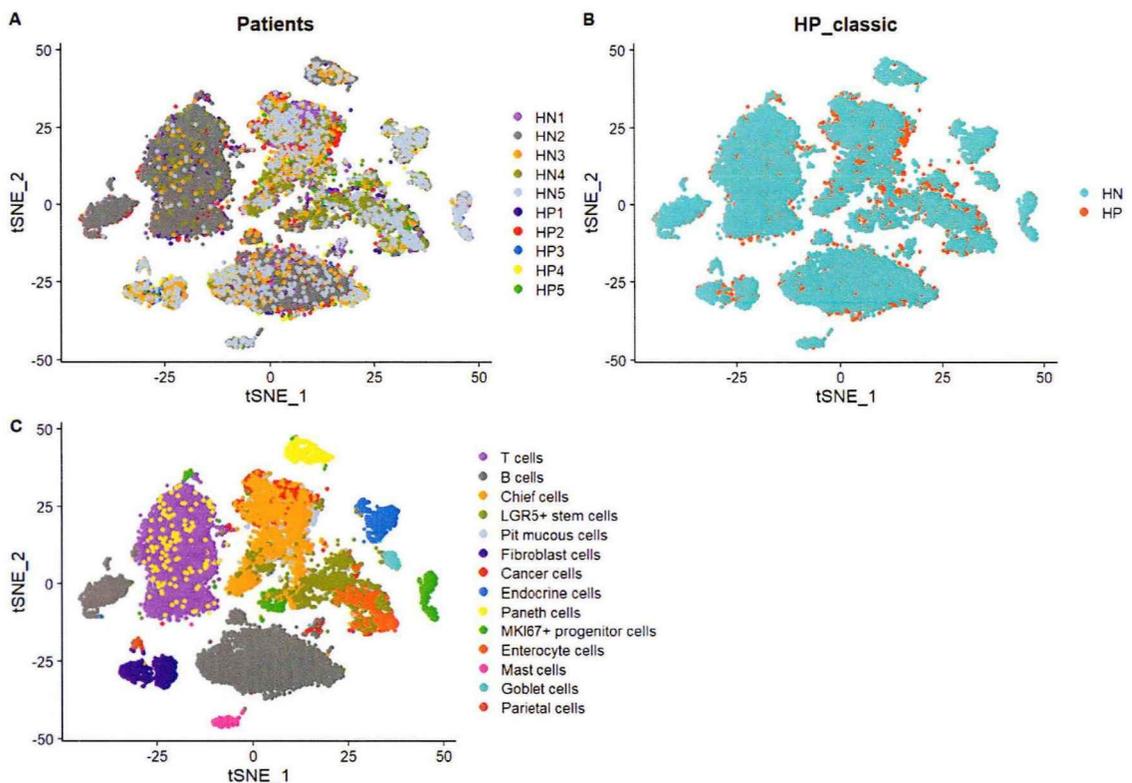


图 8 细胞类群分群鉴定。*H.pylori* 感染不同状态的单细胞分群图。A. 不同样本 ID 的所有单细胞 tSNE 图 (每种颜色代表一个样本)。B. 不同组别的所有单细胞 tSNE 图 (每种颜色代表一个组别)。C. 不同细胞亚群的 tSNE 图 (每种颜色代表一个细胞亚群)。

我们在进行细胞类型在不同样本以及不同分组中的比例分析时发现, *H.pylori* 不同状态的两种分组均包含了 14 种细胞类型, 存在着不同的比例分布, 然而, 单独分析这 10 例样本组织, 并不是每一例样本中都包含着全部的 14 种细胞类型, 具体的细胞比例见图 9A 及表 16。我们对 *H.pylori* 不同分组细胞类群的比例进行展示后发现, 在 *H.pylori* 现症感染组中, Pit mucous 细胞及 LGR5+ stem 细胞数目要多于 *H.pylori* 既往感染, 而主细胞、肿瘤细胞的数目要少于 *H.pylori* 既往感染 (图 9B)。

表 16 细胞类型数目在不同样本中的分布

细胞类型	样本 ID									
	HN1	HN2	HN3	HN4	HN5	HP1	HP2	HP3	HP4	HP5
T 细胞	195	2510	4	4	4	1722	292	22	3	2
B 细胞	710	1544	196	14	303	1376	578	33	314	159
主细胞	58	5	536	302	358	26	80	340	304	146
LGR5+ stem 细胞	51	63	149	452	95	213	3	18	267	814
Pit mucous 细胞	59	5	1	2	0	304	792	7	1	0
成纤维细胞	1	33	244	16	80	192	0	137	80	49
肿瘤细胞	486	18	1	0	1	145	66	1	0	0
内分泌细胞	5	4	105	231	126	175	11	18	19	24
潘氏细胞	17	211	68	87	53	133	14	91	55	27
MKI67 progenitor 细胞	73	182	45	45	93	102	77	103	50	27
肠上皮细胞	27	38	0	16	243	2	0	2	98	6
肥大细胞	27	76	1	14	30	52	1	12	11	21
杯状细胞	5	23	9	31	37	16	0	3	44	59
壁细胞	7	8	31	7	22	2	0	8	17	5

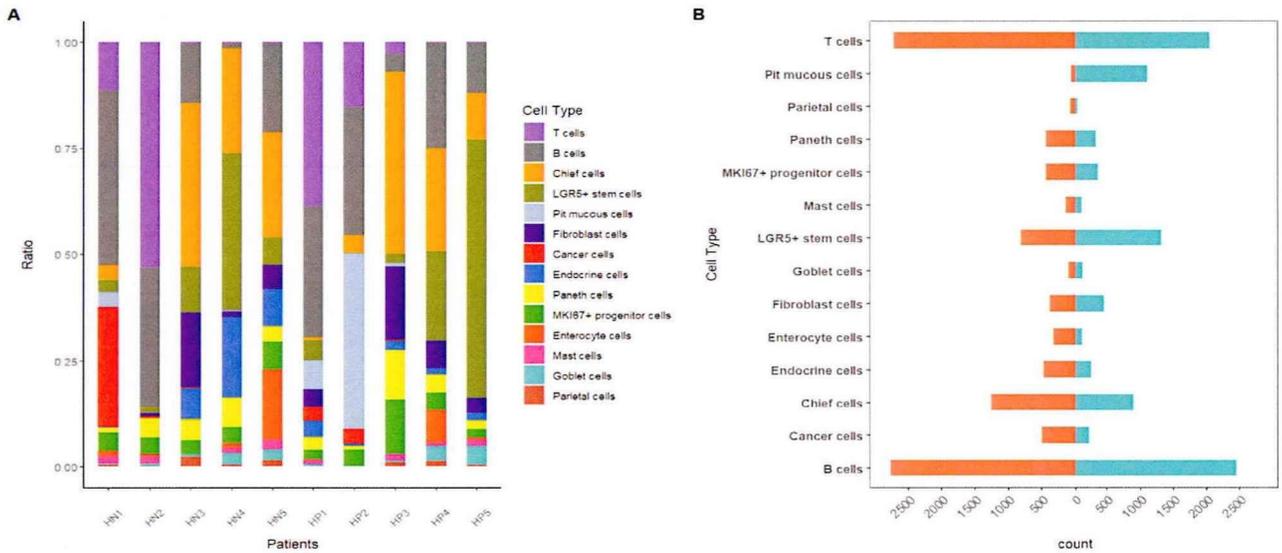


图 9 14 种细胞类型在不同样本及组别中所占比例分析。A. 14 种细胞类型在 10 例样本组织中所占比例。B. 14 种细胞类型在 *H.pylori* 不同感染状态分组中所占比例。

注：HP: *H.pylori* 现症感染组；HN: *H.pylori* 既往感染组。

我们对 10 种胃黏膜上皮细胞的特异性基因进行展示 (图 10)，我们发现主细胞 (标记为 PGC) 与 Pit mucous 细胞 (标记为 GKN2) 数目较多，由于我们选择的 10 例样本组织均与 *H.pylori* 感染相关，一般来说，在正常的胃黏膜上皮细胞中，壁细胞的数量应该相对较多，但我们通过 RGS5 基因标记后发现壁细胞的数量偏少，这说明在炎症条件下壁细胞会大量的死亡消失；通常在胃黏膜上皮细胞中不存在成纤维细胞的成分，但由于我们检测的组织属于 *H.pylori* 现症感染或 *H.pylori* 既往感染后，*H.pylori* 损伤胃黏膜后，成纤维细胞被激活进行组织的修复，因此我们可以观察到一定数量的成纤维细胞 (标记为 PDGFRA)，此外我们还检测到某些特定的肠道祖细胞成分，如 LGR5+ stem 细胞 (标记为 KRT7)、潘氏细胞 (标记为 MS4A6A)、MKI67 progenitor 细胞 (标记为 RAMP3)；同时我们还检测到少量的肿瘤细胞 (标记为 CEACAM5)、肠内分泌细胞 (CHGA)、杯状细胞 (标记为 MUC2)。我们可以发现，在 *H.pylori* 刺激下，胃黏膜上皮细胞的组成发生很大的变化，出现了类似肠道隐窝细胞的组成，出现了各种具有分化能力的肠道干细胞、祖细胞。

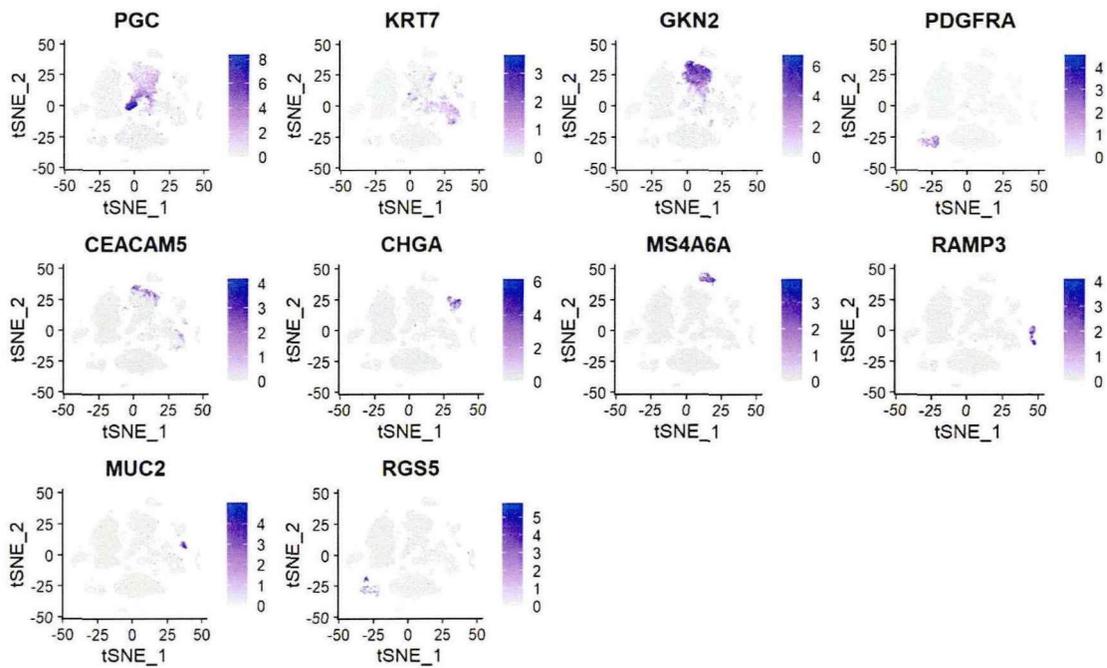


图 10 胃黏膜上皮细胞的特异性 tSNE 图。

注：主细胞（标记为 PGC）、Pit mucous 细胞（标记为 GKN2）、LGR5+ stem 细胞（标记为 KRT7）、成纤维细胞（标记为 PDGFRA）、肿瘤细胞（标记为 CEACAM5）、肠内分泌细胞（CHGA）、潘氏细胞（标记为 MS4A6A）MKI67 progenitor 细胞（标记为 RAMP3）杯状细胞（标记为 MUC2）壁细胞（标记为 RGS5）

3.3.2 胃黏膜上皮细胞类群演化轨迹分析

在上文得到的 14 种细胞类型中，我们选择了 10 种胃黏膜上皮细胞类群对其演化轨迹进行分析，包括 LGR5+ stem 细胞、主细胞、Pit mucous 细胞、成纤维细胞、肿瘤细胞、内分泌细胞、潘氏细胞、MKI67+ progenitor 细胞、杯状细胞以及壁细胞。采用 monocle 反向图形嵌入的方法对选择的上皮细胞类群进行轨迹推断分析。选择在这些上皮细胞中高表达的前 1000 个基因，将细胞沿着拟时间轴进行排列。

通过拟时序分析，可以推断出发育过程中细胞的分化轨迹或细胞类群的演化过程。根据时间值大小我们发现数目较多的成纤维细胞、潘氏细胞、MKI67 progenitor 细胞群落以及数目较少的壁细胞群聚集于时间轴的起始端，其次沿着时间轴分布的是数目分布较多的肠内分泌细胞、LGR5+ stem 细胞以及主细胞，在时间轴的末端则聚集着数目较多的 Pit mucous 细胞以及肿瘤细胞，在时间轴的左侧轨迹中，分布着数目较少的杯状细胞（图 11A、C）。

为了更加直观的展示各个细胞类群的演化轨迹，我们制作了细胞密度沿时间分布图（图 11D）。我们可以更加直观的看到在时间轴起始有四种细胞类群，包括成纤维细胞、潘氏细胞、MKI67+ progenitor 细胞以及壁细胞，时间轴末端细胞密度最多的胃肿瘤细胞以及 Pit mucous 细胞，这与拟时序轴分布一致。

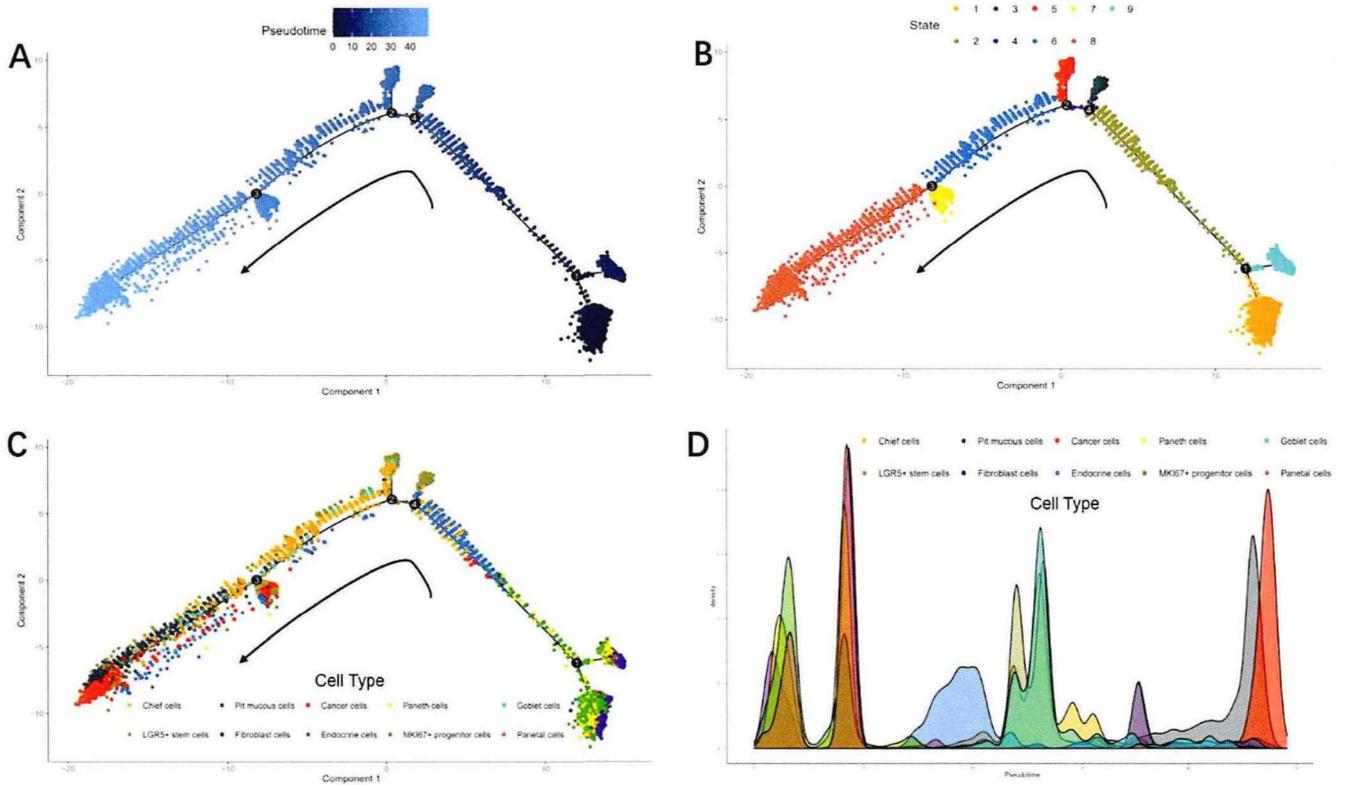


图 11 胃黏膜上皮细胞演化轨迹分析。A.按照伪时间值显示细胞轨迹；B.按照 state 显示细胞轨迹；C.按照细胞类型显示细胞轨迹；D.细胞密度分布图。

3.3.3 胃黏膜上皮细胞类群之间相互作用网络

为了直观的展示上皮细胞类群间的通讯关系，我们制作了网络图（图 12）解析上皮细胞之间复杂的通讯网络，我们使用 CellphoneDB 算法来计算胃黏膜上皮细胞类群之间潜在配体-受体相互作用。通过网络图，我们可以发现 LGR5+ stem 细胞与主细胞数量较多，LGR5+ stem 细胞作为肠道干细胞，与成纤维细胞、Pit mucous 细胞以及潘氏细胞之间的互作强度明显；肠道内分泌细胞虽然细胞数目较少，但其与 Pit mucous 细胞、LGR5+ stem 细胞以及主细胞之间的互作强度较大。

