

# 黄芩-黄连药对治疗幽门螺杆菌相关性消化性溃疡的核心基因与关键 microRNA 筛选研究

陈新怡<sup>1,2</sup>, 宋厚盼<sup>1,2\*</sup>, 陈小娟<sup>1,2</sup>, 曾梅艳<sup>2</sup>, 杨 焘<sup>3</sup>, 林 也<sup>1</sup>, 刘恒铭<sup>3</sup>, 冯 瑶<sup>3</sup>

<sup>1</sup>湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室; <sup>2</sup>湖南中医药大学中医学学院; <sup>3</sup>湖南中医药大学医学院, 长沙 410208

**摘要:**本研究旨在应用网络药理学和生物信息学方法探讨黄芩-黄连药对 (SRCR) 治疗幽门螺杆菌 (Hp) 相关性消化性溃疡 (PU) 的分子网络调控机制, 并筛选出其作用的核心基因和关键 microRNA。首先通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 检索 SRCR 的主要活性成分和可能的作用靶点; 从 GEO 数据库获取 GSE70394 基因表达谱数据, 采用 R 软件对 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞 (GES) 涉及差异表达基因 (DEG) 的芯片数据进行均一化处理, 并绘制 DEG 火山图和聚类热图; 再通过 STRING 数据库构建 SRCR 成分靶点与 Hp 感染人 GES 细胞 DEG 的蛋白交互网络; 运用 DAVID 数据库对上述特征性基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析; 然后利用 Cytohubba 筛选出 SRCR 治疗 Hp 相关性 PU 涉及的核心基因; 采用 TargetScan 和 miRBase 数据库对调控核心基因的关键 microRNA 进行预测。最终在 TCMSP 中共检索到 SRCR 的 41 个主要活性成分和 216 个可能的作用靶点。GEO 芯片数据质量良好, 以  $P < 0.05$  和  $|\log FC| \geq 2$  为筛选条件, 共获得 128 个 Hp 感染人 GES 细胞的 DEG, 其中上调基因 77 个, 下调基因 51 个。取交集网络得到 SRCR 治疗 HpPU 的特征性基因靶点 127 个。对这些靶点进行 GO 分析发现, 生物学过程涉及炎症反应、免疫反应等 55 个条目; 细胞组分包含细胞外空间、外泌体、细胞核等 11 个条目; 分子功能包含生长因子活性、表皮生长因子受体结合等 15 个条目。KEGG 结果显示细胞因子受体相互作用通路、NOD 样受体信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路等 33 条信号通路与 SRCR 治疗 Hp 相关性 PU 密切相关。经 Cytohubba 筛选得到 CXCL8、IL10、IL1B 等十个 SRCR 调控的核心基因。进一步筛选得到 miR-93-5p、miR-374b-5p、miR-3937 等十个 SRCR 调控的最具功能性的 microRNA。上述结果表明, SRCR 治疗 HpPU 具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点, SRCR 可通过调控编码 RNA (基因) 和非编码 RNA (microRNA) 发挥其抗 HpPU 的效应。

**关键词:**黄芩; 黄连; 幽门螺杆菌; 网络药理学; 基因; microRNA

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2020)9-1456-14

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2020.9.002

## Screening of core genes and key microRNAs in the treatment of *Helicobacter pylori* related peptic ulcer by *Scutellariae Radix* and *Coptidis Rhizoma*

CHEN Xin-yi<sup>1,2</sup>, SONG Hou-pan<sup>1,2\*</sup>, CHEN Xiao-juan<sup>1,2</sup>, ZENG Mei-yan<sup>2</sup>,  
YANG Tao<sup>3</sup>, LIN Ye<sup>1</sup>, LIU Heng-ming<sup>3</sup>, FENG Yao<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Hunan Provincial Key Laboratory of Diagnostic Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>Faculty of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine;

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract:** The aim of this study was to explore the molecular network regulation mechanism of *Coptidis Rhizoma* and *Scutellariae Radix* (SRCR) on treatment of *Helicobacter pylori* (Hp) associated peptic ulcer (PU) based on network pharmacology and bioinformatics methods, and to screen out the core genes and key microRNAs. Firstly, the main active ingredients and possible targets of SRCR were retrieved through the Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). GSE70394 gene expression profile data was downloaded from the GEO database. The microarray data of differenti-

收稿日期: 2020-05-06 接受日期: 2020-08-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81703920); 湖南省自然科学基金 (2019JJ50442); 湖南省教育厅科学研究项目 (19C1426); 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划 (201908)

\* 通信作者 Tel: 86-731-88459435; E-mail: hpsong2015@126.com

ally expressed genes in Hp infected human gastric epithelial cells were homogenized by R software, and the volcano map and cluster heat map of differentially expressed genes were drawn. Secondly, STRING database was used to construct the protein interaction network between SRCR component target and Hp- infected human GES cells. The functions of GO and the enrichment of KEGG pathways of the above-mentioned characteristic genes were analyzed by DAVID database. Then, the core genes involved in the treatment of Hp related PU by SRCR were screened out by cytohubba plug-in unit. The key microRNAs regulating the core genes were predicted by using the TargetScan and miRBase databases. Finally, 41 active components and 216 potential targets of SRCR were retrieved. The quality of GEO chip data was good. With  $P < 0.05$  and  $|\log_{2}FC| \geq 2$  as the screening conditions, 128 differentially expressed genes were obtained, including 77 up-regulated genes and 51 down-regulated genes. 127 characteristic gene targets were further obtained for the treatment of HpPU by SRCR. Go analysis of these targets showed that the biological process involved 55 items such as inflammatory response, immune response, etc. Cell components included 11 items such as extracellular space, exosomes, nuclei, etc. Molecular functions included 15 items such as growth factor activity, epidermal growth factor receptor binding, etc. KEGG results showed that 33 signaling pathways, including cytokine receptor interaction pathway, nod like receptor signaling pathway, NF- $\kappa$ B signaling pathway, etc. were closely related to the treatment of Hp related PU by SRCR. Ten core genes regulated by SRCR, such as CXCL8, IL10, IL1B, etc. were screened out by cytohubba. Ten of the most functional microRNAs, such as mir-93-5p, mir-374b-5p, mir-3937, etc. which may be regulated by SRCR, were further screened out. The above results indicate that the treatment of HpPU with SRCR has the characteristics of multi-component, multi-target, and multi-channel synergy. SRCR can exert its therapeutic effect on HpPU by regulating the coding RNA (gene) and non-coding RNA (microRNA).