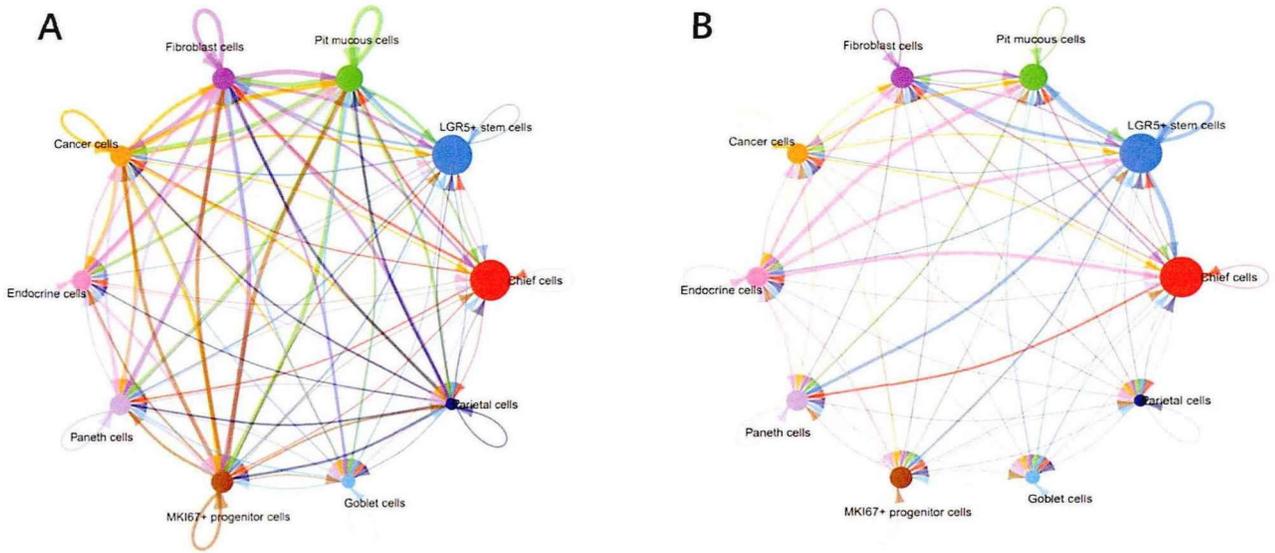


图 12 胃黏膜上皮细胞互作网络图。A.细胞互作数量统计；B.细胞互作强度统计。注：A 图外周各种颜色圆圈的大小表示细胞的数量，圆圈越大，代表细胞数越多。发出箭头的细胞表达配体，箭头指向的细胞表达受体。配体-受体对数越多，线越粗。B 图代表细胞互作的概率/强度值（强度为概率值相加）。

同时，我们构建了单个细胞类群与其他细胞之间的细胞互作数目统计图（图 13）与强度统计图（图 14）。在细胞互作数目方面，我们发现 Pit mucous 细胞与成纤维细胞、肿瘤细胞、肠内分泌细胞、潘氏细胞、MKI67+ progenitor 细胞以及 LGR5+ stem 细胞表现出较多的细胞互作次数；成纤维细胞与 Pit mucous 细胞、壁细胞、MKI67+ progenitor 细胞、潘氏细胞以及肿瘤细胞之间存在较多的细胞互作次数；肿瘤细胞与成纤维细胞、Pit mucous 细胞、MKI67+ progenitor 细胞之间存在较多的细胞互作次数；潘氏细胞与成纤维细胞、Pit mucous 细胞、MKI67+ progenitor 细胞存在较多的互作次数；MKI67+ progenitor 细胞与肿瘤细胞、成纤维细胞、Pit mucous 细胞之间则是存在着较多的细胞互作次数。在细胞强度互作方面，LGR5+ stem 细胞与 Pit mucous 细胞、成纤维细胞、潘氏细胞以及主细胞之间存在较强的关联；肠内分泌细胞与 LGR5+ stem 细胞、Pit mucous 细胞以及成纤维细胞之间存在较多的关联。深入研究细胞配受体之间的关系有利于阐明细胞作用、分化的机制。

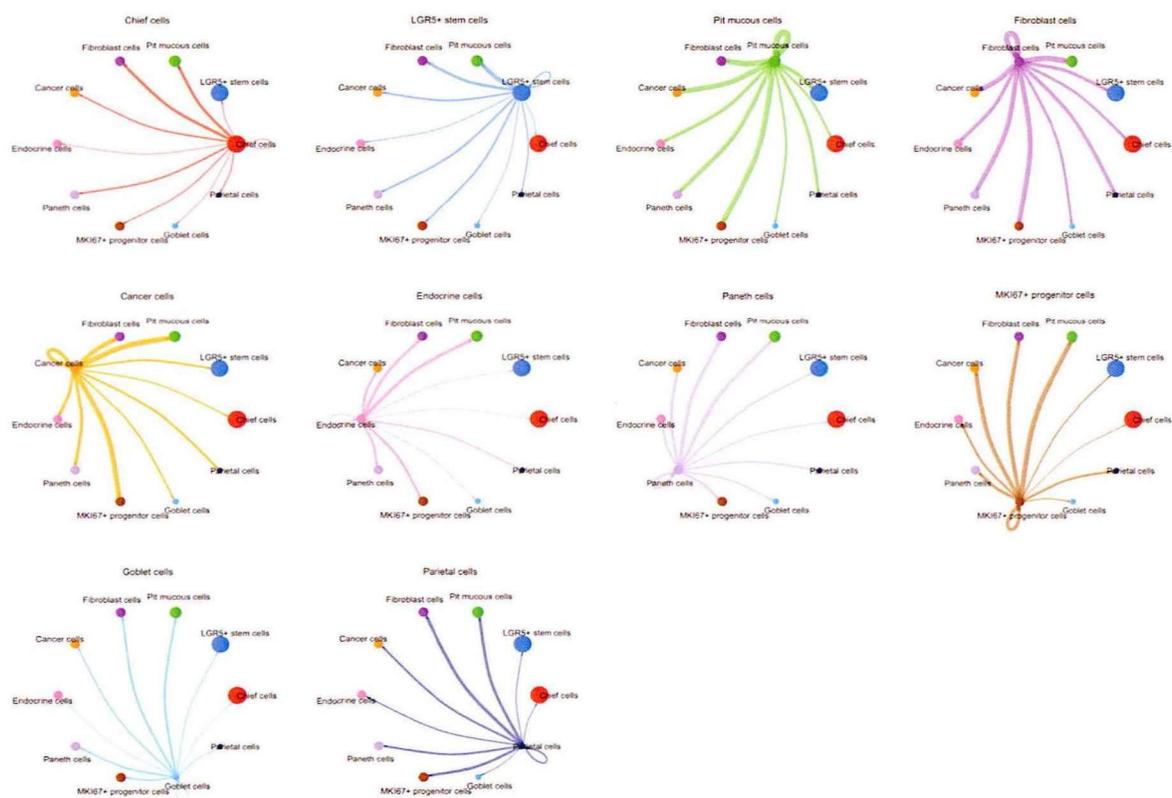


图 13 单个细胞类群与其他上皮细胞类群互作数量统计图

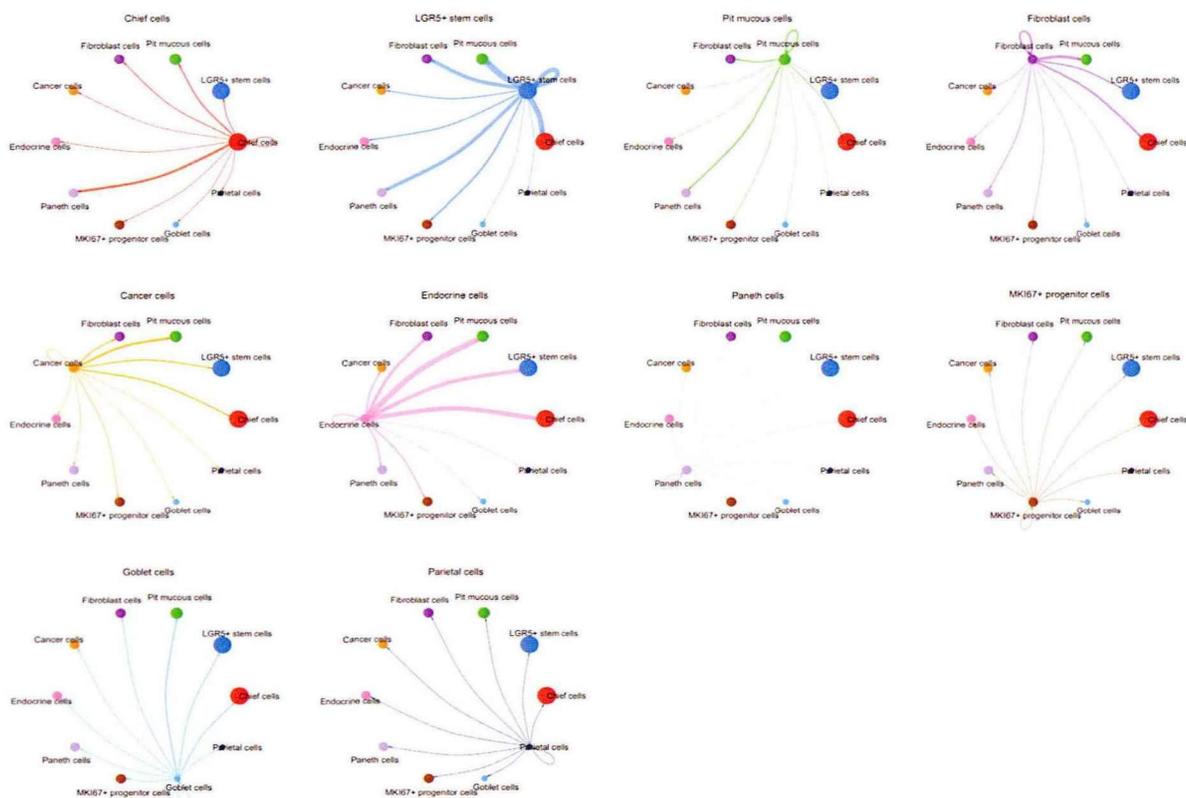


图 14 单个细胞类群与其他上皮细胞类群互作强度统计图

通过上文我们得到 LGR5+ stem 细胞与肠内分泌细胞与其他上皮细胞类群之间具有较强的互作关系，因为我们构建以 LGR5+ stem 细胞与肠内分泌细胞作为发出信号的细胞 (Source)，以主细胞、Pit mucous 细胞、成纤维细胞以及潘氏细胞作为接收信号的细胞 (Target) 在不同信号通路之间的互作关系 (图 15A)，我们发现巨噬细胞迁移抑制因子 (Macrophage migration inhibitory factor, MIF) 通路几乎出现在所有的 Source-Target 细胞互作关系中，然后我们选取了单独的 MIF 信号通路来展示细胞互作的关系，可以看到，LGR5+ stem 细胞、主细胞与潘氏细胞间存在较强的关系 (图 15B)。

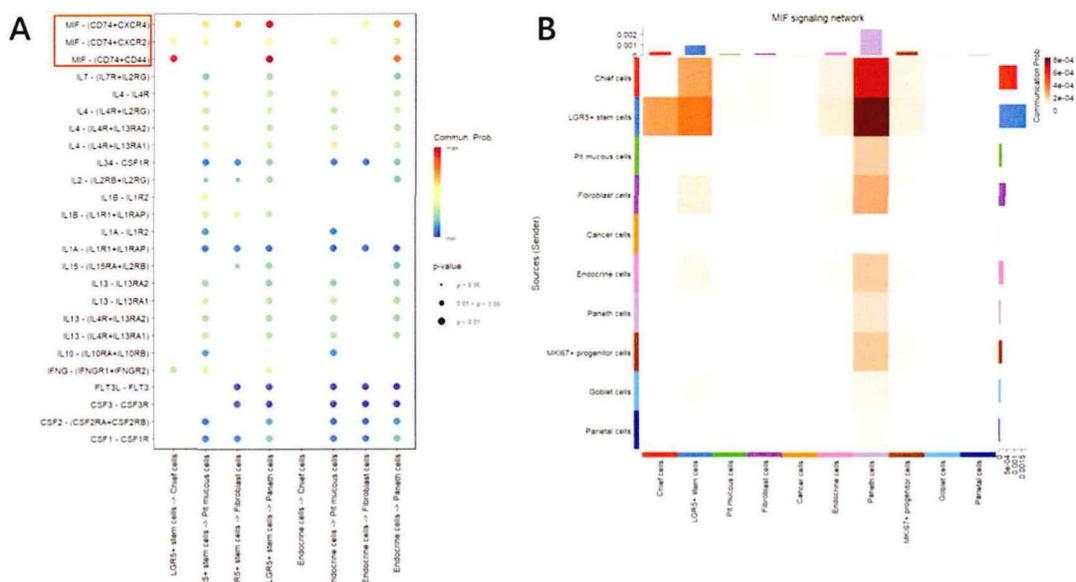


图 15 配体-受体介导的细胞互作可视化。A.配体-受体介导的不同信号通路参与 LGR5+ stem 细胞与肠道内分泌细胞对主细胞、Pit mucous 细胞、成纤维细胞以及潘氏细胞的调控作用情况；B.单个 MIF 信号通路中细胞互作热图。

注：A 图 x 轴表示 LGR5+ stem 细胞与肠道内分泌细胞对主细胞、Pit mucous 细胞、成纤维细胞以及潘氏细胞互作关系，y 轴代表不同信号通路以及配体-受体对，圆圈的大小表示配体-受体相互作用 P 值的显著性，色阶表示相互作用强度；B 图中纵轴是发出信号的细胞，横轴是接收信号的细胞，热图颜色的深浅代表信号的强度。上侧和右侧的柱子是纵轴和横轴强度的累积。

3.4 构建参白颗粒干预胃上皮细胞类群“活性成分-靶点-细胞类群”模型

课题组前期收集了 *H.pylori* 相关性胃癌前病变患者的中医四诊信息，以及胃镜下表现，得到了 *H.pylori* 相关胃癌前病变的中医证候分型^[39-40]，建立了胃镜像与 *H.pylori* 相关胃癌前病变中医证候的直接关系，丰富了 *H.pylori* “热”性致病的病机内涵，阐释了

慢性胃炎（热）—胃癌前病变（热毒）的病机变化，提出慢性胃炎“炎-癌转化”“因热生毒”的核心中医病机^[41]。在确立了核心病机后，创立了中药方剂“参白颗粒”，全方共六味，柴胡、紫苏梗、太子参、薏苡仁、白花蛇舌草、莪术，重用疏肝气理胃气之醋柴胡、紫苏梗为君；太子参，味甘性平，平补气阴；合白花蛇舌草清热解毒；莪术、生薏苡仁行气消积散结，健脾补虚，方简药专，共奏解毒散结消癥之效。我们前期使用参白颗粒 30 例 *H.pylori* 相关性胃癌前病变患者，通过对比参白颗粒治疗前后的病理积分发现，中药干预 12 周后的胃黏膜可见固有层厚度明显增加，腺腔结构趋于正常，异型增生细胞数量、分布密度和分布范围均有明显减少。萎缩、肠化、异型增生病理表现积分治疗后较治疗前下降^[42]。因此在本章节中，我们旨通过网络药理学手段来探索参白颗粒干预 *H.pylori* 相关性胃癌前病变的有效作用靶点。

利用 TCMSP 数据库检索中药复方参白颗粒（柴胡、紫苏梗、太子参、白花蛇舌草、薏苡仁、莪术）6 味药物的化学成分，共筛选活性成分 43 种（其中柴胡 12 种、紫苏梗 13 种、太子参 6 种，白花蛇舌草 5 种、薏苡仁 6 种、莪术 1 种）。将上述得到的活性成分的靶基因与胃黏膜上皮细胞类群的表达基因取交集后，将上述数据导入到 Cytoscape 3.10.1 软件中，构建“活性成分-靶点-细胞类群”模型，结果见图 16。图中共有节点 134 个，481 条边，根据度值（Degree 值）排前 6 位的关键活性成分为槲皮素（MOL000098）（Degree 值：71）、木犀草素（MOL000006）（Degree 值：35）、山奈酚（MOL000422）（Degree 值：21）、豆甾醇（MOL000449）（Degree 值：14）、 β -胡萝卜素（MOL002773）（Degree 值：13）、 β -谷甾醇（MOL000358）（Degree 值：11）。

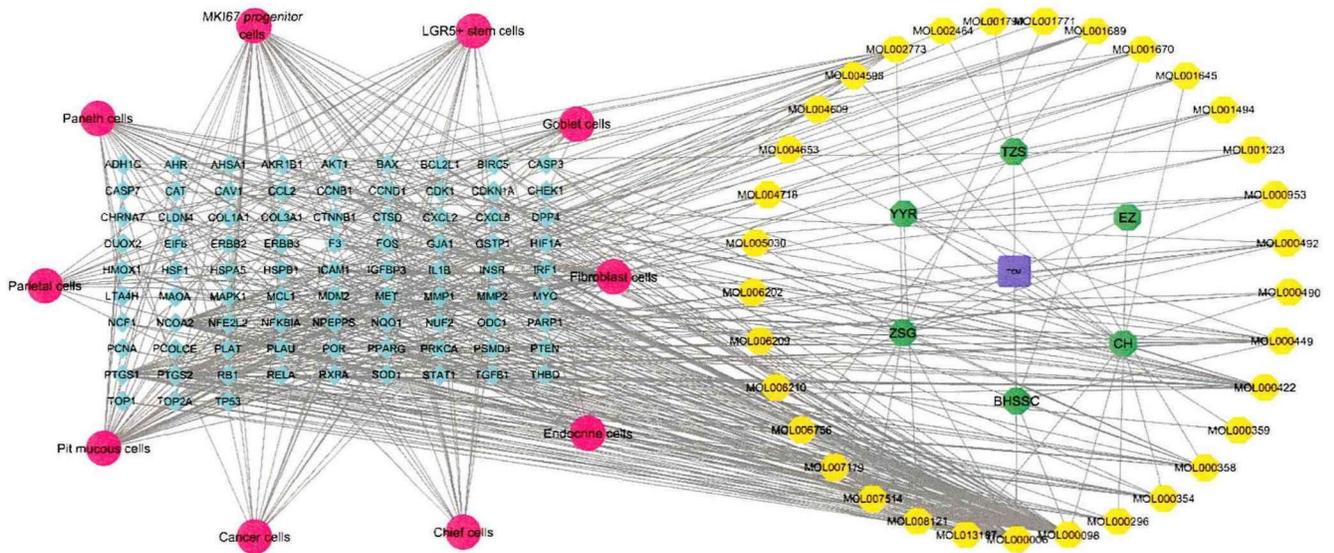


图 16 中药复方参白颗粒干预胃黏膜上皮细胞类群表达基因的“活性成分-靶点-细胞类群”模型

4 讨论

胃癌的发生并不是一蹴而就的，从胃癌前病变进展到胃癌是一个漫长的过程，观察 *H.pylori* 感染下胃癌前病变不同病理时期的组织状态有利于阐明癌变多阶段过程中细胞转化的机制，这对于我们探究癌前病变的关键靶基因具有重要的意义。

在本章节中我们利用单细胞测序技术解析了 *H.pylori* 相关胃黏膜上皮细胞的演化轨迹，揭示了炎症损伤后的胃黏膜上皮细胞增殖修复的过程，鉴定出了较为关键的胃黏膜祖细胞类群的特异性基因。

在选取的单细胞样本组织中，我们根据 Correa 级联所述的“炎-癌转化”过程选取了不同病理时期的样本，通过统计各样本中的细胞数目，可以发现，14 例样本中并不是全部存在着经过鉴定出的 17 种细胞类群，在 IM 组以及 EGC 组中，巨噬细胞几乎不存在，同时在 EGC 这一样本中，LGR5+ stem 细胞的比例达 73.85%，第二位的是肠内分泌细胞，这值得我们关注。大量的文献研究表明，LGR5+ stem 细胞在胃炎患者、肠上皮化生患者以及胃癌患者中的细胞数量增加，并提出表达 LGR5 基因的细胞可能是胃肿瘤的主要细胞来源^[43-44]。在我们的研究中，LGR5+ stem 细胞在 CAG 组、IM 组均具有不低的细胞比例，这表明在慢性炎症（多为 *H.pylori* 感染）持续刺激下，胃体腺体产酸的壁细胞损伤和丢失，导致整个胃体腺体的结构发生了化生性的变化，出现了肠型的化生以及各种肠型的干细胞。在 CAG、IM 以及 EGC 分组中，我们可以发现，干细胞、祖

细胞的比例均较高，但是干细胞、祖细胞分化的轨迹是什么，是分化成胃腺体底部的主细胞还是分化为腺颈部的颈黏液细胞，各类干细胞、祖细胞的分化途径是什么，均不可知，这也是我们研究的初衷，因此我们继续对 *H.pylori* 感染下的样本组织进行重点刻画。

H.pylori 定植于胃黏膜上诱导胃上皮细胞发生促炎反应，从而将多种免疫细胞募集到黏膜下层，导致慢性活动性胃炎的发生，在大多数患者中，*H.pylori* 定植到胃黏膜上数十年是无症状的，胃黏膜长达数十年的炎症状态被认为是导致胃黏膜萎缩的重要驱动力，在根除 *H.pylori* 后，胃黏膜中仍存在着导致癌变的因子，基于此，我们将胃黏膜的状态分为现症感染及既往感染两种，对其胃黏膜上皮细胞分化进行细致的刻画。通过 *H.pylori* 不同状态下两组细胞比例分布来看，*H.pylori* 现症感染时，炎症水平较高，此时腺体细胞形态尚存，因此 Pit mucous 细胞要多于既往感染组，而在 *H.pylori* 现症感染时，*H.pylori* 的致病因子可以黏附在表达 LGR5 基因的细胞上，导致其增殖和激活^[45]，这可以解释在我们的分组中，LGR5+ stem 细胞的数量在 *H.pylori* 现症感染组中明显高于既往感染组。在清除 *H.pylori* 后，即变成 *H.pylori* 既往感染状态，在经过 *H.pylori* 各种致病因子的作用后，组成胃腺体的各种上皮细胞被破坏、消失，因此在 *H.pylori* 既往感染组中，Pit mucous 的细胞数量明显变少，随着 LGR5+ stem 细胞的不断分化，主细胞的数量不断增加，正如目前多数研究提出，在胃黏膜损伤后，原本维持稳态的 LGR5+ stem 细胞分化再生成主细胞^[45-46]，而这些由 LGR5+ stem 细胞分化而来的主细胞则是机体中可能的致癌突变的关键来源。

为了阐明 LGR5+ stem 细胞的来源及分化途径，我们选择了胃黏膜上皮细胞类群构建演化轨迹图，我们发现在拟时序轴起始端为成纤维细胞、潘氏细胞、MKI67+ progenitor 细胞以及壁细胞，其中潘氏细胞与 LGR5+ stem 细胞之间有密切的关联。文献研究表明，表达 LGR5 的肠道干细胞位于肠隐窝底部潘氏细胞之间，潘氏细胞在维持肠腺体稳定方面发挥着重要的作用，可以通过多种机制维持 LGR5+ stem 细胞的稳态，潘氏细胞表达的 Wnt、EGF、TNF- α 以及 Notch 配体 DII4 等维持着 LGR5+ stem 细胞的生态位^[47]，在胃黏膜受到损伤后，腺体内潘氏细胞被破坏、消失，逐渐被肠内分泌细胞取代，这些肠内分泌细胞在物理方位上占据了腺体中潘氏细胞的位置，它们可作为 Notch 信号的替代来源^[48]，这对维持 LGR5+ stem 细胞生态位至关重要。正如文献所述，我们的研究显示

在潘氏细胞消失后，肠内分泌细胞取代其生态位，继而 LGR5+ stem 细胞数量增加。而在拟时间轴起始段的壁细胞、MKI67+ progenitor 细胞在组织损伤后消失、死亡，这与 Zhang Min^[49]等的研究一致，在正常的胃黏膜组织中，壁细胞作为泌酸细胞是大量存在的，但在 *H.pylori* 感染后炎症状态下，胃黏膜壁细胞受损会大量的死亡、消失。

我们在拟时间轴起始阶段还发现了成纤维细胞类群的存在，成纤维细胞通常是静止的，但是由于 *H.pylori* 在胃腺体深处定植，触发 R-spondin (Rspo) 信号^[50]，而 Rspo 通过结合 LGR5+ stem 细胞刺激产生的 Wnt 信号驱动肠道干细胞的增殖，LGR5+ stem 细胞的缺失或成纤维细胞中 Rspo 基因的敲除导致了胃腺中 *H.pylori* 的过度定植，因此，有学者认为，Rspo3-LGR5 轴能够同时调控抗菌防御机制和促进黏膜的再生^[51]，至此，胃黏膜上皮细胞启动了黏膜损伤修复机制。在拟时间轴的后半段，出现的是主细胞、Pit mucous 细胞以及肿瘤细胞，这也正是阐明了各类胃黏膜上皮细胞类群分化次序。

同时我们构建了细胞互作网络图来直观的展示各细胞类群之间的通讯关系，通过单个细胞类群与其他细胞类群之间的互作关系图，可以很清晰的看出在细胞强度互作方面，LGR5+ stem 细胞、肠内分泌细胞与 Pit mucous 细胞、成纤维细胞、潘氏细胞以及主细胞之间存在较强的关联，这与前文我们分析的 LGR5+ stem 细胞分化轨迹一致，然后我们构建 LGR5+ stem 细胞、肠内分泌细胞与主细胞、Pit mucous 细胞、成纤维细胞、潘氏细胞之间的相互作用关系网络，发现 MIF (CD74-CXCR4)、MIF (CD74-CXCR2) 以及 MIF (CD74-CD44) 配体-受体对在上述细胞类群互作关系之间普遍存在，且相互作用程度最强。MIF 能够参与多条途径调控肿瘤的发生，有研究指出，在 *H.pylori* 诱导的胃炎、肠上皮化生和胃癌的上皮和血清中 MIF 的表达逐渐升高，提出 MIF 参与胃癌的发生，可能是早期发现胃癌的重要生物标志物^[53]。在 *H.pylori* 的主要毒力因子 CagA 蛋白诱导胃上皮产生促炎因子，包括 MIF，同时 CD74 在胃上皮细胞表面高度表达，CD74 可作为 MIF 的受体与 MIF 进行结合，MIF 与 CD74 结合后可增加不同上皮细胞类型的增殖，驱动细胞走向致癌表型，同时可以降低 p53 磷酸化水平并上调 Bcl-2 表达，降低了细胞凋亡的水平^[53]，从而调控肿瘤的发生，这也提示了我们 MIF/CD74 信号轴是否可作为防止胃黏膜上皮细胞恶性增殖的作用靶点。

关于治疗 *H.pylori* 相关的胃癌前病变，临床上目前尚无公认的有效的西药。中药以

其多靶点、副作用小等优势介入到 *H.pylori* 相关癌前病变的防治工作中，中医治疗在于其辨病辨证论治的核心，因此得以发挥一定的优势。我们可以发现关键活性成分为槲皮素、木犀草素、山奈酚、豆甾醇、 β -胡萝卜素、 β -谷甾醇。槲皮素是柴胡、白花蛇舌草中共有的活性成分，属于黄酮醇家族，是一种强大的抗氧化剂，先前的研究表明，槲皮素具有抗炎、抗菌、抗病毒和免疫保护活性^[54]，不仅可以加强机体的抗氧化应激水平，还可以抑制促炎因子的释放；此外，有文献研究结果显示，槲皮素可以减轻 *H.pylori* 带来的胃黏膜组织炎症、降低细胞凋亡带来的损伤^[55]。

木犀草素属于黄酮类化合物，目前研究证实，木犀草素能有效调节糖脂代谢、具有抗炎抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用。研究表明，木犀草素的抗炎作用可能是通过降低多种促炎细胞因子、趋化因子的表达发挥作用，包括降低白介素 (IL) -1 β 、IL-2、IL-6、IL-8、IL-33、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等因子水平^[56]，而在 *H.pylori* 相关胃癌前病变组织中，根据单细胞 RNA-seq 结果，我们可以发现在 *H.pylori* 相关的胃癌前病变组织中，多种促炎因子的水平有所上升，木犀草素可以有效的降低促炎因子的水平。

山奈酚是中药柴胡中的有效成分，属于类黄酮属，有研究发现，山奈酚可以降低人胃腺癌细胞 (AGS 细胞) 中促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-8) 的表达和，此外，山奈酚还可以抑制 CagA 和 VacA 向 AGS 细胞的易位^[57]。豆甾醇是白花蛇舌草、柴胡、薏苡仁中共有的活性成分，近年来关于豆甾醇、 β -谷甾醇抗 *H.pylori* 的研究较少，两者均属于黄酮类化合物，具有较强的抗氧化和自由基清除活性^[58]。

β -胡萝卜素是中药紫苏梗中的有效成分，有研究显示， β -胡萝卜素可以通过增加过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (Peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ) 介导的过氧化氢酶表达同时降低 *H.pylori* 感染的胃上皮细胞的活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 水平，抑制细胞侵袭和 MAPK 介导的 MMP-10 表达^[59]。

不可否认，本研究存在一定的局限性，需要在后续的研究中弥补不足。首先由于分析的样本中加入了来自 GEO 数据库中下载的数据与本中心临床样本整合，虽然在多样本整合过程中使用了 Harmony 的方法进行样本的去批次，但是不可否认的是，在数据分析过程中，数据清洗的结果并不是十分理想，这提示我们后续的研究尽量采用同一批次的样本进行分析。其次，虽然我们在本次研究中对 *H.pylori* 感染的上皮进行了细致地分

析, 将 *H.pylori* 既往感染与 *H.pylori* 现症感染状态区分开, 但总样本共计 10 例, 样本量相对较少, 虽然在炎症状态或癌前病变状态下壁细胞等特征性的上皮细胞类群会消失, 但本次研究中, 对于典型的上皮细胞捕捉的数目有限。因此, 本研究结果仍然需要基于更大的样本量进行分析, 以验证上述结论。此外, 我们在本研究中提出了一些重要的发现, 对 LGR5+ stem 细胞及其分化后的细胞进行了互作分析并提出了一些重要的靶点同时加入中药复方的靶点进行验证, 但是这些观点仍需要更多湿实验的验证以支持并阐明上皮细胞在 *H.pylori* 的诱导下如何调控细胞类群的细胞比例来控制“炎-癌转化”中关键的病理时期, 从而找到可以阻断胃癌发生的重要靶点。

总之, 本研究首次构建了 *H.pylori* 不同状态下胃黏膜上皮细胞类群变化的单细胞转录组图谱, 填补了 *H.pylori* 感染诱导的胃黏膜上皮细胞类群变化研究领域的空白。通过构建 *H.pylori* 感染后的胃黏膜上皮细胞类群分化轨迹图谱, 我们表征了潘氏细胞、成纤维细胞、LGR5+ stem 细胞、肠内分泌细胞、主细胞以及 Pit mucous 细胞在 *H.pylori* 相关胃癌前病变组织中进展的动态变化。我们确定了以 LGR5+ stem 为主的细胞在胃癌前病变组织中恶性增殖的地位。而中药复方参白颗粒通过多靶点、多通路能够干预 *H.pylori* 相关胃癌前病变, 探究中药复方参白颗粒干预 LGR5+ stem 细胞异常增殖分化的作用靶点具有重要的意义。因此我们将继续通过细胞实验阐明参白颗粒干预 *H.pylori* 感染胃上皮细胞的作用机制来明确参白颗粒关键作用靶点, 为中医药防治 *H.pylori* 相关胃炎提供思路与对策。

第三部分 参白颗粒干预 *H.pylori* 急、慢性感染过程中胃黏膜细胞增殖、自噬以及凋亡的机制

在前述章节中已经阐明在 *H.pylori* 感染状态下，胃黏膜上皮细胞类型发生了变化，正如前述章节结果所示，*H.pylori* 所用于人胃上皮细胞后主要的 LGR5+ stem 细胞多是通过 MIF 信号通路调控细胞分化的轨迹，通过查阅大量的文献后发现，细胞自噬和相关蛋白被证明可以调节肠道干细胞损伤和炎症期间的上皮细胞凋亡和坏死性凋亡^[60-63]，在炎症刺激下导致的细胞死亡过程中具有保护作用。MIF 诱导的 IL-1 β 和 TNF- α 已经被证明参与了细胞自噬的诱导过程^[64]。文献研究也确实证实 *H.pylori* 感染可影响宿主细胞的自噬途径，但细胞自噬这一途径对于 *H.pylori* 感染后的胃黏膜细胞是保护作用还是破坏屏障，目前此方面的机制了解较少。有研究认为 *H.pylori* 急性感染是启动细胞自噬而 *H.pylori* 慢性感染则是抑制细胞自噬的发生，也即是说 *H.pylori* 诱导的细胞自噬这在急性感染期和慢性感染中是不同的。

H.pylori 现症感染与既往感染属于 *H.pylori* 感染的不同状态，正如第一章中结论所述，在内镜下观察到的 *H.pylori* 现症感染与既往感染的表现是不同的，但究竟细胞自噬在这两种状态下的作用机制如何尚不可知，因此在本章节中，通过建立 *H.pylori* 感染 GES-1 的共培养模型，利用 *H.pylori* 急性感染（短期共培养）和慢性感染（长期持续共培养）两种模型来探究在此过程中 GES-1 细胞增殖、自噬、侵袭、迁移等，同时加入了课题组临床验证的有效方剂参白颗粒，并探究参白颗粒在急性感染与慢性感染过程中对 *H.pylori* 诱导的细胞异常增殖、自噬以及凋亡等过程的影响，为后续中医药防治 *H.pylori* 相关的胃癌前病变的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器和软件

表 17 主要实验仪器

实验仪器名称	设备型号	生产厂家	产地
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州集团安泰空气技术有限公司	中国
CO ₂ 恒温培养箱	MCO-15AC	SANYO	日本
-80℃超低温冰箱	FORMA 700 SERIES	Thermo Fisher	美国
普通 4℃冰箱	SC-240	海尔	中国
普通 20℃冰箱	SC-240	海尔	中国
倒置相差显微镜	IX-51	OLYMPUS	日本
低速离心机	5702R	Eppendorf	德国
酶标仪	MULTISKAN MK3	Thermo Fisher	美国
透射电子显微镜	Tecnai G2 Spirit	FEI, Hillsboro	美国
各规格移液器及枪头	0.5-10μL、2-20μL、 20-200μL、200-1000μL 等	Eppendorf	德国
台式高速冷冻离心机	LEGEND MICRO 21R	Thermo Fisher	美国
分光光度计	Nanodrop lite	Thermo Fisher	美国
荧光定量 PCR 仪	StepOne Software	Applied biosystems	美国
电泳仪	EPS 300	BIO-RAD	美国
凝胶成像仪	2500	BIO-RAD	美国
微量加样器	-	Gilson 公司	法国
电热恒温水浴槽	HWS-24	上海一恒 恒温设备厂	中国
PVDF 膜 (0.22μm)	ISEQ00010	Millipore	美国
3MM 滤纸	3030861	Whatman	英国
脱色摇床	TS-100	海门其林贝尔仪器制造公司	中国
电泳仪	BG-subMIDI	北京百晶生物技术有限公司	中国
低温离心机	3-30K	Sigma	德国
SDS-PAGE 电泳系统	分钟 i-PROTEAN® Tetra Cell with 分钟 i Trans-Blot® Module And PowerPac™ Universal Power Supply	BIO-RAD	美国
凝胶成像系统	GelDoc-It310	UVP	美国
化学发光成像系统	ChemiScope6100	CLINX 勤翔	中国
流式细胞仪	CytoFLEX	beckmancoulter	美国

表 18 实验所用软件

软件	版本号	研发公司	国家
SPSS	29.0	IBM	美国
GraphPad Prism	9.5	GraphPad Software Inc	美国
Adobe iIllustrator	19.0	Adobe	美国
ImageJ	1.54g	National Institutes of Health	美国

1.2 主要实验试剂

表 19 实验主要试剂

试剂名称	货号/纯度	生产厂家	产地
DMEM 高糖培养基	12633-012	Gibco	美国
胎牛血清	10091-148	Gibco	美国
青/链霉素混合液	15070-063	Gibco	美国
胰蛋白酶	15050-065	Gibco	美国
CCK8	C0037	碧云天	中国
细胞培养皿	-	Corning	美国
TRIZOL	10296028	Invitrogen	美国
无水乙醇	分析纯	国药	中国
异丙醇	分析纯	国药	中国
LC3-II 抗体	bs-8878R	Bioss	中国
SQSTM1/P62 抗体	bs-2951R	Bioss	中国
Beclin 1 抗体	bs-1353R	Bioss	中国
Actin 抗体	AF7018	Affinity	澳大利亚
UltraPure Agarose	16500100	ABI-Invitrogen	美国
SuperScript III RT 逆转录 kit	11752050	ABI-Invitrogen	美国
Sybr qpcr mix	4472920	ABI-Invitrogen	美国
蛋白分子量 marker	BP06193S	博奥龙	中国
DEPC 水	MD911875	MDL	中国
蛋白提取液	MDL91201	MDL	中国
蛋白酶抑制剂	MD912893	MDL	中国
BCA 蛋白浓度测定 kit	MD913053	MDL	中国

表 19 实验主要试剂（续表）

试剂名称	货号/纯度	生产厂家	产地
SDS-PAGE 预制胶套装 kit	MD911919	MDL	中国
蛋白二抗	MD912565	MDL	中国
蛋白裂解液	P0013	碧云天	中国
化学发光底物	A38554	Thermo Fisher	美国
人 IL-1 β ELISA 试剂盒	FU-R2675	Biofine	中国
人 IL-6 ELISA 试剂盒	FU-R2691	Biofine	中国
人 IL-8 ELISA 试剂盒	FU-R2693	Biofine	中国
人 IL-12 ELISA 试剂盒	FU-R2698	Biofine	中国
人 TNF- α ELISA 试剂盒	FU-R3450	Biofine	中国
Fetal Bovine Serum	10091-148	Gibco	美国
Penicillin-Streptomycin	15070-063	Gibco	美国
0.25% Trypsin (1X)	15050-065	Gibco	美国
lipofectamine 2000	11668-019	ABI-invitrogen	美国
OPTI-MEM	31985	Gibco	美国
细胞凋亡检测试剂盒	KGA1026	南京凯基生物	中国

1.3 实验细胞、细菌、动物

细胞：人胃黏膜上皮细胞 GES-1，购买自北纳生物技术有限公司（中国）；

细菌：*H.pylori* ATCC43504 购买北纳生物技术有限公司（中国）；

动物：SPF 级雄性 Wistar 大鼠 12 只，体重在 80-100g，购买自北京维通利华实验动物科技有限公司，许可证号：SCXK（京）2021-0006。实验大鼠在温度 23-25°C、湿度在 65%-85%条件下饲养。