**Key words:** Scutellariae Radix; Coptidis Rhizoma; *Helicobacter pylori*; network pharmacology; gene; microRNA

消化性溃疡(peptic ulcer, PU)是临床最常见的消化系统疾病之一,好发于胃与十二指肠,PU 发病率在不同国家和地区存在一定差异,研究表明全世界人群中约有 5% ~ 10% 的人在其一生中曾患过消化性溃疡。临床资料显示,我国胃镜检查病例中消化性溃疡病患者占 10.3% ~ 32.6%<sup>[1]</sup>。多数 PU 患者的典型症状表现为中上腹反复发作的节律性疼痛;部分患者症状缺乏特异性,表现为上腹胀满、厌食、反酸等胃肠道症状;少数患者则以上消化道出血、穿孔等 PU 并发症作为主要症状<sup>[2]</sup>。随着我国经济水平增长,人们生活质量提高和工作节奏加快,PU 的发病率越来越高,给患者的身心健康和带生活质量带来严重影响。

自 1983 年澳大利亚学者 Warren 和 Marshall 从患者胃黏膜活检标本中分离出幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)后, Hp 被证实与 PU 的发生、发展与复发密切相关。因 Hp 感染引发的消化性溃疡亦称为 Hp 相关性 PU。采用抗生素抗菌治疗联合质子泵抑制剂抑酸治疗是当前治疗 Hp 相关性 PU 的基本手段。但随着抗生素的广泛应用,国内 Hp 对克拉霉素、甲硝唑和左氧氟沙星的耐药率呈逐年上升趋势,导致三联疗法对 Hp 的根除率下降甚至失败<sup>[3]</sup>。目前我国推荐治疗 Hp 相关性 PU 的首选方案为疗程 10 或 14 天的铋剂四联疗法,该法亦存在抗生素耐药性增高、不良反应大、患者依从性低、经

济负担重等问题。因此,运用中医药疗法拓展 Hp 相关性 PU 的治疗方案是消化内科研究的热点之一。

中医学认为, Hp 相关性 PU 可归属于“胃脘痛”“吞酸”“嘈杂”等范畴<sup>[5]</sup>,基本病机为邪毒内犯,正虚邪实,气机升降失调。Hp 属于“邪气”范畴,多具有热、毒的病理性质,由其引发的溃疡多表现为湿热证候,清热化湿解毒法是治疗 Hp 相关性 PU 的重要治法之一<sup>[4]</sup>。黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. (亦称味连)、三角叶黄连 *C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao (亦称雅连)或云连 *C. teeta* Wall. 的干燥根茎,性寒味苦,归心、脾、胃、大肠经,具有清热燥湿、泻火解毒的功效。黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根,性寒味苦,归肺、胆、脾、大肠、小肠经,具有清热燥湿、泻火解毒、凉血止血的功效。由黄芩-黄连(Scutellariae Radix-Coptidis Rhizoma, SRCR)组成的药对是中医临床经典的清热解毒药对之一,两者常相须配伍治疗 Hp 相关性 PU,具有确切的临床疗效,但现有的报道尚缺乏系统整体地阐述其活性成分、作用靶点、信号通路等分子网络调控机制的研究。

网络药理学是一种融合了生物信息学、系统生物学、计算机网络分析技术等多门学科理论的新型药物研究模式,可从整体生物网络稳态的角度探究药物与疾病之间的作用关系<sup>[5]</sup>。网络药理学所呈

现的整体性、系统性特点与中医整体观、辨证论治和中药配伍的原则不谋而合。本研究采用网络药理学和生物信息学方法,对黄芩-黄连药对多成分、多靶点、多通路的特点进行分析,基于核心基因和关键 microRNA 探究其治疗 Hp 相关性 PU 的分子网络调控机制,旨在为其应用于 Hp 相关性 PU 的临床治疗提供科学依据,为后续深入的实验研究提供思路和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 黄芩-黄连药对化学成分の搜集与筛选

登陆中药系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),分别以黄芩、黄连为关键词,检索两味中药的全部化学成分数据。根据药物代谢动力学特点,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  和类药性(drug like, DL)  $\geq 0.18$  为筛选条件<sup>[6]</sup>,对搜集的化学成分进行初步筛查,以获取黄芩-黄连药对活性较高的化学成分。

### 1.2 黄芩-黄连药对活性成分靶点预测与“药物-成分-靶点”网络构建

根据黄芩-黄连药对的活性成分,利用 TCMSP 数据库的靶点预测模型获取其潜在作用靶点。将靶点名称转换为标准基因名后,剔除重复靶点和无对应靶点的活性成分。采用网络图像化软件 Cytoscape 3.7.0 (<http://www.cytoscape.org/>)对上述获得的活性成分和靶点之间的关系进行构建与分析,获取黄芩-黄连药对的“药物-成分-靶点”网络。网络中“节点”(node)表示药物、成分和靶点,“边”(edge)表示药物与成分及成分与靶点之间存在的相互作用关系。

### 1.3 Hp 感染胃黏膜上皮细胞的芯片数据采集

GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)是隶属于美国国立卫生研究院生物技术信息中心(NCBI)的世界最大、最全面的公共基因表达数据库之一。在 GEO 数据库中輸入检索词“*Helicobacter pylori*”,获得 2 647 条结果,其中人类的基因芯片共 670 条,选取基因表达谱数据集 GSE70394,所属实验平台为 GPL6480<sup>[7]</sup>。该数据集包括 3 例 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞样本(编号分别为 GSM1726498、GSM1726500、GSM1726502)以及 3 例正常人胃黏膜上皮细胞样本(编号分别为 GSM1726497、GSM1726499、GSM1726501)。

### 1.4 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞与正常胃黏膜上皮细胞的差异表达基因筛选

在 R 软件的 Rstudio 中加载 GEOquery、limma、Biobase、gplots、ggbiplot、stringr 等程序包,对芯片数据进行均一化处理后,获取 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞与正常胃黏膜上皮细胞全部的差异表达基因,以  $P < 0.05$  且  $|\log_{2}FC| \geq 1$  筛选全部差异表达基因,绘制基因转录谱火山图;以  $P < 0.01$  且  $|\log_{2}FC| \geq 2$  为筛选条件进一步获取 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞与正常胃黏膜上皮细胞的显著性差异表达基因,绘制层次聚类热图。

### 1.5 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的蛋白互作网络(PPI)构建与分析

STRING (V11.0) 数据库 (<https://string-db.org/>)可在线分析蛋白质与蛋白质直接或间接的相互作用关系并绘制蛋白质互作网络(PPI)。覆盖面广泛的 STRING 现已储存 5 090 个物种,2.46 亿种蛋白和 20 亿个互作关系信息。将黄芩-黄连药对活性成分作用的靶点和 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞与正常胃黏膜上皮细胞的显著性差异表达基因分别导入至 STRING 数据库中进行 PPI 绘制。运用 Cytoscape 将上述得到的两个 PPI 融合后提取交集 PPI,得到黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的 PPI 网络,进一步通过该网络提取黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的特征性基因靶点。

### 1.6 基因本体(GO)功能富集分析

基因本体论(Gene Ontology, GO)主要从生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三个方面对各物种的基因和蛋白功能进行界定和描述。DAVID v6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)是一个整合的生物学数据分析工具,可为大规模的基因或蛋白列表提供系统综合的生物功能注释信息。本研究采用 DAVID(6.8 版本)数据库对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU PPI 网络中的靶点蛋白进行 GO 富集分析。

### 1.7 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析是一种阐明靶点蛋白在信号传导通路中作用的常用分析方法。本研究采用 DAVID(6.8 版本)数据库对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU PPI 网络中的靶

点蛋进行 KEGG 通路富集分析,旨在从信号通路层面探究黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的分子机制。

### 1.8 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 核心基因分析

Cytoscape 中的 CytoHubba 插件提供了多种根据网络特征对网络中节点进行排序的拓扑分析方法,被广泛运用于生物网络中核心节点的筛选。其中, MCC 算法(maximal clique centrality)是一种常用的对 PPI 网络中关键蛋白靶点预测精度较高的方法。本研究所述的 Hub 基因是指黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU PPI 网络中的核心基因。这些核心基因对网络的稳定性起重要作用,可能是黄芩-黄连药对发挥效应所调控的核心靶点。

### 1.9 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 调控的关键 microRNA 预测分析

TargetScan 数据库([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/))和 starBase 数据库(<http://starbase.sysu.edu.cn/>)可分析单个 microRNA 的多个靶基因和分析靶向单个基因的多个 microRNA,二者均为目前使用频率最高的 microRNA 在线预测分析数据库。本研究为进一步探索 microRNA 对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 核心基因的调控作用,故采用 TargetScan 和 starBase 数据库对靶向关键基因的 microRNA 进行预测。输入 Hub 基因后分别检索上述数据库,选择最具代表性的转录本,得到在保守位点结合的 microRNA。对这些 microRNA 进行筛选,保留 seed match 为 8mer 的 microRNA。运用 Cytoscape 对筛选得到的 microRNA 和其靶向核心基因之间的

关系网络进行构建与分析,获得“microRNA-核心基因”网络;根据 Context score percentile 值的高低预测黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 过程可能调控的最具功能性的关键 microRNA。

## 2 结果

### 2.1 黄芩-黄连药对活性成分靶点预测与“药物-成分-靶点”网络构建

基于 TCMSP 数据库获取的靶点预测数据,剔除无靶点对应的活性成分和重复靶点后,共获得黄芩-黄连药对的 41 个活性成分和 216 个基因靶点。41 个活性成分中有 32 个化学成分来源于黄芩,11 个化学成分来源于黄连,两者共有的活性成分为 MOL001458(黄连碱)和 MOL002897(表小檗碱)。具体的活性成分信息见表 1。

将黄芩-黄连药对活性成分和靶点导入 Cytoscape 3.7.0 中,获得“药物-成分-靶点”网络图(图 1)。图中共含有 259 个节点(2 个药物、41 个成分、216 个靶点),764 条边线,黄色节点表示药物,深蓝色节点表示活性成分,浅蓝色节点表示对应的靶点,黑色边线代表药物与成分及成分与靶点之间的关系。

结果显示,黄芩-黄连药对中有 39 个活性成分可作用于多个基因靶点,其中 63.4%的(26 个)活性成分可作用于 10 个以上的靶点。同一个靶点亦可被多个活性成分调控,40.7%的(101 个)靶点对应 2 个以上的活性成分,35.6%的(77 个)靶点被分别来自黄芩和黄连的活性成分共同调控,提示了黄芩-黄连药对相须合用配伍、成分复杂、靶点多样的作用机制特点。

表 1 黄芩-黄连药对活性成分的基本信息

Table 1 Basic information of active ingredients of SRCR

TCMSP 编码 MOL ID	化学成分 Molecule name	口服生物 利用度 OB(%)	类药性 DL	来源 Source	靶点数 Target No.
MOL000173	汉黄芩素 Wogonin	30.68	0.23	黄芩	44
MOL002714	黄芩素 Baicalein	33.52	0.21	黄芩	36
MOL000358	$\beta$ -谷甾醇 Beta-sitosterol	36.91	0.75	黄芩	35
MOL000449	豆甾醇 Stigmasterol	43.83	0.76	黄芩	29
MOL001689	金合欢素 Acacetin	34.97	0.24	黄芩	25
MOL002928	千纸层素 A Oroxylin A	41.37	0.23	黄芩	25
MOL008206	5-羟基-7,8-二甲氧基黄酮 Moslosooflavone	44.09	0.25	黄芩	22
MOL012266	半枝莲种素 Rivularin	37.94	0.37	黄芩	21
MOL000228	(2R)-7-羟基-5-甲氧基-2-苯基苯并吡喃-4-酮(2R)-7-Hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.2	黄芩	20

续表 1 (Continued Tab. 1)

TCMSP 编码 MOL ID	化学成分 Molecule name	口服生物 利用度 OB (%)	类药性 DL	来源 Source	靶点数 Target No.
MOL000552	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮 5,2'-Dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	31.71	0.35	黄芩	20
MOL002927	黄芩黄酮 II Skullcapflavone II	69.51	0.44	黄芩	20
MOL002934	黄芩新素 Neobaicalein	104.34	0.44	黄芩	20
MOL002915	三裂鼠尾草素 Salvigenin	49.07	0.33	黄芩	17
MOL002917	5,2',6'-三羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮 5,2',6'-Trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	45.05	0.33	黄芩	17
MOL002933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮 5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavone	36.56	0.27	黄芩	17
MOL002932	黄芩黄酮 I Panicolin	76.26	0.29	黄芩	14
MOL000525	5,7,8-三羟基黄酮 Norwogonin	39.4	0.21	黄芩	11
MOL002909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮 5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	33.82	0.45	黄芩	11
MOL002937	二氢木蝴蝶素 A Dihydrooroxilin A	66.06	0.23	黄芩	10
MOL002914	香茅醇 Eriodyctiol	41.35	0.24	黄芩	7
MOL002925	5,7,2',6'-四羟基黄酮 5,7,2',6'-Tetrahydroxyflavone	37.01	0.24	黄芩	5
MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄酮 5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavanone	36.63	0.27	黄芩	5
MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮 5,7,4'-Trihydroxy-8-methoxyflavanone	74.24	0.26	黄芩	5
MOL000073	表儿茶素 ent-Epicatechin	48.96	0.24	黄芩	3
MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75	黄芩	3
MOL002879	邻苯二甲酸二异辛酯 Diop	43.59	0.39	黄芩	3
MOL002910	红花素 Carthamidin	41.15	0.24	黄芩	3
MOL002913	二氢黄芩素 Dihydrobaicalin	40.04	0.21	黄芩	3
MOL001490	双[(2S)-2-乙基己基]苯 1,2-二羧酸酯 Bis[(2S)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	43.59	0.35	黄芩	1
MOL010415	11,13-二十碳二烯酸甲酯 11,13-Eicosadienoic acid, methyl ester	39.28	0.23	黄芩	1
MOL000098	槲皮素 Quercetin	46.43	0.28	黄连	145
MOL002903	四氢小檗碱 (R)-Canadine	55.37	0.77	黄连	30
MOL002904	小檗浸碱 Berlambine	36.68	0.82	黄连	19
MOL000785	黄藤素 Palmatine	64.6	0.65	黄连	17
MOL001454	黄连素 Berberine	36.86	0.78	黄连	16
MOL002894	小檗红碱 Berberrubine	35.74	0.73	黄连	12
MOL002897	表小檗碱 Epiberberine	43.09	0.78	黄连、黄芩	10
MOL001458	硫酸黄连碱 Coptisine	30.67	0.86	黄连、黄芩	9
MOL002668	甲基黄连碱 Worenine	45.83	0.87	黄连	6
MOL000622	广玉兰内酯 Magnograndiolide	63.71	0.19	黄连	4
MOL002907	黄麻苷 A Corchoroside A	104.95	0.78	黄连	2