1.4 中药复方参白颗粒的制备

参白颗粒由柴胡 10g、紫苏梗 10g、太子参 10g、白花蛇舌草 30g、薏苡仁 30g、莪术 10g 共 6 味中药组成。根据《中华人民共和国药典》（2020 版）以及国家中医药管理局发布的《医疗机构中药煎药室管理规范》中的中药颗粒剂制备方法进行制备。

2 实验方法

2.1 *H.pylori* 培养

1) 自-80°C冰箱中取出冻存的 *H.pylori* 菌液，在 37°C水浴锅中快速融化，融化好后放置到生物安全柜中进行后续操作；

2) 取出 10 μ L 的菌液于哥伦比亚血平板上划线接种, 然后将血平板放置于 37 $^{\circ}$ C, 微需氧条件的培养箱 (10%CO₂, 5%O₂, 85%N₂ 以及 90%以上的湿度) 中培养 3-5 天待长出单菌落;

3) 挑取血平板上的 *H.pylori* 单菌落, 接种于加入了 20mL 脑心浸液培养基的无菌锥形瓶中;

4) 然后将无菌锥形瓶培养在 37 $^{\circ}$ C, 微需氧条件的培养箱 (10% CO₂, 5% O₂, 85%N₂ 以及 90%以上的湿度) 中 3-5 天, 观察培养基变浑浊, 代表 *H.pylori* 生长茂盛, 处于稳定期;

5) 取 *H.pylori* 菌液, 进行离心 3min, 12000rpm, 得到上清液和细菌沉淀, 收集 *H.pylori* 细菌沉淀用于后续于 GES-1 细胞共培养。

2.2 细胞培养

1) 将冻存在-80 $^{\circ}$ C冰箱中 GES-1 细胞取出后立即置于 37 $^{\circ}$ C水浴锅中解冻细胞, 轻摇冻存管使冻存液溶解;

2) 将解冻好的细胞在室温条件下离心 5min, 1000rpm, 然后弃掉上清液, 加入含 10%胎牛血清的完全培养基将离心管中的细胞吹散, 然后重悬细胞沉淀;

3) 将 GES-1 细胞接种于高糖型 DMEM 培养基中 (含 10%胎牛血清以及 1%青霉素/链霉素双抗), 然后放入 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 培养箱中进行培养, 取对数生长期的细胞进行后续实验;

4) 取可以用于进行实验的 GES-1 细胞, 使用 PBS 清洗细胞 2 次后, 每瓶细胞中加入胰酶适当消化细胞, 然后再加入完全培养基终止消化;

5) 将上述混合细胞液转入到合适的离心管中, 在室温下进行离心 3min, 1000rpm;

6) 弃去上清液, 然后使用新培养基重悬细胞沉淀后用于后续的实验或进行细胞传代培养。

2.3 建立 *H.pylori* 急性/慢性感染 GES-1 细胞模型

2.3.1 *H.pylori* 急性感染 GES-1 细胞模型

1) 将处于对数生长期的 *H.pylori* 菌液在室温条件下离心 3min, 12000rpm, 然后弃去上清液, 用完全培养基重悬细菌沉淀;

2) 待到 GES-1 细胞贴壁密度达到 80%时, 使用不同的处理因素对细胞进行处理:

①空白对照组: 弃去原来 6 孔板中的 2mL 培养基, 更换新的 2mL 培养; ②*H.pylori* 培养基组: 弃去原来 6 孔板中的 2mL 培养基, 加入 1mL 新培养基和 1mL 培养 *H.pylori* 的培养基; ③*H.pylori* 组: 弃去原来 6 孔板中的 2mL 培养基, 用 2mL 新培养基重悬第 1) 步中收集的 *H.pylori* 细菌沉淀, 按照细菌感染复数 (multiplicity of infection, MOI=细菌数: 细胞数) =100: 1 的比例加入; ④*H.pylori*+正常血清组: 与③组加入的培养条件一致培养 24h 之后, 再用正常血清培养细胞 24h; ⑤*H.pylori*+含药血清组: 与③组加入的培养条件一致培养 24h 之后, 再用含药血清培养细胞 24h;

3) 在正置显微镜下观察第二个 24h 共培养状态下细胞 6h、12h、24h 的形态学变化, 并进行拍照留存。

2.3.2 *H.pylori* 慢性感染 GES-1 细胞模型

1) 在慢性共培养过程中, 前两步与急性共培养过程一致;

2) 为了保证细菌能够长期感染细胞, 因此每隔日一次向培养瓶中种菌一次, 使用此诱导方法持续 1 个月。

2.4 中药复方参白颗粒含药血清的制备

将上述购买的 12 只 Wistar 大鼠分为参白颗粒组和正常对照组, 每组 6 只, 首先进行适应性喂养 5 天;

1) 参白颗粒药物的配置及药物干预: 按照成人体重 70kg 计算, 每日服用参白颗粒约 20g, 按照大鼠灌胃剂量是成人剂量的 6.3 倍计算, 大鼠每日灌胃剂量为 1.8g/100g。实验当日用 2 袋参白颗粒 (参白颗粒 10g/袋, 2 袋为成人 1 日的剂量) 溶解于 100mL SPF 级动物饮用水中, 配置成浓度为 2g/L 的药液, 大鼠每日灌胃量为 0.9mL/100g; 正常对照组使用同等体积量的蒸馏水进行灌胃, 灌胃时间为每日一次, 连续 6 天;

2) 第 7 天末次给药 2 小时后, 使用 2%水合氯醛腹腔注射麻醉两组大鼠, 于腹部皮毛处喷洒 75%乙醇进行消毒, 然后剪开腹腔, 剥离腹主动脉后采血, 采血后室温静置 30min, 然后平稳转移到 4°C冰箱中静置 2 小时, 室温下 3000rpm 离心 10min, 移取上清液, 对上清液进行除菌及灭活后, 将血清进行分装封存, 置于-80°C冰箱中备用, 完成含药血清的制备工作。

2.5 透射电镜观察细胞急性/慢性感染组细胞超微结构的变化

- 1) 在上述细菌与细胞共培养模型中培养一定时间后, 收集急性期以及慢性期的细胞;
- 2) 使用 PBS 洗涤后细胞后, 将 200 μ L 2%戊二醛溶液加入到离心后的细胞团块中过夜, PBS 再次洗涤, 然后使用锇酸 4 $^{\circ}$ C 固定 2 小时后, 使用不同梯度的酒精进行脱水处理;
- 3) 使用超薄切片机对标本进行超薄切片处理, 处理过的切片使用 3%醋酸铀-枸橼酸铅霜染色;
- 4) 切片着色后使用透射电镜观察细胞形态。

2.6 CCK8 法检测细胞增殖活性

- 1) 取处于对数生长期, 生长状态良好的 GES-1 细胞, 以 1.0×10^4 /孔的细胞密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L 细胞悬液, 同时设置空白组, 在周围孔中加入 100 μ L 无菌的 PBS, 放置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中过夜;
- 2) 次日每孔加入 10 μ L CCK8, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 1h;
- 3) 在全自动酶标仪上测定每孔的吸光度, 计算每组细胞的增值率。

2.7 ELISA 检测

- 1) 样本制备: 取急性感染共培养组在第二个 24h 后得到的细胞, 在室温条件下离心 10 分钟, 3000rpm 后, 取上清液进行检测;
- 2) 按照试剂盒中相应的操作步骤进行操作, 具体操作如下:
 - ①从 4 $^{\circ}$ C 的冰箱中取出保存的试剂盒, 在室温下平衡 20min, 取出所需的板条;
 - ②设置标准品孔和样本孔, 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μ L;
 - ③待测样本孔先加待测样本 10 μ L, 再加入样本稀释液 40 μ L;
 - ④随后标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的检测抗体 100 μ L, 用封板膜封住反应孔, 37 $^{\circ}$ C 水浴锅温育 60min;
 - ⑤弃去液体, 吸水纸上拍干, 每孔加满洗涤液, 静置 1min, 甩去洗涤液, 吸水纸上排干, 如此重复洗板 5 次;
 - ⑥每孔加入底物 A、B 各 50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15min;

⑦每孔加入终止液 50 μ L, 15min 内, 再 450nm 波长处测定各孔的 OD 值。

2.8 Real time Quantitative PCR (qPCR) 检测

1) 引物序列

表 20 引物设计合成

Target Name		Primer
Actin	F	TCCTCCTGAGCGCAAGTACTCC
	R	CATACTCCTGCTTGCTGATCCAC
P62	F	CCCACGGCAGAATCAGCTT
	R	CCTCCGTGCTCCACATCG
LC3 II	F	CACAGCATGGTGAGTGTGTC
	R	TCAGAAGCCGAAGGTTTCCT
BeClin-1	F	AACCTCAGCCGAAGACTGAA
	R	CAGTGACGTTGAGCTGAGTG

2) 样本总 RNA 提取(Trizol 法): 收集细胞至 1.5mlEP 管中, 加入适量的 1mL Trizol 裂解细胞; 向 1.5ml EP 管中加入 500 μ L 氯仿振荡混匀后, 静置 5min; 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10min, 12000rpm, 小心吸取上清液于新的 1.5mlEP 管中; 向分离出的上清液中加入 700 μ L 异丙醇, 进行充分混匀; 在 4 $^{\circ}$ C 下离心 10min, 12000rpm, 小心弃去上清液; 用 75%乙醇洗涤沉淀一次, 在室温下晾干; 用 50 μ L 的 DEPC 水溶解 RNA 沉淀; 然后进行琼脂糖凝胶电泳检测;

3) 总 RNA 质量检测: 使用核酸测定仪测定 RNA 浓度和纯度, 测量前先用溶解 RNA 的 DEPC 水调零: ①RNA 浓度测定: 在 260nm 处读值为 1 表示 40ngRNA/ μ L, 样本 RNA 浓度计算公式为: $A_{260} \times 40\text{ng}/\mu\text{L}$; ②RNA 纯度测定: RNA 溶液的 A_{260}/A_{280} 的比值是一种 RNA 纯度检测方法, 比值范围 1.8-2.1。

4) 逆转录合成 cDNA: 逆转录使用 invitrogen 的逆转录试剂盒 superscript III。

①反应体系 1 建立:

表 21 反应体系 1

试剂	加样量 (μ L)
RNA	200ng (10 μ L)
Oligo-dT	1
Random	1

②进行混匀, 离心。65 $^{\circ}$ C, 5min, 结束后置于冰上;

③反应体系 2 建立:

表 22 反应体系 2

试剂	加样量 (μL)
反应体系 1	12
dNTP (10μM)	1
0.1M DTT	2
5X Buffer	4
RT 酶	1

④混匀, 离心。置于 42°C, 水浴 60min;

⑤取出后置于 85°C, 反应 10min, 灭活逆转录酶;

⑥反应结束后将产物置于-20°C中待用。

5) 实时荧光定量检测:

①Real time PCR 反应体系建立:

表 23 反应体系

试剂	加样量 (μL)
cDNA	2
PCR mix	10
primer F	1
primer R	1
ddH ₂ O	6

②将上述体系混匀后, 瞬离一下, 置于荧光定量 PCR 仪器, 按照以下条件反应:

表 24 PCR 反应条件

步骤	温度 (°C)	时间	循环数
预变性	95	5min	1
变性	95	10 秒	
退火	58	20 秒	40
延伸	72	20 秒	
	95	15 秒	
溶解曲线	60	60 秒	1
	95	15 秒	

6) 样品相对定量结果分析: 相对表达量计算公示:

$$RQ = 2^{-(\Delta Ct_q - \Delta Ct_{cb})}$$

ΔCt_q = 待测组目的基因平均Ct值 - 待测组内参基因平均Ct值

ΔCt_{cb} = 对照组目的基因平均Ct值 - 对照组内参基因平均Ct值

2.9 细胞划痕实验

1) marker 笔在 6 孔板背后, 用直尺比着, 均匀的划横线, 大约每隔 0.5~1cm 一道, 横穿过孔, 每孔至少穿过 3 条线;

2) 细胞处理所需时间后, 胰酶分别消化收集细胞;

3) 以 1×10^6 个/孔接种于细胞培养 6 孔板, 37°C 、5% CO_2 饱和湿度条件培养过夜;

4) 待细胞密度达到 90% 以上, 铺满 6 孔板底部, 用枪头比着直尺, 尽量垂至于背后的横线划痕, 枪头要垂直, 不要倾斜;

5) 使用 PBS 润洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养基, 同时拍取 0h 照片;

6) 放入 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养, 在 24h 拍照。

2.10 Transwell 侵袭实验

1) 取处理好的 GES-1 细胞, 加入 3ml PBS 清洗细胞, 0.25% 胰酶分别消化收集, 1000rpm, 5min 离心, 去上清, PBS 润洗两次, 清洗掉残余血清。

2) 无血清 1640 培养基重悬细胞, 细胞计数板计数, 无血清 1640 培养基稀释细胞浓度至 $2 \times 10^5/\text{ml}$, 备用。

3) 将 Matrigel 在 4°C 提前一天融化, transwell 小室、24 孔培养板和枪头在 -20°C 过夜预冷;

4) 用无血清培养基稀释 Matrigel 至终浓度 1mg/ml, 冰上操作;

5) 在 24 孔板中加入 4°C 预冷 800 μl 10% FBS1640 培养基(含双抗), 并放入 transwell 小室, 在 transwell 小室上室底部中央垂直加入 100 μl 终浓度为 1mg/ml 的 Matrigel, 37°C 温育 5h 使其干成胶状, 待 Matrigel 干成胶状后在 transwell 上室分别接入 200 μl 各组细胞悬液, 37°C 、5% CO_2 培养箱培养 24h;

6) 取出 transwell, 用 PBS 小心清洗小室一遍, 用 70% 冰乙醇溶液固定细胞 1h;

7) 用 0.5% 结晶紫染液染色, 室温中放置 20min, PBS 清洗一下, 用干净的棉球将上室一侧的未迁移的细胞擦干净, 显微镜下观察拍照。

2.11 AnnexinV-APC/7-AAD 双染色法检测细胞凋亡

1) 取处于对数生长期, 生长状态良好的 GES-1 细胞, 以每孔 5×10^5 个接种于细胞培养 6 孔板, 在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养过夜;

2) 按照如下分组对细胞进行处理, 每组三个重复:

①对照组 (Control);

②*H.pylori* 组 (*H.pylori*)

③*H.pylori*+ 30%正常血清组 (*H.pylori* + 30% Normal serum)

④*H.pylori*+ 30%参白颗粒含药血清组 (*H.pylori* + 30% Drug serum)

处理时间: 48h。

3) 待到细胞培养所需时间后, 收集细胞, 1500rpm, 5min 离心, 去上清, 加 PBS 重悬;

4) 用 PBS 将细胞润洗 2 次, 1500rpm, 5min;

5) 按照 AnnexinV-APC/7-AAD 细胞凋亡检测试剂盒操作说明进行:

① 加入 500 μl Binding Buffer, 重悬细胞;

② 5 μl AnnexinV-APC 混匀后加入 5 μl 7-AAD, 混匀;

③ 室温避光反应 5-15min (同时设阴性对照, 即正常细胞不加 AnnexinV-APC 和 7-AAD; 阳性对照 1, 以凋亡效果最明显的溶剂组作为阳性对照, 只加 5 μl AnnexinV-APC 单标; 阳性对照 2, 以凋亡效果最明显的溶剂组作为阳性对照, 只加 5 μl 7-AAD 单标);

6) 流式细胞仪上机检测。

2.12 Western Blotting 检测蛋白质表达

1) 提取蛋白质

①加入 1mLPBS, 离心 5min, 500rpm;

②吸干残留的 PBS, 估计样品体积, 加入 5 倍体积裂解液, 混匀;

③冰浴中以最大功率超声破碎细胞 ($3 \times 10\text{s}$);

④在 4°C 下, 离心 15min, 12000rpm, 收集上清液;

⑤使用 BCA 蛋白定量法测定蛋白浓度, 蛋白上样 Buffer 将蛋白定量为 5mg/mL, -20°C 保存备用, 避免反复冻融。

2) 蛋白浓度测定

- ①梯度稀释牛血清白蛋白（BSA）标准品；
- ②制备 BCA 工作液；
- ③将各个稀释浓度的蛋白质标准品和待测蛋白质样品加入到微孔板或试管中，分别加入 BCA 工作液，混匀；
- ④密封后，在 37°C 下，保温 60min；
- ⑤冷却到室温后，以空白为对照，测量样品在 562nm 或该波长附近的吸光值；
- ⑥将各个标准品和待测蛋白质在 562nm 处的吸光值减去空白标准品在 562nm 处的平均吸光值。

3) SDS-PAGE 电泳

①制备 SDS-PAGE 凝胶：将灌胶玻璃板洗净，晾干固定，确定灌制分离胶液面标志线（距样品梳子底部约 0.5-1.0cm 处），然后配制 10%分离胶 8mL，快速灌入凝胶玻璃槽中，使其液面至标志线位置（避免产生气泡）；立即用去离子水覆盖胶面（隔绝空气，有助于凝胶聚合），室温放置约 40min 至分离胶凝固；配制 5%浓缩胶 4mL；倒掉去离子水覆盖液，并用吸水纸吸掉残留的液体；将凝胶板重新垂直放置，轻轻加入 5%浓缩胶液（注意避免产生气泡），插入样品梳，室温凝胶放置约 40min 后轻轻拔去梳子，将玻璃夹板“凹”面贴紧电泳槽，两侧用夹子固定在电泳槽上；

②电泳：由-80°C冰箱中取出提取的组织总蛋白样品，立即插入冰中（减少蛋白降解），待其融化；根据蛋白定量结果，加入相应体积的总蛋白样品与 5×蛋白质凝胶电泳上样缓冲液混合，95°C变性 10min，立即插入冰中待用；将样品轻轻加至凝胶孔中，电泳仪设置成稳压状态，接通电源，将电压调至 80V 使样品通过浓缩胶与分离胶（电压约 8V/cm）；电泳使染料至分离胶适当位置，结束电泳；凝胶电泳结束后，将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至 PVDF 膜。

4) 转膜：PVDF 膜先置于 100%甲醇中浸泡 2-3min，水、电转液依次漂洗 2min×2 次，置于电转液中备用；剪裁与胶同样大小的 6 层滤纸，用转移缓冲液浸泡后待用；取下电泳板，将其平置（使“凹”面玻璃板在下），小心取出夹板中的垫片及去掉上层玻璃板，切除多余凝胶，将含样品胶用电转液漂洗一次；将样品胶与膜装入标有正、负极的转膜夹板中（由阴极侧开始，依次为海绵垫片→3 层滤纸→样品胶→PVDF 膜→三层滤