## 2.2 芯片数据均一化处理

采用 R 软件对基因表达谱数据集 GSE70394 进行标准正态化处理,绘制芯片数据相对表达值(relative expression value)的小提琴图(图 2)。小提琴图的横坐标代表各样本编号,纵坐标代表各样本相对

表达值。各小提琴中的粗黑色条表示四分位数的范围,中间的白点表示中位数,延伸的细黑色线表示 95% 置信区间。图 2 结果显示 6 个样本的中位数基本位于一条水平直线上(7.8 左右),表明芯片数据质量良好,没有异常值,呈现出相对稳定性,适用于

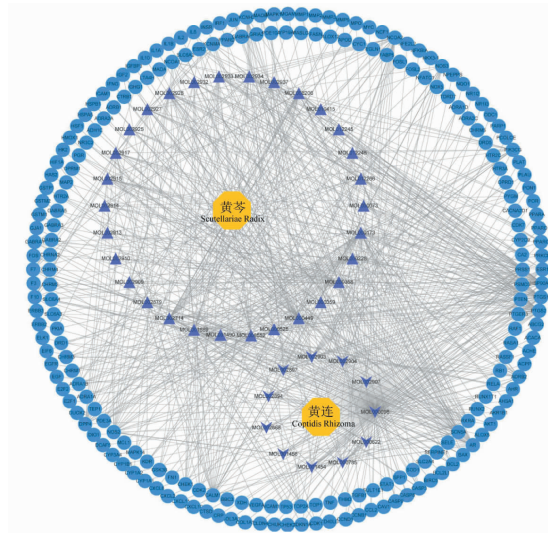


图1 黄芩-黄连药对“药物-成分-靶点”网络图

Fig. 1 Network diagram of “drug-component-target” of SRCR

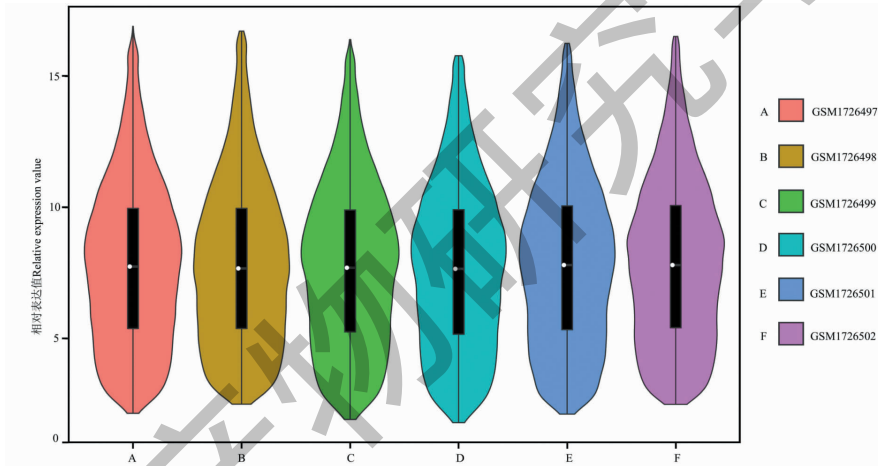


图2 标准化后 GSE70394 各样本基因表达值的小提琴图

Fig. 2 Violin map of gene expression values of GSE70394 samples after standardization

Hp 感染人胃黏膜上皮细胞于正常胃黏膜上皮细胞差异表达基因的后续分析。

### 2.3 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞与正常胃黏膜上皮细胞差异表达基因分析

通过分析基因表达谱 GSE70394 中 Hp 感染组和正常组芯片数据,共筛选出差异表达基因 30 103 个。以  $P < 0.05$ ,  $|\log_{2}FC| \geq 1$  为初步筛选条件,共获得 1371 个差异表达基因,其中上调基因 694 个,下调基因 677 个。图 3 为 Hp 感染组与正常胃黏膜上皮细胞差异表达基因的火山图,图中纵坐标为  $-\log_{10}(P \text{ value})$  值,横坐标为  $\log_{2}(\text{fold change})$  值。图中每一个点代表一个基因,红色为显著上调表达的基因,绿色为显著下调表达的基因,该图反映了 Hp 感染胃黏膜上皮细胞与正常胃黏膜上皮细胞

差异表达基因的总分布情况。

### 2.4 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞与正常胃黏膜上皮细胞显著性差异表达基因筛选

设定筛选条件为  $P < 0.01$  且  $|\log_{2}FC| \geq 2$ ,共得到 Hp 感染组与正常组胃黏膜上皮细胞显著性差异表达基因 128 个,其中显著性上调表达基因 77 个,显著性下调表达基因 51 个。图 4 为 Hp 感染与正常胃黏膜上皮细胞显著性差异表达基因的层次聚类热图,图中每个小方格表示一个基因,颜色深浅表示该基因表达量的高低,表达量越大颜色越深,红色表示上调基因,绿色表示下调基因。热图的右侧为基因名,每一行代表同一个基因在不同样本中的表达值,每一列代表一个样本中的所有显著性表达基因。其中  $\log_{2}FC$  最大的五个基因为 IL24、UBD、

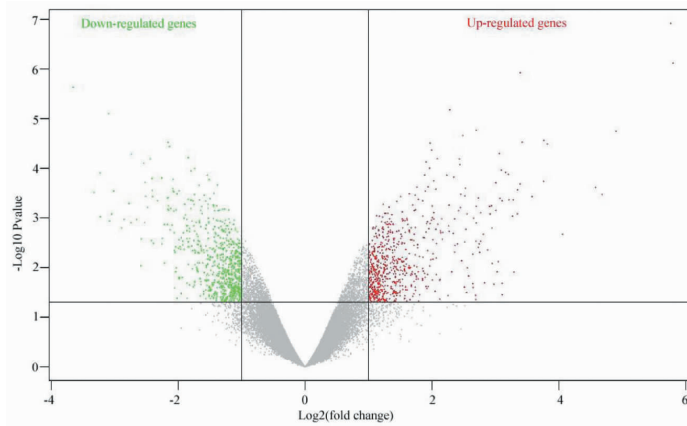


图3 Hp 感染组和正常组胃黏膜上皮细胞差异表达基因火山图

Fig. 3 Volcanic map of differentially expressed genes in gastric epithelial cells of Hp infected group and normal group

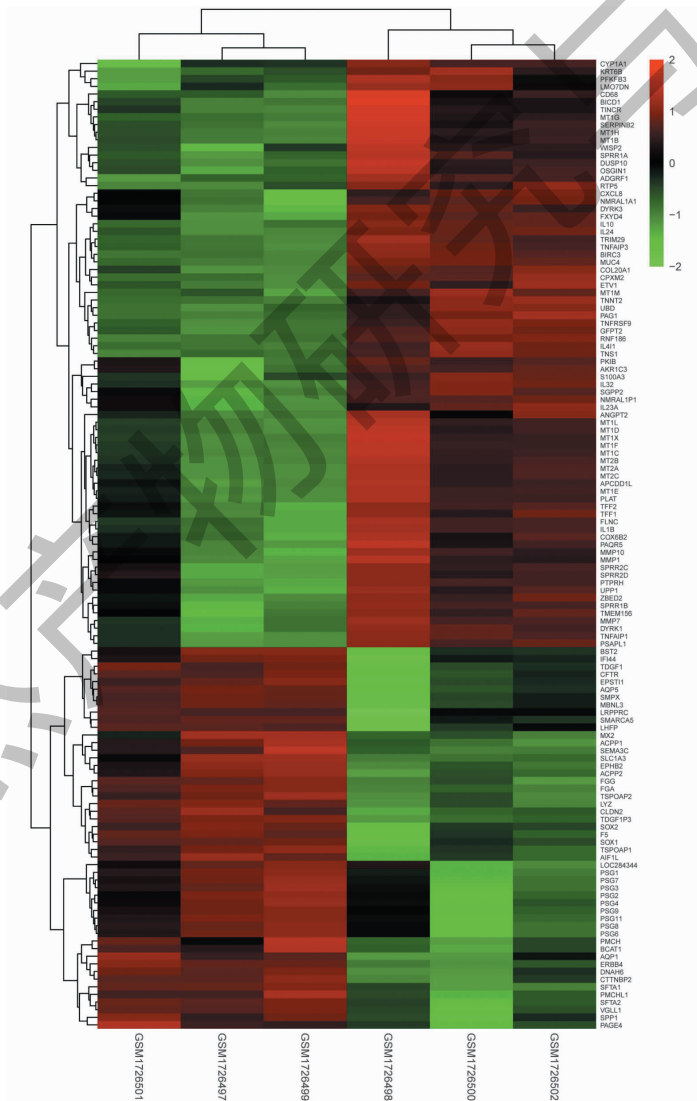


图4 Hp 感染组与正常组胃黏膜上皮显著性差异表达基因聚类热图

Fig. 4 Hierarchical clustering heatmap of differentially expressed genes in gastric mucosa epithelium of Hp infected group and normal group

CYP1A1、IL1B、MMP10, logFC 最小的五个基因为 ANXA9、DUSP4、SOX9-AS1、PFKFB3、ST3GAL5。

## 2.5 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的蛋白互作网络(PPI)分析结果

黄芩-黄连药对活性成分直接或间接作用靶点的 PPI 网络包含 1 463 个基因;Hp 感染人胃黏膜上皮细胞的显著性差异表达基因 PPI 网络涉及基因靶点 550 个;通过 Cytoscape 软件将以上 2 个 PPI 网络

融合提取交集,得到黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的特异性 PPI 网络,该网络含有 127 个特征性基因靶点和 464 条蛋白互作关系。依据网络节点的拓扑属性 degree 值对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的 PPI 作图,圆形节点面积越大,颜色越深,则显示其 degree 值越大。网络中的节点 degree 最大值为 40,最小值为 1,平均值为 7.3(图 5)。

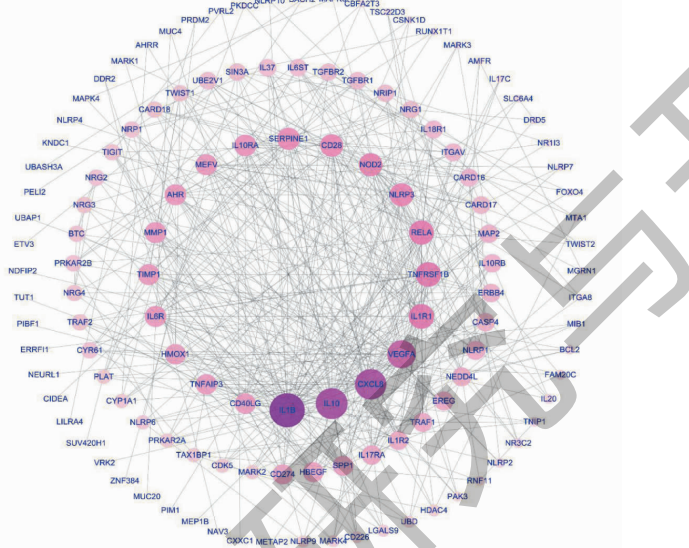


图 5 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 特异性作用靶点的 PPI 网络

Fig. 5 PPI network of specific targets of SRCR in the treatment of Hp related PU

## 2.6 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 特异性基因的 GO 功能富集分析

利用 DAVID 数据库对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的特征性基因进行 GO 功能富集分析,共获得 81 条富集结果。生物学过程相关条目 55 个,主要涉及对细胞因子的反应、蛋白激酶活性的正调节、炎症反应、免疫反应、外源性凋亡信号途径的负调节、细胞增殖的负调节、NF- $\kappa$ B 转录因子活性的正调节、细胞凋亡过程的负调节等方面。细胞组分相关条目 11 个,主要涉及细胞外空间、外泌体、细胞核、细胞质、黏着斑等方面。分子功能相关条目 15 个,主要涉及生长因子活性、表皮生长因子受体结合、ATP 结合、细胞外基质结合、锌离子结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性以及细胞因子活性等方面。图 6 显示了生物学过程、细胞组分和分子功能中  $-\log_{10} P$  value 值前 10 的相关条目。

## 2.7 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 特异性基因的 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对黄芩-黄连药对治疗 Hp