纸→海绵垫片), 扣紧转膜夹板, 放入含有转膜缓冲液的转移电泳槽中; 正确连接转移电泳连线, 保证电荷由负极向正极流动。接通电源, 恒压状态下, 65V 转膜 2h; 将转好的膜 (参考目的条带分子量大小) 对照 marker 进行裁剪。

5) 抗体孵育

①封闭: 小心取出转移膜置于封闭液中, 室温、摇床上缓慢摇动状态下封闭 1h;

②一抗反应: 将一抗用封闭液稀释, 将封闭后的膜分别加入对应的一抗工作液中, 4°C 反应过夜;

③洗膜: 将反应膜放入平皿中, 用 1×TBST 洗涤三次, (室温下缓慢摇动洗涤) 每次 10 分钟, 洗净未结合的一抗;

④二抗反应: 将二抗用 1×TBST 稀释 300 倍; 将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中 (室温、避光缓慢摇动) 作用 60min;

⑤洗膜: 用 1×TBST 洗膜, 洗去游离二抗。

6) 显色及成像: 按照 1: 1 混合化学发光底物试剂盒中两种液体后, 将上述混合液均匀铺在 PVDF 膜表面, 在室温下作用 4min, 抖掉膜上液体, 将其放入化学发光成像进行系统成像。

2.13 统计方法

所有统计分析均在 GraphPad Prism 9.5 软件中进行。计量资料数据采用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 首先进行正态性检验 (Shapiro-Wilk 检验), 若是各组均符合正态分布, 则单因素方差分析中 Dunnett 分析进行两两比较, 若不符合正态分布则使用 U 检验。P < 0.05 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 参白颗粒干预最佳剂量筛选

为了筛选不同浓度的参白颗粒含药血清对 GES-1 细胞增殖率的影响, 本研究选取了 10%-50% 不同梯度的含药血清进行实验, 同时将 50%FBS (胎牛血清) 作为阴性对照, 通过结果可以发现, 在加入含药血清 24h 后, 不同浓度的含药血清均对 GES-1 细胞显示出一定的增殖毒性, 40% 含药血清及以上浓度显示出较强的增殖毒性 (图 17A), 因此, 本研究中选择 10%-30% 浓度的参白颗粒含药血清筛选后续细胞与 *H.pylori* 共培养实验中

的细胞保护作用的最佳浓度，同时选择 30%浓度的正常血清浓度作为对照。在图 17B 中可以发现，与 30%正常血清干预 *H.pylori* 与细胞共培养相比，30%参白颗粒含药血清对 GES-1 细胞有明显的保护作用，而 10%浓度的参白颗粒含药血清细胞保护作用弱于 30%正常血清，20%浓度的参白颗粒含药血清则与 30%浓度的正常血清细胞保护作用相当，无明显差异，因此在后续实验中，本研究选择了 30%浓度的参白颗粒含药血清及正常血清作为最佳浓度进行干预。同时可以发现，与 30%正常血清培养 GES-1 细胞相比，在加入 *H.pylori* 共培养后，细胞增殖能力显著下降，表明 *H.pylori* 的存在能够显著损伤细胞。

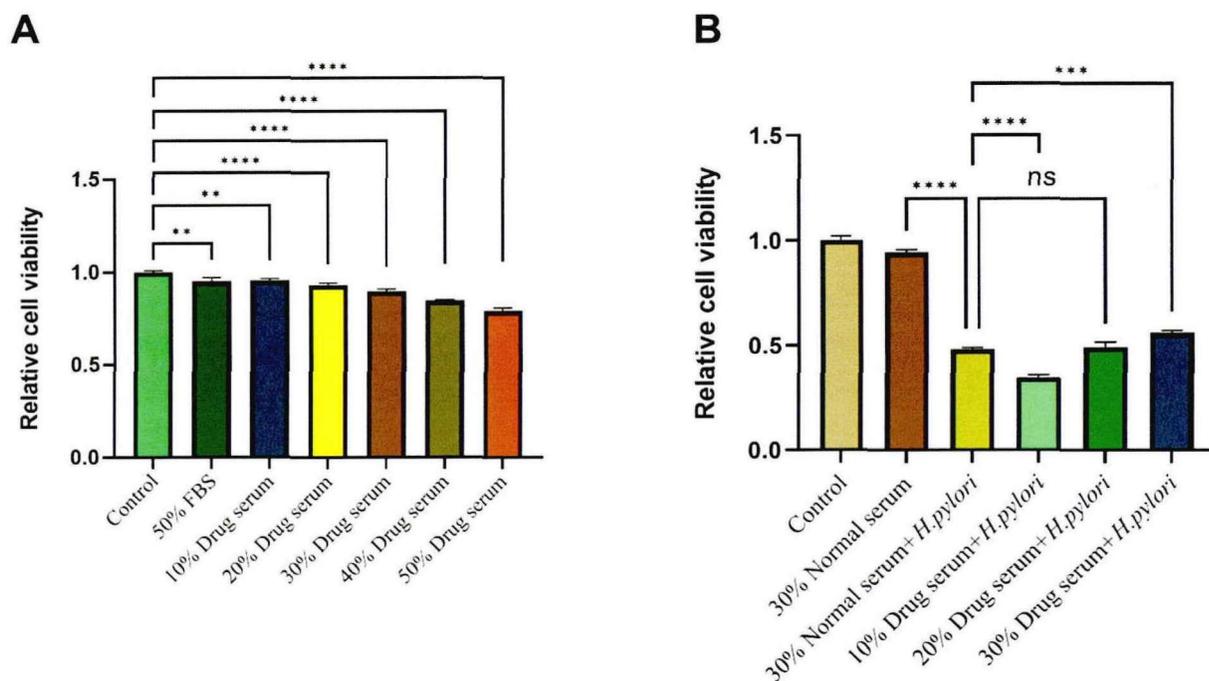


图 17 参白颗粒最佳干预剂量筛选。A.不同浓度参白颗粒含药血清对细胞增殖毒性作用；B.不同浓度参白颗粒含药血清对 *H.pylori* 与细胞共培养状态下的保护作用。（A 图中与对照组（Control）相比，** $P < 0.01$ ，**** $P < 0.0001$ ；B 图中与 30%正常血清与 *H.pylori* 作用（30% Normal serum + *H.pylori*）组相比，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ ）

3.2 参白颗粒含药血清提高 *H.pylori* 急性感染期抑制的 GES-1 细胞增殖水平

本研究建立了 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养体系，模拟 *H.pylori* 在胃中急性感染期间发生的变化，将 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养 24h 后，分别设置了 *H.pylori* 单独感染组 (*H.pylori*)，在共培养模型中加入上述筛选得到 30%含药血清组 (*H.pylori* + 30% Durg

serum), 以及 30%正常血清组 (*H.pylori* + 30% Normal serum) 探究参白颗粒对 *H.pylori* 感染后 GES-1 细胞的作用; 同时设置了幽门螺杆菌的专门培养基滤液组 (CF) 来排除 CF 可能带来的影响, 各组结果见图 18。使用 CCK8 法检测各组 GES-1 细胞活性, 发现 *H.pylori* 能够明显地抑制细胞增殖 (**** $P < 0.0001$); 而在急性感染模型中分别加入前述实验中筛选出的最佳浓度的正常血清以及参白颗粒含药血清后, 可以惊喜地发现, 30%浓度的参白颗粒含药血清可以显著地提高被 *H.pylori* 抑制的 GES-1 细胞增殖的水平(#### $P < 0.0001$), 而正常血清则无提高细胞增殖水平的能力 ($P > 0.05$) (图 18)。

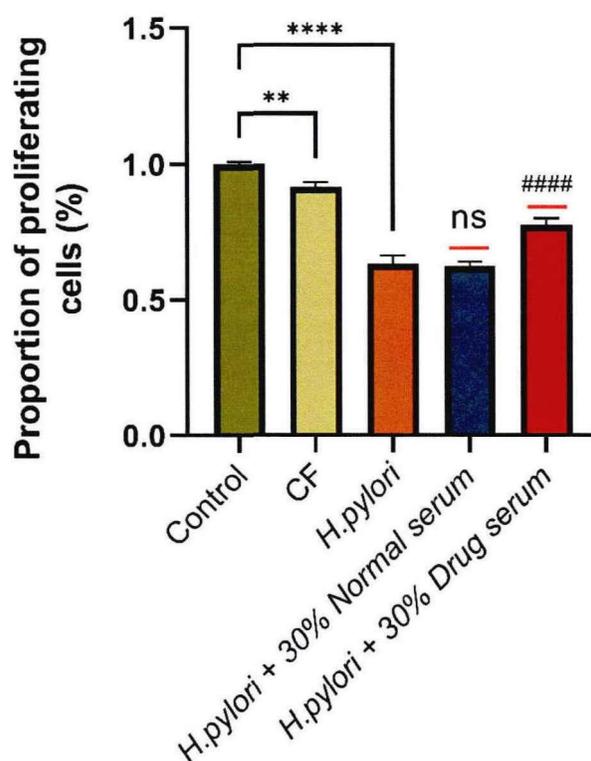


图 18 参白颗粒提高 *H.pylori* 急性感染抑制的 GES-1 细胞增殖水平。与对照组 (Control) 相比, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; 与 *H.pylori* 组 (*H.pylori*) 相比, #### $P < 0.0001$ 。

3.3 参白颗粒提高 *H.pylori* 急性感染抑制的 GES-1 细胞自噬相关基因/蛋白水平

本研究通过 qPCR 对细胞自噬相关基因 P62、LC3-II/LC3-I 以及 Beclin-1 的表达进行检测, 结果如图 19 所示, 在 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养的急性感染期间, 与对照组 (Control) 相比, *H.pylori* 组 (*H.pylori*), P62 基因表达显著提高 (** $P < 0.01$), LC3-II/LC3-I 以及 Beclin-1 基因表达则表现为明显下降 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$), 而

H.pylori 培养基滤液组 (CF) 则无明显差异; 分别加入正常血清以及参白颗粒含药血清后, 可以发现, 与 *H.pylori* 组相比, 加入参白颗粒含药血清组 (*H.pylori* + 30% Drug serum) 的 P62 基因表达显著下降 (#### $P < 0.0001$), 而 LC3-II/LC3-I 以及 Beclin-1 基因的表达均有显著的提高 (#### $P < 0.0001$); 在加入正常血清后 (*H.pylori* + 30% Normal serum), 与 *H.pylori* 组相比, P62、LC3-II/LC3-I 以及 Beclin-1 等基因的表达均无明显的差异。

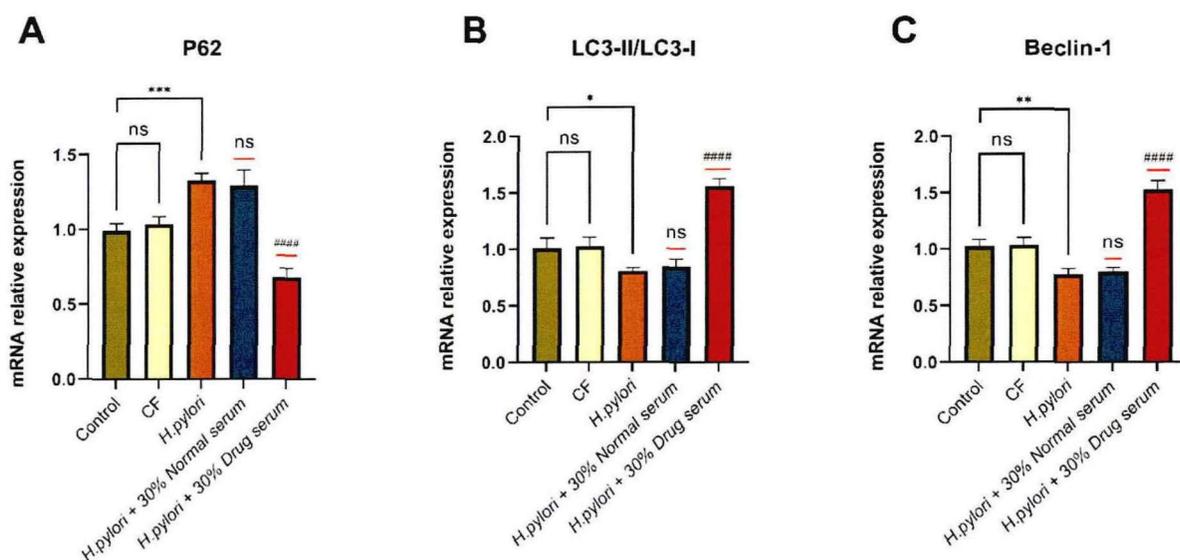


图 19 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养急性感染细胞自噬相关基因表达。qPCR 检测 P62 (A)、LC3-II/LC3-I (B) 以及 Beclin-1 (C) 的 mRNA 表达量, 与 Control 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 *H.pylori* 组相比, #### $P < 0.0001$ 。

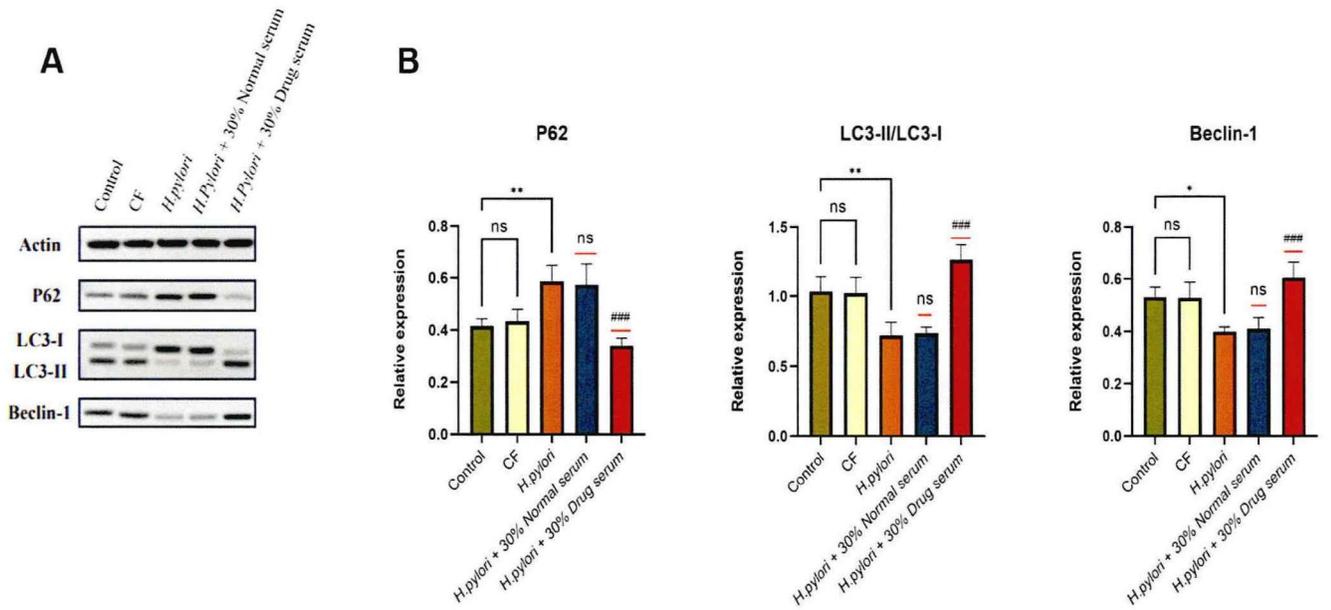


图 20 *H. pylori* 与 GES-1 细胞共培养急性感染细胞自噬相关蛋白表达。A: WB 检测 P62、LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白表达图; B: WB 检测 P62、LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白相对表达量, 与 Control 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 *H. pylori* 组相比, ### $P < 0.001$ 。

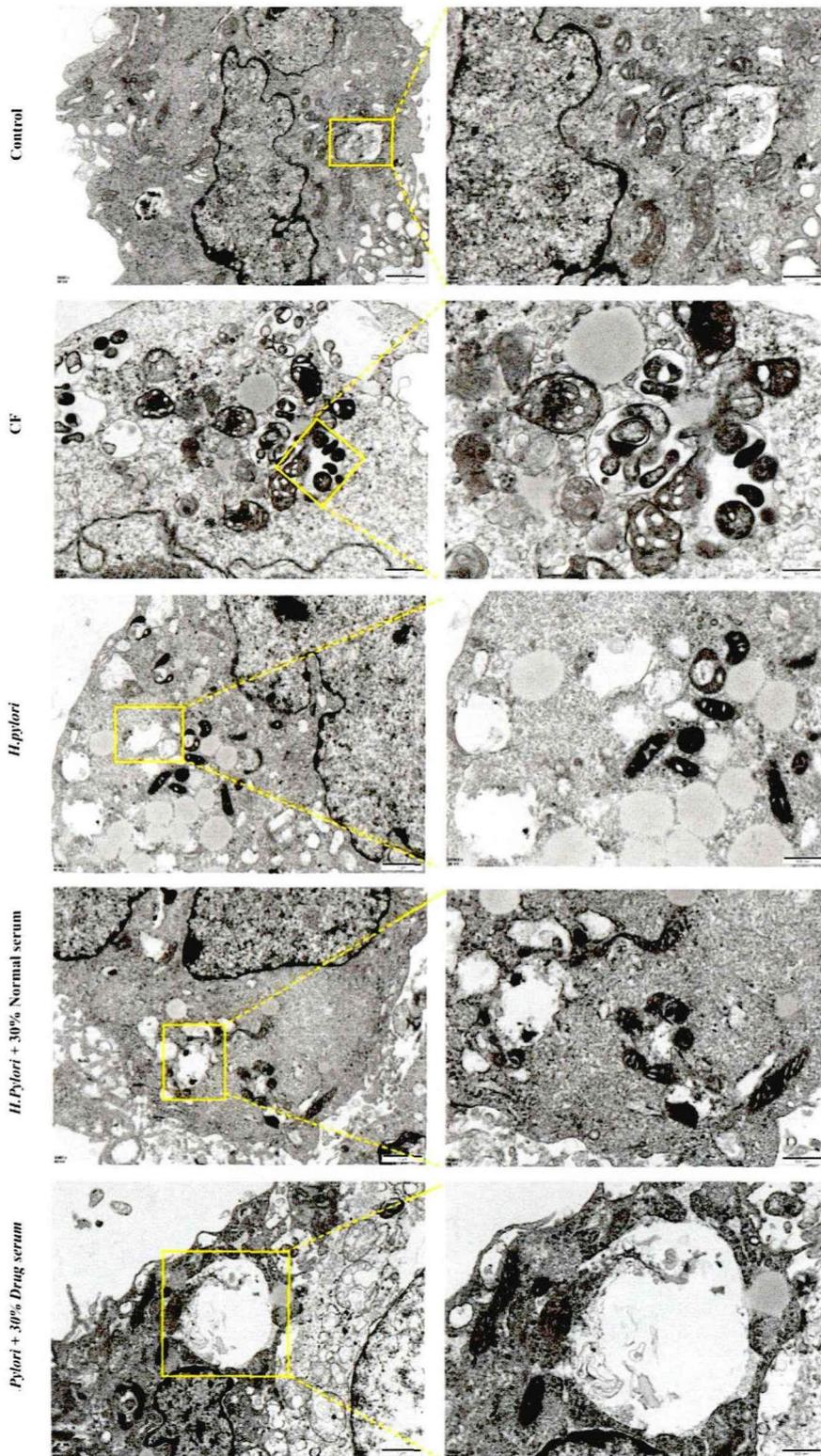


图 21 *H.pylori* 感染干扰细胞自噬的形成。透射电子显微镜 (TEM) 可以观察到不同干预组中 GES-1 细胞中自噬体的典型图像。黄色方框示意局部放大图。