相关性 PU 的特异性基因进行 KEGG 通路富集分析,共获得 33 条富集结果。表 2 列出了与黄芩-黄连抗 Hp 感染密切相关的信号通路,主要包括细胞因子-细胞因子受体相互作用通路、NOD 样受体信号通路、细胞粘附分子、ErbB 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、Jak-STAT 信号通路、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、T 细胞受体信号通路、PI3K-Akt 信号通路、与癌症发生相关的信号通路、癌症中转录失调相关通路等。其中最具显著性意义的三条信号通路分别为细胞因子-细胞因子受体相互作用通路、NOD 样受体信号通路、细胞粘附分子信号通路。涉及基因数最多的信号通路为细胞因子-细胞因子受体相互作用通路。

## 2.8 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 关键靶点分析结果

运用 Cytoscape 的 MCC 算法对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 特异性基因 PPI 网络进行分析,筛选出其治疗 Hp 相关性 PU 的 10 个关键靶点,分别为 CXCL8、IL10、IL1B、IL1R1、TNFRSF1B、IL6R、



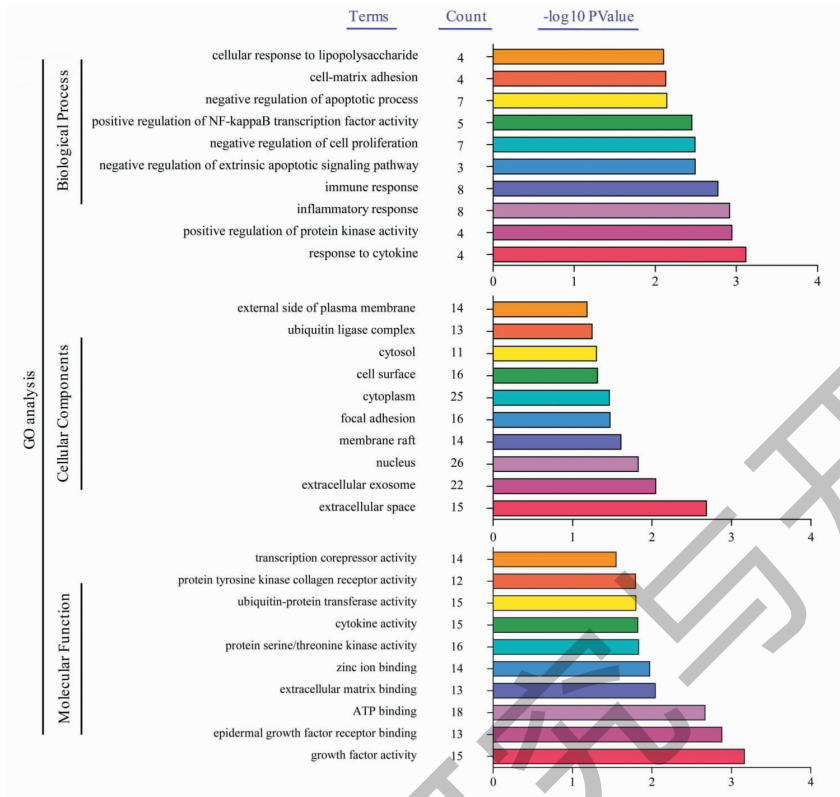


图6 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 特异性基因的 GO 功能富集分析

Fig. 6 Analysis of GO function enrichment of characteristic genes in the treatment of Hp related PU by SRCR

表2 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 特异性基因的 KEGG 通路富集分析

Table 2 Analysis of KEGG signaling pathway enrichment of characteristic genes in the treatment of Hp related PU by SRCR

序号 No.	通路 Pathway	富集基因数目 Count	通路基因数目 Pop Hits	-log10 P 值 -log10 P value	富集基因 Gene
1	Cytokine-cytokine receptor interaction	11	201	5.25	IL1R2, IL18R1, TNFRSF1B, CD40LG, IL10RB, IL6ST, IL10RA, TGFBR1, CXCL8, IL6R, IL10
2	NOD-like receptor signaling pathway	6	49	4.29	NOD2, MEFV, RELA, CXCL8, NLRP3, TNFAIP3
3	Cell adhesion molecules (CAMs)	7	143	3.75	TIGIT, CD40LG, ITGA8, ITGAV, CD274, CD226, CD28
4	ErbB signaling pathway	6	85	3.15	NRG4, NRG3, ERBB4, EREG, BTC, HBEGF
5	NF-kappa B signaling pathway	6	89	3.06	TRAF2, CD40LG, BCL2, RELA, CXCL8, TNFAIP3
6	Jak-STAT signaling pathway	7	140	2.97	IL10RB, IL6ST, IL10RA, PIM1, IL6R, IL10, IL20
7	HIF-1 signaling pathway	6	97	2.89	BCL2, RELA, VEGFA, SERPINE1, IL6R, TIMP1
8	Toxoplasmosis	6	105	2.74	CD40LG, IL10RB, BCL2, IL10RA, RELA, IL10
9	TNF signaling pathway	6	108	2.69	IL18R1, TRAF2, TNFRSF1B, NOD2, RELA, TNFAIP3
10	Intestinal immune network for IgA production	3	43	2.26	CD40LG, IL10, CD28
11	Transcriptional misregulation in cancer	6	152	2.05	PLAT, IL1R2, SIN3A, RELA, RUNX1T1, CXCL8
12	T cell receptor signaling pathway	4	103	1.97	CD40LG, RELA, IL10, CD28
13	Inflammatory bowel disease	4	61	1.84	IL18R1, NOD2, RELA, IL10
14	Pathways in cancer	9	384	1.84	TRAF2, BCL2, RELA, TGFBR1, ITGAV, VEGFA, RUNX1T1, CXCL8, MMPI
15	Proteoglycans in cancer	6	190	1.67	ERBB4, ITGAV, VEGFA, HBEGF, TWIST2, TWIST1

续表 2(Continued Tab. 2)

序号 No.	通路 Pathway	富集基因数目 Count	通路基因数目 Pop Hits	$-\log_{10} P$ 值 $-\log_{10} P$ value	富集基因 Gene
16	PI3K-Akt signaling pathway	7	326	1.26	BCL2、ITGA8、RELA、ITGAV、VEGFA、IL6R、SPP1
17	Epstein-Barr virus infection	4	114	1.15	TRAF2、BCL2、RELA、TNFAIP3
18	Focal adhesion	5	193	1.10	BCL2、ITGA8、ITGAV、VEGFA、SPP1
19	Viral myocarditis	2	62	1.02	CD40LG、CD28
20	Pancreatic cancer	3	63	1.01	RELA、TGFB1、VEGFA

IL10RA、CD28、VEGFA、CD40LG(图7)。这十个核心基因的拓扑参数见表3,结果显示 IL1B、IL10、CXCL8 是度值最大的三个基因;IL1B、VEGFA、IL10 是介数中心性最高的三个基因,IL1B、IL10、VEGFA 是