本研究采用 WB 的方法检测细胞自噬相关蛋白的表达,结果见图 20A、B。在 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养急性感染期间,与对照组 (Control) 相比, *H.pylori* 组 (*H.pylori*)

P62 蛋白表达水平显著增加 (** $P < 0.01$), LC3-II/LC3-I 及 Beclin-1 蛋白表达水平明显下降 (** $P < 0.01$, * $P < 0.05$), 而 *H.pylori* 培养基滤液组 (CF) 与对照组相比, P62、LC3-II/LC3-I 及 Beclin-1 蛋白的表达水平均无明显差异 ($P > 0.05$); 与单纯 *H.pylori* 组 (*H.pylori*) 培养相比, 在加入 30% 参白颗粒含药血清后, P62、LC3-II/LC3-I 及 Beclin-1 蛋白的表达水平均有显著提高 (#### $P < 0.0001$), 而加入 30% 正常血清后, 细胞自噬相关蛋白的表达水平与 *H.pylori* 组相比无明显差异 ($P > 0.05$)。

透射电镜检测表明, 对照组 (Control) GES-1 细胞以及使用 *H.pylori* 培养基滤液组 (CF) 中均可以见到典型自噬体的形成 (黄框所示), 而在加入 *H.pylori* 后, 自噬体的形成减少, 结果见图 21。正如上文所述, 细胞自噬相关蛋白的表达相对减少, 细胞自噬收到抑制, 而加入参白颗粒含药血清后, 细胞自噬水平提高, 自噬体的形成增多。

综合上述实验结果所示, *H.pylori* 急性感染可以抑制胃黏膜 GES-1 细胞自噬的水平, 而加入参白颗粒含药血清后, 细胞自噬水平显著提高, 这表明参白颗粒可以提高 *H.pylori* 抑制的 GES-1 细胞自噬水平。

3.4 *H.pylori* 急性感染诱导 GES-1 细胞促炎因子分泌增加

本研究中通过 ELISA 检测可以发现 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养后, 可以促进 GES-1 细胞释放大量的促炎因子, IL-6、TNF- α 、IL-8、IL-12 以及 IL-1 β 等促炎因子的水平与对照组 (Control) 相比, 表现出显著性差异 (**** $P < 0.0001$), 结果如图 22 所示。而在加入正常血清以及参白颗粒含药血清后, 促炎因子的水平能够出现显著性的下降 (#### $P < 0.0001$)。

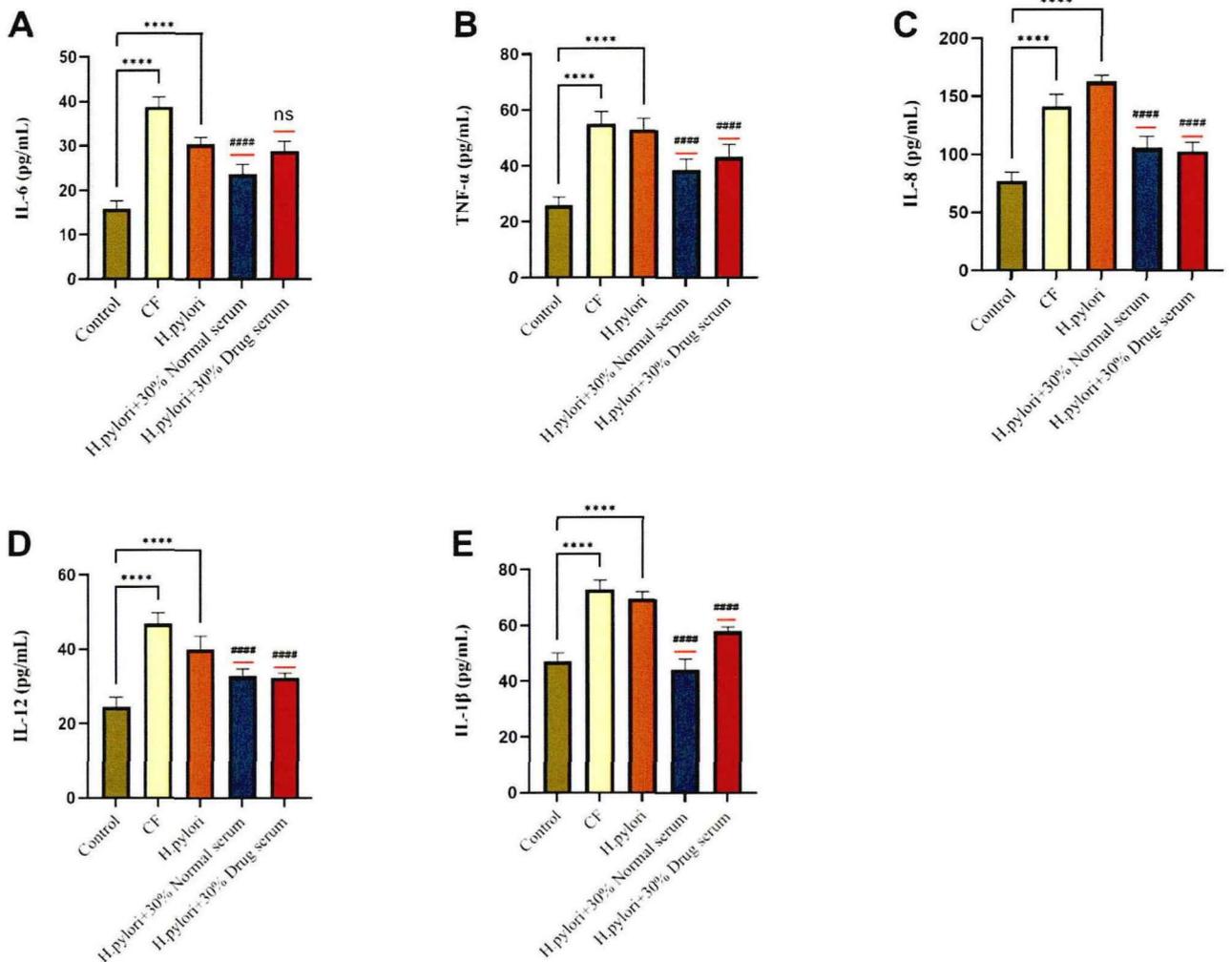


图 22 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养急性感染期诱导促炎因子分泌增加。ELISA 检测不同分组细胞培养液中促炎因子的浓度。与 Control 组比较, **** $P < 0.0001$; 与 *H.pylori* 组相比, #### $P < 0.0001$

3.5 参白颗粒含药血清抵抗 *H.pylori* 慢性感染期 GES-1 细胞增殖水平

本研究继建立了 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养慢性感染体系, 模拟 *H.pylori* 在胃中慢性、长程感染期间发生的变化, 将 *H.pylori* 与 GES-1 细胞共培养 30 天后, 使用 CCK8 法检测 GES-1 细胞的增殖活性。与对照组 (Control) 相比, *H.pylori* 慢性感染能够明显地提高 GES-1 细胞增殖 (**** $P < 0.0001$), 加入正常血清后, 细胞增殖能力无明显变化, 而加入 30% 参白颗粒含药血清后, GES-1 细胞增殖能力明显下降 (#### $P < 0.0001$), 具体结果见图 23。

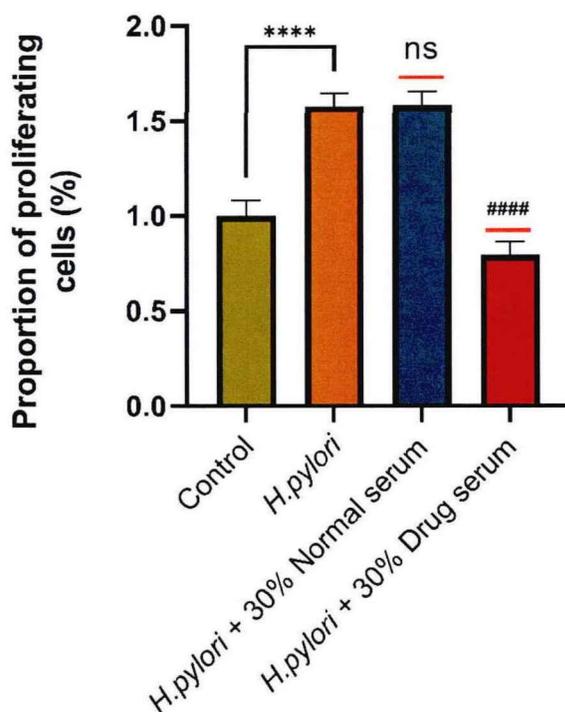


图 23 参白颗粒抵抗 *H.pylori* 慢性感染 GES-1 细胞增殖。与对照组 (Control) 相比, **** $P < 0.0001$; 与 *H.pylori* 组 (*H.pylori*) 相比, #### $P < 0.0001$ 。

3.6 参白颗粒抑制 *H.pylori* 慢性感染诱导增强的 GES-1 细胞迁移与侵袭能力

本研究中将 *H.pylori* 与 GES-1 细胞长期共培养 1 个月后, 进行细胞划痕实验检测, 分别观察 0h、24h 细胞迁移能力, 结果如图 24A、B 所示, *H.pylori* 慢性感染组的 24h 后细胞愈合面积更大, 划痕宽度与对照组相比, 明显变窄 (#### $P < 0.0001$), 而加入正常血清后, 划痕宽度与对照组相比, 变窄仍十分明显 (#### $P < 0.0001$), 在加入参白颗粒含药血清后, 划痕愈合面积与对照组相比无明显差异, 划痕宽度与对照组相比无差异 ($P > 0.05$)。细胞划痕实验结果表明, 长期的 *H.pylori* 慢性感染 GES-1 细胞, 能够增强细胞的迁移能力, 而参白颗粒含药血清能够有效的抑制 GES-1 细胞的迁移。

一般来说, 侵袭能力较强的细胞能够分泌消化基质胶原蛋白从而能够到达含有较高营养成分的 transwell 下室, 因此可以通过计数到达下室的细胞来说明该细胞的侵袭能力。transwell 小室实验结果见图 25A、B, 与对照组相比, *H.pylori* 长期感染的 GES-1 细胞的侵袭能力显著增强, 在加入含药血清后, 与 *H.pylori* 组 (*H.pylori*) 相比, 细胞侵袭能力显著下降 (#### $P < 0.0001$), 而加入正常血清后, 到达下室的细胞与 *H.pylori* 组比较,

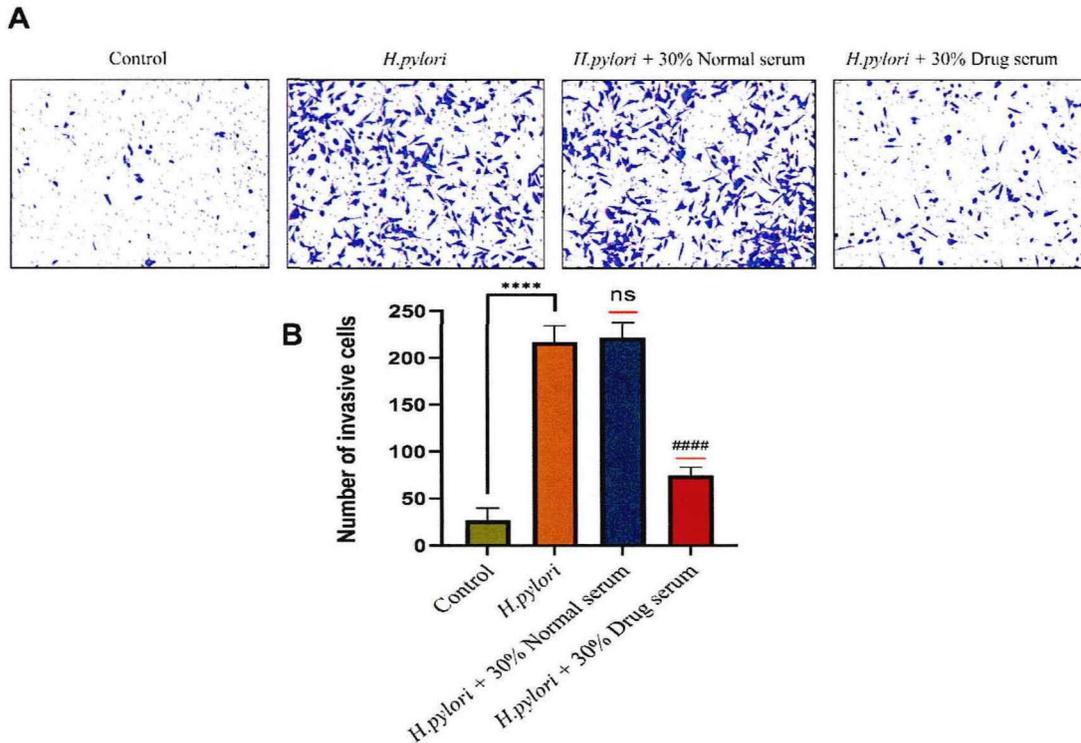


图 25 *H.pylori* 慢性感染对 GES-1 细胞侵袭能力的影响。A: 通过光镜观察 GES-1 细胞穿过 transwell 小室的能力; B: GES-1 细胞穿过小室的数量, 与对照组 (Control) 相比, **** $P < 0.0001$; 与 *H.pylori* 组 (*H.pylori*) 相比, #### $P < 0.0001$ 。

3.7 参白颗粒抑制 *H.pylori* 慢性感染诱发的 GES-1 细胞自噬相关基因/蛋白水平

在本研究中, *H.pylori* 与 GES-1 细胞进行长期共培养后, 利用 qPCR 技术对细胞自噬相关基因进行检测, 结果见图 26。与对照组相比, *H.pylori* 组的 P62 基因表达显著下降 (**** $P < 0.0001$), LC3-II/LC3-I 以及 Beclin-1 基因表达显著提高 (**** $P < 0.0001$), 这表明 *H.pylori* 长期慢性感染 GES-1 细胞后, 提高其细胞自噬能力; 而加入正常血清后, 细胞自噬相关基因的表达与 *H.pylori* 慢性感染组无显著差异 ($P > 0.05$); 在加入参白颗粒含药血清干预后与 *H.pylori* 慢性感染组相比, P62 基因表达显著提高 (### $P < 0.001$), LC3-II/LC3-I 以及 Beclin-1 基因的表达均有显著的下降 (### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$)。

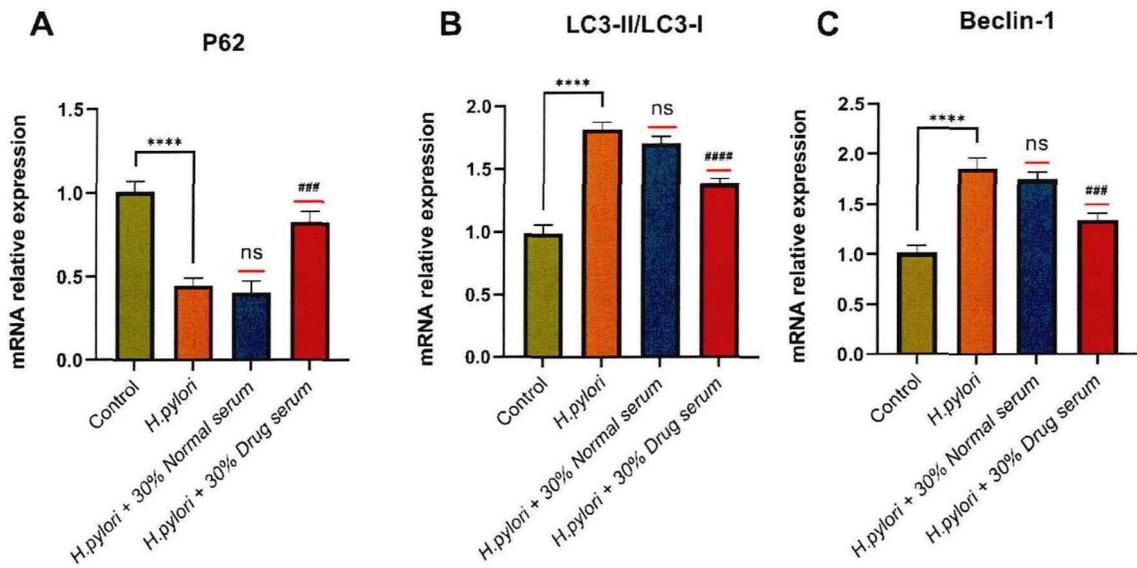


图 26 *H.pylori* 与 GES-1 细胞长期共培养后细胞自噬相关基因表达。qPCR 检测 P62 (A)、LC3-II/LC3-I (B) 以及 Beclin-1 (C) 的 mRNA 表达量, 与 Control 组相比, **** $P < 0.01$; 与 *H.pylori* 组相比, ### $P < 0.001$ 。

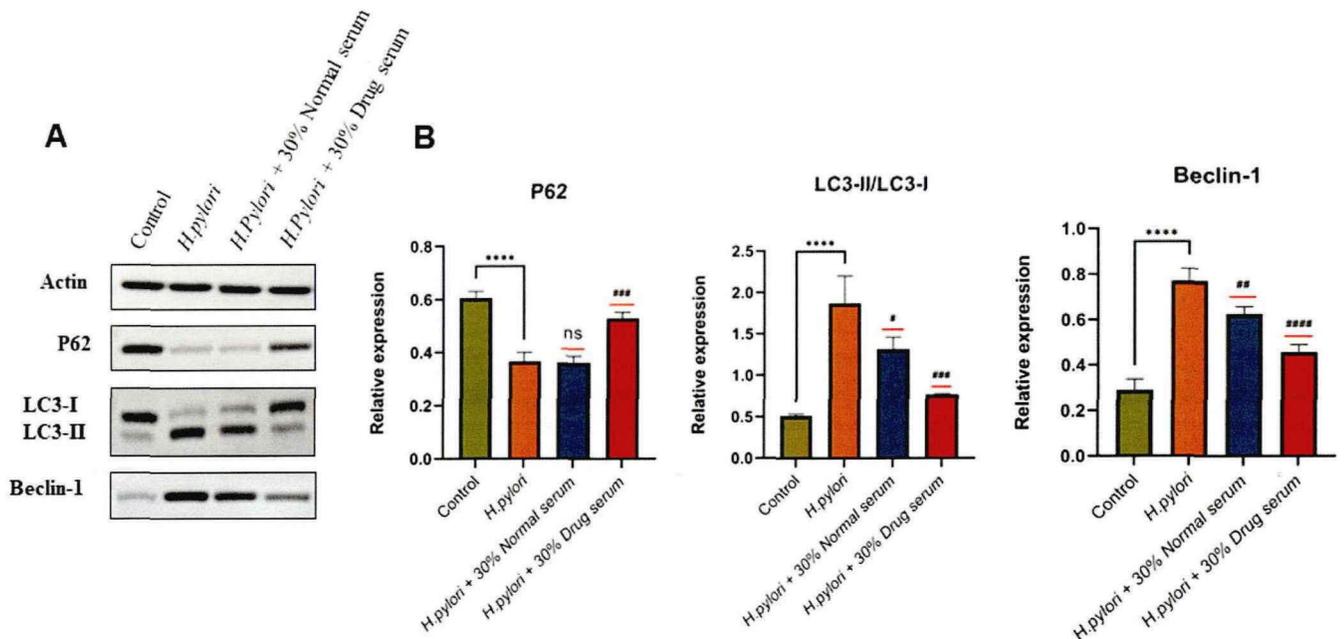


图 27 *H.pylori* 与 GES-1 细胞长期共培养后细胞自噬相关蛋白表达。A: WB 检测 P62、LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白表达图; B: WB 检测 P62、LC3-II/LC3-I、Beclin-1 蛋白相对表达量, 与 Control 组比较, **** $P < 0.0001$; 与 *H.pylori* 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ 。

本研究还通过 WB 的方法检测细胞自噬相关蛋白的表达, 结果见图 27A、B。细胞

自噬相关蛋白的表达趋势与其对应的基因表达趋势大致一致。经 *H.pylori* 慢性感染的 GES-1 细胞, 与对照组相比, P62 蛋白的表达显著下降 (**** $P < 0.0001$), LC3-II/LC3-I 及 Beclin-1 蛋白表达水平明显提高 (**** $P < 0.0001$)。在加入参白颗粒含药血清干预后, 与单纯 *H.pylori* 慢性感染组相比, P62 蛋白表达明显提高 (### $P < 0.001$), LC3-II/LC3-I 及 Beclin-1 蛋白表达水平明显下降 (### $P < 0.001$, ##### $P < 0.0001$)。而加入正常血清后, P62 蛋白的表达与单纯 *H.pylori* 慢性感染组相比无统计学意义, LC3-II/LC3-I 及 Beclin-1 蛋白表达均呈现不同程度的下降 (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$)。

对各个干预组的 GES-1 细胞进行透射电镜观察, 可以发现 *H.pylori* 慢性感染组中典型自噬体形成增多 (黄框所示), 结果见图 28。

综合上述实验结果所示, *H.pylori* 慢性感染 GES-1 细胞可以提高细胞自噬水平, 而加入参白颗粒后可以降低 GES-1 细胞自噬水平, 这表明参白颗粒可以抑制 *H.pylori* 慢性感染诱发的 GES-1 细胞自噬水平。

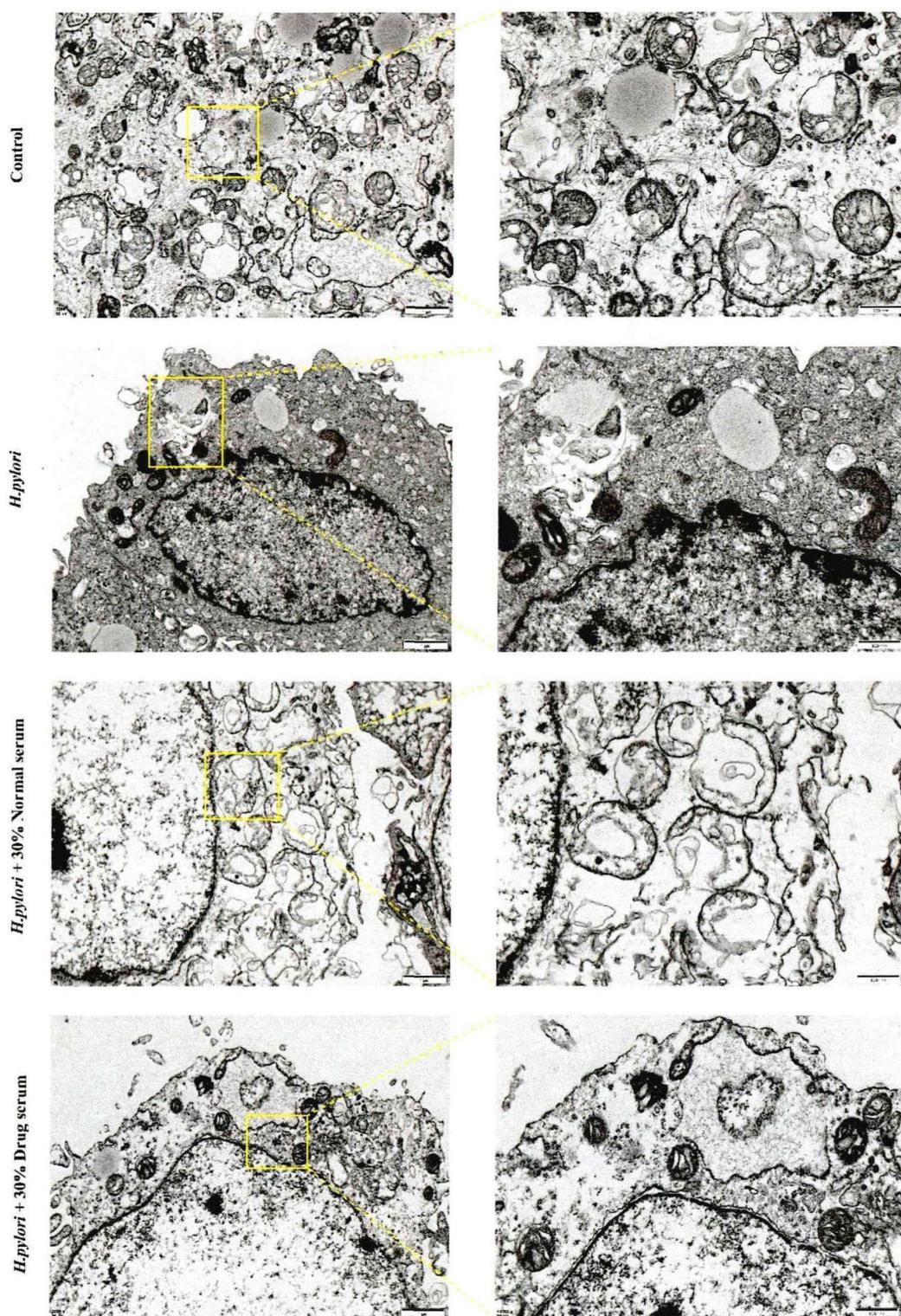


图 28 *H. pylori* 感染诱导 GES-1 细胞自噬的形成。透射电子显微镜 (TEM) 可以观察到不同干预组中 GES-1 细胞中自噬体的典型图像。黄色方框示意局部放大图。

3.8 参白颗粒激活 *H.pylori* 慢性感染诱导的 GES-1 细胞凋亡抵抗

H.pylori 与 GES-1 细胞长期共培养后, 进行流式细胞术检测, 发现 *H.pylori* 慢性感染的 GES-1 细胞与对照组比较, 其细胞凋亡率显著下降 (**** $P < 0.0001$), 而加入参白颗粒含药血清干预后, 与 *H.pylori* 慢性感染组相比, 细胞凋亡率明显提高 (#### $P < 0.0001$); 加入正常血清后与 *H.pylori* 慢性感染组相比, GES-1 细胞凋亡率出现一定的下降 (## $P < 0.01$), 结果见图 29A、B。以上结果说明, *H.pylori* 慢性感染可以抑制 GES-1 细胞凋亡, 而加入参白颗粒干预后, 可以改善慢性 *H.pylori* 感染的 GES-1 细胞抗凋亡的特性。

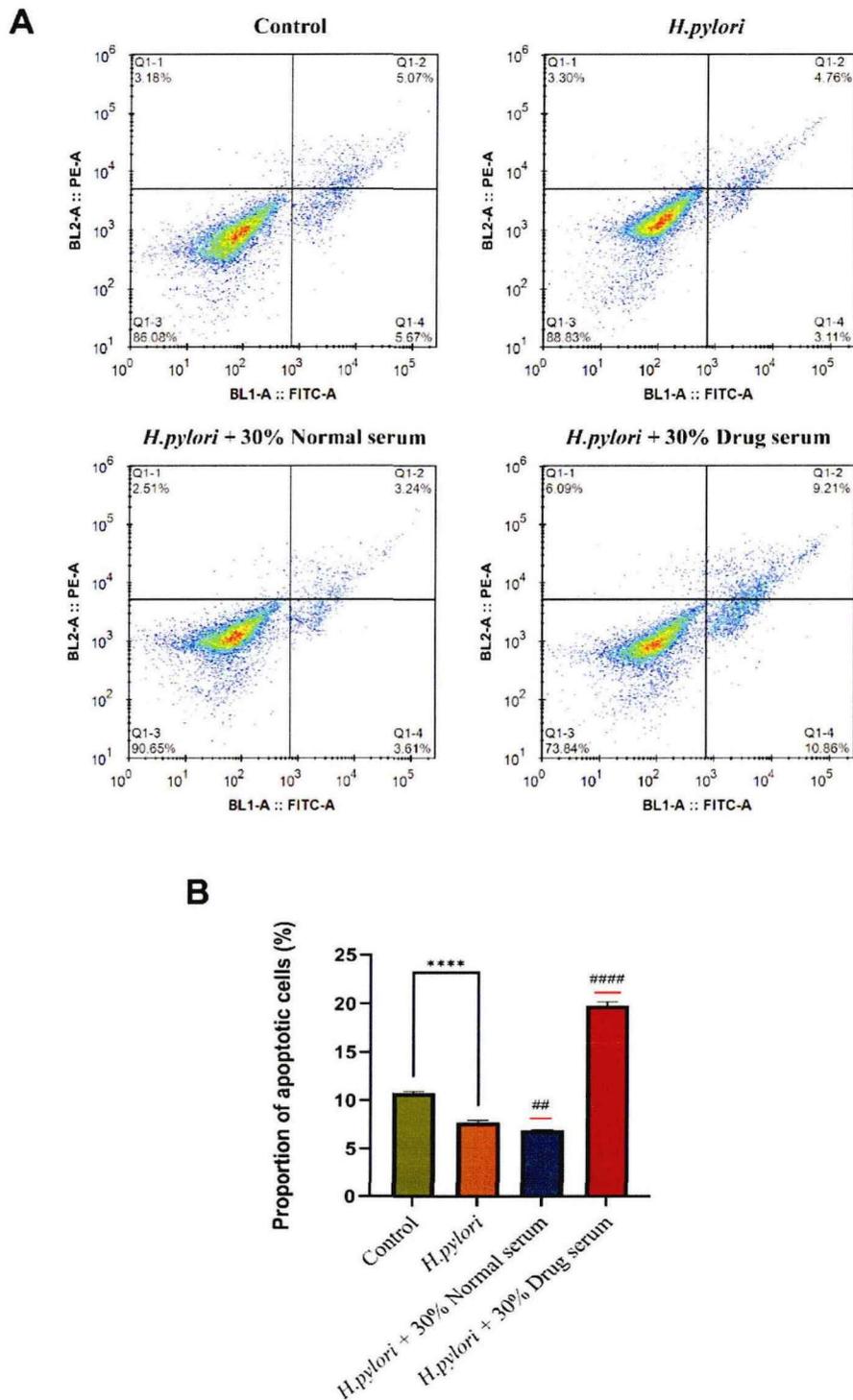


图 29 *H.pylori* 慢性感染诱导 GES-1 细胞凋亡抵抗。A：流式细胞术检测细胞凋亡情况；B：对凋亡细胞进行统计分析，与对照组相比，**** $P < 0.0001$ ；与 *H.pylori* 组相比，## $P < 0.01$ ，#### $P < 0.0001$ 。

4 讨论

4.1 *H.pylori* 急性感染与慢性感染共培养模型的建立

H.pylori 与人胃黏膜上皮细胞 (GES-1) 共培养模式是体外实验模拟 *H.pylori* 发挥致病作用最直接有效的方式。为了模拟 *H.pylori* 在胃内急性感染与慢性长期感染的状态, 本研究构建了短期共培养 (急性感染) 与长期共培养 (慢性感染) 两种模型, 研究在这两种模型过程中 GES-1 细胞增殖、细胞自噬、迁移、侵袭以及凋亡等变化。在本研究中, 选取 *H.pylori* ATCC43504 标准株作为实验菌株, 是因为该菌株是具有 CagA+ 与 VacA+ 双阳性的强毒力菌株, 更能开展 *H.pylori* 强毒力的研究^[65]; 在此次研究中, 选取了人胃黏膜上皮细胞 GES-1 作为实验细胞株来模拟 *H.pylori* 感染人体的过程, 而没有选择大部分实验中的胃腺癌 AGS 细胞, 这是因为 AGS 细胞作为已经癌化的细胞系, *H.pylori* 与其共培养后对其机制进行研究, 实验结果可能并不能说明 *H.pylori* 的致病性。

4.2 参白颗粒用于治疗胃癌前病变临床研究的源流

H.pylori 乃湿热邪气, 自口侵入胃腑, 初感邪气, 内镜望之, 胃黏膜一派弥漫发红, 白色黏液附着, 粘腻难以冲刷, 此乃湿热邪气侵袭胃腑, 湿邪为病, 重浊黏滞, 胃经聚水, 易阻气机, 此病初起在气分; 热邪初起, 迫血妄行横溢, 故镜下一派弥漫性发红之象; 胃乃多气多血之腑, 火热盘踞中焦日久, 热入血分, 燔灼津液, 邪热不得泄, 气郁不得解, 津少血浓, 迟滞成瘀, 瘀血内阻, 故除菌后内镜下可见小弯侧地图样发红表现, 胃黏膜褪色变薄, 血管网显露, 此期病进, 毒热入血分, 病在血分, 当气血兼顾。

内镜乃中医望诊的延伸。现症感染与既往感染镜下表现各不相同, 不同时期分属 *H.pylori* 感染不同阶段, 病机不同则其治法各异, 中医诊病, 首要察病因, 明病机, 后辨证论治, 此为准则, 当先明其重, 而后知所从治。

课题组前期自 *H.pylori* 现症感染与既往感染不同阶段病机出发, 将 *H.pylori* 感染状态分为三期论治, 导师李志红根据多年临证经验, 将 *H.pylori* 感染分为三个阶段, 认为现症感染阶段, 病情较轻, 病位在气分, 此期病机为湿热壅滞, 治以清热利湿, 通利腑气; 在根除 *H.pylori* 后, 即既往感染状态, 此时虽邪气已除, 但邪毒入血, 病位在血分, 此期热毒入络, 治以理气活血解毒; *H.pylori* 侵袭胃腑日久, 变生他疾, 正如《灵枢·邪气脏腑病形》“邪气不出, 与其真相搏, 乱而不去, 反还内著。”邪不早除, 邪不尽除,

损人体之真气，*H.pylori* 侵入人体日久，邪气日盛，此时即使根除，其所遗余邪煎熬胃阴，胃汁竭，引动肝风，终成肝胃阴虚之机，此时病久已成虚体，治疗当以濡润甘寒养阴为要。

在辨证论治的指导下，导师李志红在全国名中医田德禄教授治疗胃癌前病变的中药方剂“消痞灵”的基础上去原方中甘补之党参，改用甘平之太子参，平补气阴，组成中药复方参白颗粒，全方共六味，方简效专，用于治疗根除 *H.pylori* 后内镜下示小弯侧地图样发红表现，胃黏膜褪色变薄，血管网显露等表现，此期热毒入络，全方共奏理气活血解毒之治。方中柴胡味辛苦，性微寒，归肝、胆、肺经，具疏肝理气解郁之效；紫苏梗为紫苏茎入药，性味辛、甘，微温，归肺、脾、胃经，以梗入药，更擅理胃气之效，两药共同为君药，疏肝气，降胃气，理中焦气郁之弊；白花蛇舌草功擅清热利湿、解毒消痈，配伍清热利水渗湿之生薏苡仁，导余邪外出，辅以行气活血化瘀之莪术，三者共为臣药，清中焦郁热之邪，化胃腑入络之毒；再于前述一队戕伐正气之品中佐入平步脾胃气阴之太子参，一则健脾运以固本，二则补脾阴以防诸药攻伐太过。药仅六味，随证治之，热毒甚，随证加入连翘、蒲公英、紫花地丁等清热解毒之品；阴虚甚，则佐以石斛、沙参、生地等甘寒养阴之类。

组方在立意上重在“除邪务尽”的理念，即使根除 *H.pylori* 后，其残留的毒素以及导致的免疫反应均持续“攻击”胃黏膜的稳态，因此整个处方理气活血以逐气郁、血瘀之邪外出，平补气阴以固本维持胃黏膜稳态。

课题组前期使用参白颗粒进行小样本临床疗效观察研究发现，参白颗粒干预 12 周后的胃癌前病变患者，其组织病理学结果表明胃黏膜中炎性细胞浸润程度、异型细胞数量、分布范围以及分布密度等均有所减轻^[42]。

因此在本研究中，我们收集了参白颗粒含药血清，验证其体外抗 *H.pylori* 疗效。本研究为保证造模稳定性和质量，采集到的大鼠参白颗粒含药血清经过过滤、补体灭活后，进行两次 CCK8 实验检测细胞增殖活性，选取适合的含药血清浓度用于后续实验。

4.3 参白颗粒对急、慢性感染中胃黏膜细胞增殖、自噬的影响

H.pylori 与 GES-1 细胞短期共培养时，*H.pylori* 可抑制 GES-1 细胞增殖活性，抑制细胞自噬水平。细胞自噬在调节宿主免疫和炎症反应中起着关键作用，被认为是一种对

抗感染的先天防御机制，正如文献研究结果所示，*H.pylori* 的空泡细胞毒素可以抑制自噬体成熟，形成扩大的、功能失调的溶酶体和自噬体，破坏自噬途径^[66]，这些溶酶体和自噬体充当细胞内生态位，*H.pylori* 可以在自噬体的双层膜区室内冬眠并进一步复制以实现在胃黏膜中长期存活的目的^[67]。而在经过一个月的长期共培养后，持续暴露于 *H.pylori* 环境下的 GES-1 细胞增殖水平提高，细胞自噬增强，细胞的侵袭以及迁移能力均有所提高，并且长期感染后的细胞在透过 transwell 小室时，与对照组相比，可以发现细胞形态发生了明显的变化，细胞牵拉伸长，表现出“蜂鸟”的细长表型^[68]，类似于成纤维细胞间叶细胞形态的改变，侵袭能力增加，这是细胞恶变的特质，与此同时，长期感染的 GES-1 细胞的凋亡率明显下降，具备了一定的抗凋亡特性，这表明 GES-1 细胞具备了一定的恶变特性，出现了癌症干细胞（Cancer stem cells, CSCs）的特性，这与文献研究结果一致，胃肠上皮化生的细胞凋亡水平下降，而增殖水平提高，这有利于细胞的积累，这正是肿瘤发生的一种趋势^[69]。