最短路径中心性最高的三个基因。其中 IL1B 和 IL10 两个基因的度值、介数中心性、最短路径中心性均居于前三。

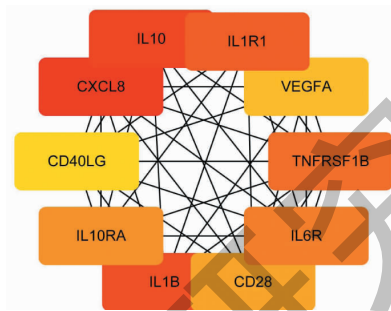


图7 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的核心基因

Fig. 7 Core genes of Hp related PU treated by SRCR

表3 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 核心基因的拓扑参数

Table 3 Topological parameters of core genes in the treatment of Hp related PU with SRCR

序号 No.	Hub 基因 Hub gene	度值 Degree	介数中心性 Betweenness centrality	最短路径中心性 Closeness centrality
1	CXCL8	33	0.09	0.47
2	IL10	34	0.11	0.48
3	IL1B	40	0.18	0.49
4	IL1R1	22	0.03	0.44
5	TNFRSF1B	22	0.03	0.41
6	IL6R	15	0.01	0.39
7	IL10RA	16	0.01	0.38
8	CD28	18	0.05	0.41
9	VEGFA	28	0.13	0.48
10	CD40LG	14	0.01	0.41

## 2.9 黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 关键 microRNA 筛选

通过 Target Scan 和 starBase 数据库检索黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 核心基因在保守位点结合的 microRNA。保留 seed match 为 8mer 的 microRNA,绘制“药物-疾病-核心基因-microRNA”相互

作用网络图(图8)。根据 context score、context score percentile、weighted context score 值的高低预测最具功能性的 microRNA。结果表明,miR-93-5p、miR-374b-5p、miR-3937、miR-19a-3p、miR-4458、miR-590-5p、miR-6838-5p、miR-424-5p 是黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 过程调控的最具功能性的 microRNA(表4)。



胃脘痛的病因较多,主要有外邪犯胃、情志失调、饮食不节、体虚久病等。Hp 感染属于外感邪气的范畴, Hp 相关性 PU 多具有热、毒性质。当脾胃虚弱而机体正气不足时, Hp 乘虚侵犯胃肠,致使脾胃功能不和,气机升降失调,形成气滞、湿热等诸多病理产物,损伤黏膜,腐肌噬脏而引发溃疡病。正如《杂病源流犀烛·胃病》所云:“胃痛,邪干胃脘病也。胃禀冲和之气,多气多血,壮者邪不能干,虚则而为病,偏寒偏热,水停食积,皆与真气相搏而痛”。大量临床研究结果显示, Hp 相关性 PU 以脾胃湿热证较为常见,清热化湿治法对治疗本病具有重要的指导意义<sup>[10]</sup>。黄芩和黄连配伍是临床经典的清热化湿解毒药对,两者皆属苦寒泻热之品,相须使用具有清热燥湿、泻火解毒、凉血止血的功效。黄芩-黄连配伍亦为治疗 Hp 相关性 PU 常用方剂中的核心药对,如半夏泻心汤、黄连解毒汤、三黄泻心汤等。现代药理研究表明<sup>[11,12]</sup>,黄芩、黄连均对 Hp 具有高度抑菌作用,此外还具有抗氧化、消炎、解热、降血糖、抗肿瘤、保护胃黏膜、调节免疫等作用。黄芩、黄连两味中药功效相似、药理作用相近,配伍常起协同增效的作用,在临床治疗 Hp 相关性 PU 中具有广泛的运用。

本研究基于网络药理学和生物信息学,探讨黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的主要分子网络调控机制,探究其发挥药效作用过程可能作用的核心基因和关键 microRNA。在 TCMS 数据库中最终筛选出黄芩-黄连药对的活性成分 41 个,其中黄连以生物碱类化合物为主要活性成分,黄芩以黄酮类化合物为主要活性成分。进一步挖掘出其可能作用的靶点 216 个,成分和靶点相互作用关系 764 条。通过对 GEO 数据库 GSE70394 数据集进行处理和分析,最终获得 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞和正常胃黏膜上皮细胞显著性的差异表达基因 127 个,其中上调基因 77 个,下调基因 50 个。利用 STRING 数据库和 Cytoscape 软件对黄芩-黄连药对活性成分靶点 PPI 网络和 Hp 感染人胃黏膜上皮细胞显著性差异表达基因 PPI 网络融合,提取两者的交集,得到黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的 PPI 网络。为了进一步分析黄芩-黄连药对活性成分治疗本病可能的作用机制,我们对其网络中的 127 个特异性基因靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。

GO 和 KEGG 富集分析结果涉及多方面的生物学过程和多条重要的信号通路。GO 分析结果显

示,黄芩-黄连药对在对细胞因子的反应、蛋白激酶活性的正调节、炎症反应、免疫反应、细胞增殖的负调节、NF- $\kappa$ B 转录因子活性的正调节等生物学过程中发挥重要的调控作用。而这些生物学过程可体现在黄芩-黄连药对调控靶点基因所参与的信号通路中。KEGG 分析结果显示有 35 条信号通路与黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 密切相关。显著富集的信号通路包括细胞因子-细胞因子受体相互作用通路、NOD 样受体信号通路、细胞粘附分子通路、ErbB 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、Jak-STAT 信号通路等。

NOD 样受体是位于细胞质内的模式识别受体,对防治胞内病原体感染和参与固有免疫应答具有重要意义。Hp 虽是胞外寄生菌但可将肽聚糖转移到宿主细胞中,与 NOD1 蛋白接触后刺激宿主产生防御反应<sup>[13]</sup>。研究表明 NOD1 蛋白缺失的小鼠对 Hp 的易感性增加<sup>[14]</sup>。NF- $\kappa$ B 是属于 Rel 蛋白家族的核转录因子,激活后可调控多种基因的转录表达,广泛参与机体的炎症免疫反应、氧化应激以及细胞增殖、分化和凋亡等生物学过程<sup>[15]</sup>。有研究认为 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活是 Hp 感染的标志之一,在相关炎症性疾病和癌症的发生中起核心作用<sup>[16]</sup>。Jak-STAT 信号通路是由细胞因子刺激的信号传导通路,可介导 Hp 感染胃上皮细胞中 NF- $\kappa$ B 的激活和 IL8 的表达<sup>[17]</sup>。由此可知,大量的研究已经证实 NOD 样受体信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路和 Jak-STAT 信号通路与 Hp 感染密切相关,表明本研究对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 分子网络调控机制的预测具有一定准确性。

细胞因子-细胞因子受体相关通路可调节细胞的生长分化,调控免疫应答以及在一定条件下参与炎症等多种疾病的发生过程。细胞粘附分子通路则参与细胞附着和移动,是免疫应答、炎症反应、凝血以及创伤愈合等生理病理过程的基础。细胞因子-细胞因子受体相关通路和细胞粘附分子通路均与免疫功能密切相关,但其与 Hp 感染相关研究目前报道较少,这为今后的研究提供了新的思路。信号通路之间存在相互联系与交叉,可以使各自的功能得到扩展,形成复杂联系的调节网络。黄芩-黄连药对不仅作用这些显著富集的通路,还作用与癌症相关等其他通路而共同发挥治疗 Hp 相关性 PU 的疗效。