在加入参白颗粒含药血清后，慢性感染的 GES-1 细胞增殖明显被抑制，而细胞凋亡率被提高，导致凋亡指数/增殖指数比率显著增加，这表明参白颗粒可以扭转了上述细胞恶变的趋势。

长期感染的 GES-1 细胞表现出的 CSCs 特性可能需要细胞自噬来维持，研究表明，自噬可减少间充质干细胞的活性氧生成并维持干性特征，同时自噬可以控制 CSCs 细胞的稳态，因此这得以解释在慢性感染过程中细胞自噬的水平提高。

在急性感染期间，*H.pylori* 抑制细胞自噬以获取在细胞内的生态位，而在慢性感染长期暴露于 *H.pylori* 毒素中，这些包裹着 *H.pylori* 的、具有缺陷的自噬体与溶酶体通过其他未知的途径激活，诱导细胞自噬的发生，从而使封存的 *H.pylori* 得以继续感染细胞，同时在此过程中，细胞自噬的过程可以维持着 CSCs 特性。

综上所述，急性感染期间，*H.pylori* 抑制 GES-1 细胞增殖活性，破坏细胞自噬途径以实现在细胞内存活的目的，而在长期的 *H.pylori* 刺激下，正常的 GES-1 细胞表现出 CSCs 样转化，使细胞出现异常增殖、抗凋亡以及激活细胞自噬以维持干细胞特性，而在加入参白颗粒含药血清后，能够有效的抑制细胞增殖、提高细胞凋亡率、抑制细胞自噬，降低 CSCs 样细胞的迁移以及侵袭能力从而减少 CSCs 样细胞的动态生长。

结 语

研究结论：本研究围绕 *H.pylori* 相关胃癌前病变展开临床与实验研究，从 *H.pylori* 相关胃癌前病变放大内镜下的表现入手，从宏观上把握癌前病变黏膜的形态变化，以期更准确的判定病变性质，识别高危病变甚至恶性病变，提高病变黏膜的诊断效能；进一步基于单细胞测序技术绘制 *H.pylori* 相关胃癌前病变黏膜上皮细胞的单细胞图谱与演化轨迹，继以细胞实验探究中药复方参白颗粒干预上皮细胞异常增殖分化的作用靶点，为中医药防治 *H.pylori* 相关癌前病变提供思路与对策。

结论如下：

1. 在高危型 OLGA 的判别中，我们发现“白光下可见肠化斑”是风险因素，在内镜检查过程中当提起重视，同时虽然 DL 与癌变呈正相关，但 MCDL 边界规整确是保护性因素，应当细致地对 DL 进行下一步的微细判别；在高危型 OLGIM 判别中，胃体小弯侧发现 IM、VEC pattern 均是重要的风险因素。

2. 通过构建 *H.pylori* 感染后的胃黏膜上皮细胞类群分化轨迹图谱，我们表征了潘氏细胞、成纤维细胞、LGR5+ stem 细胞、肠内分泌细胞、主细胞以及 Pit mucous 细胞在 *H.pylori* 相关胃癌前病变组织中进展的动态变化。我们确定了以 LGR5+ stem 细胞在胃癌前病变组织中恶性增殖的地位。

3. 通过细胞实验构建 *H.pylori* 与 GES-1 细胞短期与长期共培养模型，模拟 *H.pylori* 在人体内急性感染与慢性感染的过程，我们发现在急性感染期间，*H.pylori* 抑制 GES-1 细胞增殖，破坏细胞自噬，分泌大量促炎因子，而长期 *H.pylori* 刺激下，正常的 GES-1 细胞表现出 CSCs 样转化，细胞出现异常增殖活性、抗凋亡特性以及能够激活细胞自噬以维持干细胞特性，在加入参白颗粒含药血清后，能够有效的抑制细胞增殖、提高细胞凋亡率、抑制细胞自噬，降低 CSCs 样细胞的迁移以及侵袭能力从而减少 CSCs 样细胞的动态生长。

创新点

1. 在本研究中，从临床现象入手，探究胃黏膜病变的表象，继而采用单细胞测序技术解密微观上胃上皮细胞的动态变化轨迹，继以细胞实验验证发现，同时加入中药复方的干预，以期为中医药防治胃癌前病变提供思路，本研究从宏观到微观，从临床表现到

实验验证，契合了临床问题指导科研过程，科研结果促进临床疗效的闭环。

2. 本研究解密了在 *H.pylori* 相关的胃黏膜上皮细胞的动态发展过程中，主要异常增殖的 LGR5+ stem 细胞，同时细胞实验证实了在 *H.pylori* 急性感染与慢性感染期间，细胞不同的增殖、自噬以及凋亡途径，能够更好地为临床防治 *H.pylori* 相关性胃癌前病变提供思路，提示我们，在根除 *H.pylori* 后，胃黏膜依旧有恶性进展的可能。

不足与展望

1. 本研究中临床研究章节中选取的是单中心的数据，患者人群及病种具有一定的局限性，同时由于纳入的病例数较少，未对得到的诊断模型实施外部验证，在之后的研究中，可以联合多中心、大样本探究胃癌前病变黏膜的特殊内镜下表现，同时加入外部验证，评判诊断模型的效能。

2. 单细胞测序技术过程中，采集的样本数量较少，难以表征更全面的上皮细胞类群，这提示我们在后续实验过程中，应当进行更大样本量的单细胞测序技术，尽量采用同一批次的样本以矫正误差。

3. 体外细胞实验验证了中药复方参白颗粒干预急性及慢性 *H.pylori* 感染的过程，但是不可否认的是，缺少更加细致的靶点通路验证，因此后续的研究应当更加细致地阐明中药复方作用的靶点，乃至拆分中药复方以明确单药的作用靶点。

参考文献

- [1] Correa P. A human model of gastric carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 1988, 48(13): 3554-60.
- [2] Correa P, Piazuelo MB. The gastric precancerous cascade[J]. *J Dig Dis*, 2012, 13(1): 2-9.
- [3] Sugano K, Tack J, Kuipers EJ, et al. Kyoto global consensus report on *Helicobacter pylori* gastritis[J]. *Gut*, 2015, 64(9): 1353-67.
- [4] 梁旭,王萍,谢璟仪等.胃癌前病变的筛查和管理:一项基于消化科医生的横断面调查研究[J].*中国中西医结合消化杂志*, 2023, 31(12): 968-973+984.
- [5] 李扬,年媛媛,孟宪梅.胃癌前病变的诊断和治疗现状[J].*消化肿瘤杂志(电子版)*, 2022, 14(02): 113-118.
- [6] Sugano K, Moss SF, Kuipers EJ. Gastric Intestinal Metaplasia: Real Culprit or Innocent Bystander as a Precancerous Condition for Gastric Cancer?[J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(6): 1352-1366.e1.
- [7] Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: a paradigm for hit-and-run carcinogenesis[J]. *Cell Host Microbe*, 2014, 15(3): 306-16.
- [8] Lee CK, Chung IK, Lee SH, et al. Is endoscopic forceps biopsy enough for a definitive diagnosis of gastric epithelial neoplasia?[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(9): 1507-13.
- [9] Takao M, Kakushima N, Takizawa K, et al. Discrepancies in histologic diagnoses of early gastric cancer between biopsy and endoscopic mucosal resection specimens[J]. *Gastric Cancer*, 2012, 15(1): 91-6.
- [10] Lim H, Jung HY, Park YS, et al. Discrepancy between endoscopic forceps biopsy and endoscopic resection in gastric epithelial neoplasia[J]. *Surg Endosc*, 2014, 28(4): 1256-62.
- [11] Ezoe Y, Muto M, Uedo N, et al. Magnifying narrowband imaging is more accurate than conventional white-light imaging in diagnosis of gastric mucosal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(6): 2017-2025.e3.
- [12] Yao K, Uedo N, Kamada T, et al. Guidelines for endoscopic diagnosis of early gastric cancer[J]. *Dig Endosc*, 2020, 32(5): 663-698.

- [13] Yao K, Anagnostopoulos GK, Ragunath K. Magnifying endoscopy for diagnosing and delineating early gastric cancer[J]. *Endoscopy*, 2009, 41(5): 462-7.
- [14] Muto M, Yao K, Kaise M, et al. Magnifying endoscopy simple diagnostic algorithm for early gastric cancer (MESDA-G) [J]. *Dig Endosc*, 2016, 28(4): 379-393.
- [15] Yoshimizu S, Yamamoto Y, Horiuchi Y, et al. Diagnostic performance of routine esophagogastroduodenoscopy using magnifying endoscope with narrow-band imaging for gastric cancer[J]. *Dig Endosc*, 2018, 30(1): 71-78.
- [16] Kotachi T, Ito M, Boda T, et al. Clinical Significance of Reddish Depressed Lesions Observed in the Gastric Mucosa after *Helicobacter pylori* Eradication[J]. *Digestion*, 2018, 98(1): 48-55.
- [17] Mansour-Ghanaei F, Joukar F, Yeganeh S, et al. OLGA- and OLGIM-Based Staging in the Patients with Gastritis and Endoscopy Indications[J]. *Turk J Gastroenterol*, 2022, 33(2): 95-102.
- [18] 加藤元嗣.京都胃炎分类[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2018:27-30.
- [19] Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma: 3rd English edition[J]. *Gastric Cancer*, 2011, 14(2): 101-12.
- [20] 中华医学会消化病学分会,中华医学会消化病学分会消化系统肿瘤协作组. 中国慢性胃炎诊治指南(2022年, 上海)[J].*中华消化杂志*, 2023, 43(3): 145-175.
- [21] Rugge M, Genta RM, Fassan M, et al. OLGA Gastritis Staging for the Prediction of Gastric Cancer Risk: A Long-term Follow-up Study of 7436 Patients[J]. *Am J Gastroenterol*, 2018, 113(11): 1621-1628.
- [22] Yue H, Shan L, Bin L. The significance of OLGA and OLGIM staging systems in the risk assessment of gastric cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Gastric Cancer*, 2018, 21(4): 579-587.
- [23] Pimentel-Nunes P, Libânio D, Marcos-Pinto R, et al. Management of epithelial precancerous conditions and lesions in the stomach (MAPS II): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE), European *Helicobacter* and Microbiota Study Group

- (EHMSG), European Society of Pathology (ESP), and Sociedade Portuguesa de Endoscopia Digestiva (SPED) guideline update 2019[J]. *Endoscopy*, 2019, 51(4): 365-388.
- [24] Thrift AP, El-Serag HB. Burden of Gastric Cancer[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020,18(3): 534-542.
- [25] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [26] Luo G, Zhang Y, Guo P, et al. Global patterns and trends in stomach cancer incidence: Age, period and birth cohort analysis[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(7): 1333-1344.
- [27] 刘陆雪.上海老年人口就医行为的性别差异研究[D].华东师范大学, 2019.
- [28] 桂世勋.关注男性人口的健康长寿[J].*人口研究*, 2002(03): 64-69.
- [29] Kishino M, Nakamura S, Shiratori K. Clinical and Endoscopic Features of Undifferentiated Gastric Cancer in Patients with Severe Atrophic Gastritis[J]. *Intern Med*. 2016, 55(8): 857-62.
- [30] 吕东,孙少鹏,吕宾.内镜评估胃癌发生风险的研究现状[J].*胃肠病学*, 2022, 27(12): 759-763.
- [31] 邹龙.早期胃癌及癌前病变的体液诊断与内镜诊断[D].北京协和医学院, 2021.
- [32] Kanesaka T, Uedo N, Yao K, et al. Multiple convex demarcation line for prediction of benign depressed gastric lesions in magnifying narrow-band imaging[J]. *Endosc Int Open*, 2018, 6(2): E145-E155.
- [33] You WC, Blot WJ, Li JY, et al. Precancerous gastric lesions in a population at high risk of stomach cancer[J]. *Cancer Res*, 1993, 53(6): 1317-21.
- [34] Kato I, Tominaga S, Ito Y, et al. A prospective study of atrophic gastritis and stomach cancer risk[J]. *Jpn J Cancer Res*, 1992, 83(11):1137-42.
- [35] Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, et al. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994[J]. *Am J Surg Pathol*, 1996, 20(10): 1161-81.

- [36] Zhang M, Liu S, Hu Y, et al. Biopsy strategies for endoscopic screening of pre-malignant gastric lesions[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 14909.
- [37] 日本《胃与肠》编委会编著.胃、十二指肠内镜放大观察的基础与最新见解[M].沈阳:辽宁科学技术出版社, 2022: 49.
- [38] Kanemitsu T, Yao K, Nagahama T, et al. The vessels within epithelial circle (VEC) pattern as visualized by magnifying endoscopy with narrow-band imaging (ME-NBI) is a useful marker for the diagnosis of papillary adenocarcinoma: a case-controlled study[J]. *Gastric Cancer*, 2014, 17(3):469-77.
- [39] 叶王宇,张忠绵,廖翊如,等.幽门螺杆菌既往感染胃癌前状态的中医证候学特点探究[J].*安徽中医药大学学报*, 2022, 41(05): 37-42.
- [40] 张希颜,张忠绵,叶王宇,等.Hp 既往感染胃癌前病变的证型判别分析[J].*北京中医药*, 2023, 42(07): 795-798.
- [41] 李亚可,方俐晖,张轶斐,等.从“因热生毒”探讨慢性萎缩性胃炎炎癌转化机制[J].*北京中医药*, 2022, 41(03): 285-289.
- [42] 张忠绵,黄佳钦,贺柏翔,等.参白颗粒对胃癌前病变患者胃黏膜上皮细胞自噬与凋亡的调控作用[J].*北京中医药大学学报*, 2022, 45(10): 1052-1059.
- [43] Ye W, Takabayashi H, Yang Y, et al. Regulation of Gastric Lgr5+ve Cell Homeostasis by Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and Inflammatory Stimuli[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(4): 523-538.
- [44] Leushacke M, Tan SH, Wong A, et al. Lgr5-expressing chief cells drive epithelial regeneration and cancer in the oxyntic stomach[J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(7): 774-786.
- [45] Sigal M, Rothenberg ME, Logan CY, et al. Helicobacter pylori Activates and Expands Lgr5(+) Stem Cells Through Direct Colonization of the Gastric Glands[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(7): 1392-404.e21.
- [46] Jang BG, Lee BL, Kim WH. Distribution of LGR5+ cells and associated implications during the early stage of gastric tumorigenesis[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82390.
- [47] Sato T, van Es JH, Snippert HJ, et al. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 415-8.

- [48] van Es JH, Wiebrands K, López-Iglesias C, et al. Enteroendocrine and tuft cells support Lgr5 stem cells on Paneth cell depletion[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(52): 26599-26605.
- [49] Zhang M, Hu S, Min M, et al. Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing[J]. Gut, 2021, 70(3): 464-475.
- [50] Wizenty J, Müllerke S, Kolesnichenko M, et al. Gastric stem cells promote inflammation and gland remodeling in response to Helicobacter pylori via Rspo3-Lgr4 axis[J]. EMBO J, 2022, 41(13): e109996.
- [51] Sigal M, Reinés MDM, Müllerke S, et al. R-spondin-3 induces secretory, antimicrobial Lgr5⁺ cells in the stomach[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(7): 812-823.
- [52] He XX, Yang J, Ding YW, et al. Increased epithelial and serum expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in gastric cancer: potential role of MIF in gastric carcinogenesis[J]. Gut, 2006, 55(6): 797-802.
- [53] Beswick EJ, Pinchuk IV, Suarez G, et al. Helicobacter pylori CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events[J]. J Immunol, 2006, 176(11): 6794-801.
- [54] Alizadeh SR, Ebrahimzadeh MA. Quercetin derivatives: Drug design, development, and biological activities, a review[J]. Eur J Med Chem, 2022, 229: 114068.
- [55] Zhang S, Huang J, Xie X, et al. Quercetin from Polygonum capitatum Protects against Gastric Inflammation and Apoptosis Associated with Helicobacter pylori Infection by Affecting the Levels of p38MAPK, BCL-2 and BAX[J]. Molecules, 2017, 22(5): 744.
- [56] 韩宁馨,孙雅丽,盛帅,等.木犀草素对氧化应激和炎症的调控机制[J].动物营养学报, 2022, 34(05): 2856-2861.
- [57] Yeon MJ, Lee MH, Kim DH, et al. Anti-inflammatory effects of Kaempferol on Helicobacter pylori-induced inflammation[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2019, 83(1): 166-173.

- [58] Quílez A, Berenguer B, Gilardoni G, et al. Anti-secretory, anti-inflammatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of several fractions isolated from *Piper carpubya* Ruiz & Pav[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3): 583-9.
- [59] Bae S, Lim JW, Kim H. β -Carotene Inhibits Expression of Matrix Metalloproteinase-10 and Invasion in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells[J]. *Molecules*, 2021, 26(6): 1567.
- [60] Matsuzawa-Ishimoto Y, Shono Y, Gomez LE, et al. Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium[J]. *J Exp Med*, 2017, 214(12):3687-3705.
- [61] Burger E, Araujo A, López-Yglesias A, et al. Loss of Paneth Cell Autophagy Causes Acute Susceptibility to *Toxoplasma gondii*-Mediated Inflammation. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(2):177-190.e4.
- [62] Pott J, Kabat AM, Maloy KJ. Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice[J]. *Cell Host Microbe*, 2018, 23(2):191-202.e4.
- [63] Zhu X, Messer JS, Wang Y, et al. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(3):1098-1110.
- [64] Chuang YC, Su WH, Lei HY, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5):e37613.
- [65] 王礼. 幽门螺杆菌感染中空泡毒素 VacA 诱导胃黏膜上皮细胞线粒体自噬的分子机制[D]. 兰州大学, 2022.
- [66] Capurro MI, Prashar A, Jones NL. MCOLN1/TRPML1 inhibition a novel strategy used by *Helicobacter pylori* to escape autophagic killing and antibiotic eradication therapy *in vivo*[J]. *Autophagy*, 2020, 16(1):169-170.
- [67] Raju D, Hussey S, Ang M, et al. Vacuolating cytotoxin and variants in Atg16L1 that disrupt autophagy promote *Helicobacter pylori* infection in humans[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(5):1160-71.

- [68] Courtois S, Haykal M, Bodineau C, et al. Autophagy induced by Helicobacter pylori infection is necessary for gastric cancer stem cell emergence[J]. Gastric Cancer, 2021, 24(1):133-144.
- [69] Leung WK, Yu J, To KF, et al. Apoptosis and proliferation in Helicobacter pylori-associated gastric intestinal metaplasia[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2001, 15(9):1467-72.
- [70] Lei Y, Zhang D, Yu J, et al. Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy. Cancer Lett, 2017, 1;393:33-39.
- [71] Pan H, Cai N, Li M, et al. Autophagic control of cell 'stemness'[J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(3):327-31.