采用 Cytohubba 的 MCC 算法对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的 PPI 网络进行分析,本研究得

到排名前 10 的核心基因: CXCL8、IL10、IL1B、IL1R1、TNFRSF1B、IL6R、IL10RA、CD28、VEGFA、CD40LG。这些核心基因多与炎症免疫反应相关。CXCL8、IL1B 和 IL10 为炎性细胞因子。CXCL8 又称为 IL8,是一种强大的多效性细胞因子,可趋化中性粒细胞向炎症部位聚集,调节免疫应答,此外还参与肿瘤的增殖、迁移和侵袭。有研究者将重组幽门螺杆菌抗原 HP0986 与胃上皮细胞共培养,发现 HP0986 可通过 NF- $\kappa$ B 途径剂量和时间依赖性地诱导胃上皮细胞分泌 IL8。IL1B 是由单核/巨噬细胞分泌,促进 T、B 淋巴细胞增生,激活中性粒细胞的重要炎性介质<sup>[18]</sup>。有研究发现外源性给予 10 ng/mL 的 IL1B 可刺激细胞增殖,抑制幽门螺杆菌诱导的细胞凋亡并可通过下调 H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶表达抑制壁细胞分泌 H<sup>+</sup>,提示 IL1B 在 Hp 诱导的胃癌中起重要作用<sup>[19]</sup>。一项包含 21 项研究的大样本 Meta 分析亦表明 IL-1B-31C/T 基因多态性可能增加 Hp 感染的危险性,IL-1B-511-C/T 和 IL-8-251T/A 基因多态性可能是 Hp 相关性溃疡的危险因素<sup>[20]</sup>。IL10 是抗炎细胞因子,临床研究发现其在 Hp 阳性消化性溃疡、胃炎患者中的表达明显高于 Hp 阴性的健康应试者,IL10 表达量与 Hp 感染程度、慢性炎症发展程度呈正相关<sup>[21]</sup>。

IL1R1、TNFRSF1B、IL6R 和 IL10RA 均为细胞因子受体,结合的细胞因子分别为 IL1、TNF- $\alpha$ 、IL6、IL10 等炎性因子。细胞因子通过与相应受体结合启动细胞内信号传导途径而发挥效应<sup>[22]</sup>。CD28 是 T 细胞上主要的共刺激受体,其与 B7 结合后产生的共刺激信号对 T 细胞的激活起重要作用。CD40LG 与 CD40 结合为 B 细胞活化的最重要的第二信使,促进 B 细胞分化成熟及抗体的产生。VEGFA 是作用较强的血管内皮生长因子,能够干预血管新生,故可能对溃疡的愈合起关键作用<sup>[23]</sup>。Hp 感染后与机体相互作用,这些关键基因在 NF- $\kappa$ B 信号级联等通路的介导下则构成了复杂的免疫炎症调节网络,因而黄芩-黄连药对可能通过多种活性成分与其直接或间接作用而发挥治疗 Hp 相关性 PU 的药效作用。

microRNA 是一类长约 18~25 个核苷酸的单链非编码小 RNA,通过碱基互补配对原则与特定靶基因的 mRNA 的 3'或 5'UTR 区结合,起到翻译抑制或直接降解 mRNA 的作用<sup>[24]</sup>。本研究为进一步探究 microRNA 介导的基因表达调控对黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 核心基因的影响,通过 TargetScan

和 starBase 数据库检索并筛选了最具功能性的 microRNA。其结果为 miR-93-5p、miR-374b-5p、miR-3937、miR-19a-3p、miR-4458、miR-590-5p、miR-6838-5p 和 miR-424-5p,这些 microRNA 的发现进一步从非编码 RNA 层面阐释了黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的分子机制。

综上所述,本研究基于网络药理学和生物信息学探究了黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的主要分子网络调控机制,阐明了黄芩-黄连药对在治疗 Hp 相关性 PU 过程中调控的核心基因和关键 microRNA,验证了黄芩-黄连药对多成分、多靶点、多通路协同作用的特点。本文研究结果与现有的有关 Hp 相关性 PU 发病机制、药效研究的结果相吻合,这些已有的研究在一定程度上佐证了本文的可靠性。本文研究结果可为黄芩-黄连药对治疗 Hp 相关性 PU 的临床推广应用提供科学依据,为后期深入的实验研究提供思路和参考。

#### 参考文献

- 1 Kavitt RT, Lipowska AM, Anyane-Yeboah A, et al. Diagnosis and treatment of peptic ulcer disease[J]. Am J Med, 2019, 132:447-456.
- 2 Kim SY, Min C, Oh DJ, et al. Reciprocal association between depression and peptic ulcers: two longitudinal follow-up studies using a national sample cohort [J]. Sci Rep, 2020, 10 (1):1749.
- 3 Liu WZ, Xie Y, Lu H, et al. Fifth Chinese national consensus report on the management of *Helicobacter pylori* infection [J]. Helicobacter, 2018, 23(2):e12475.
- 4 Branch of Gastrointestinal Diseases, China Association of Chinese Medicine. Expert consensus on TCM diagnosis and treatment of peptic ulcer (2017) [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2017, 32:4089-4093.
- 5 Li ST, Zhang LC, La XQ, et al. The mechanism of BPIS against breast cancer based on network pharmacology [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31:1339-1349.
- 6 Song HP, Zeng MY, Peng J, et al. Effects of *Salviae Miltiorrhizae* on characteristic gene changes and key protein expression of Müller cells in pathological process of retinitis pigmentosa [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2019, 50:1863-1872.
- 7 Costa AM, Ferreira RM, Pinto-Ribeiro I, et al. *Helicobacter pylori* activates matrix metalloproteinase 10 in gastric epithelial cells via egfr and erk-mediated pathways [J]. J Infect

- Dis, 2016, 213:1767-1776.
- 8 Kim TH, Park JM, Cheung DY, et al. Comparison of 7- and 14-day eradication therapy for *Helicobacter pylori* with first- and second-line regimen; randomized clinical trial [ J ]. J Korean Med Sci, 2020, 35(5) :e33.
  - 9 Expert Committee on Digestive Diseases, China Society of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine. Consensus statements on integrated traditional Chinese and Western medicine diagnosis and treatment of peptic ulcer(2017) [ J ]. Chin J Integr Tradit West Med Dig(中国中西医结合消化杂志), 2018, 26(2) :112-119.
  - 10 Zhang Y, Wu DS, Xu Y, et al. Medication regularity of combination of traditional Chinese medicine and Western medicine in treating *Helicobacter pylori*-related gastropathy based on literatures [ J ]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2019, 44:4985-4991.
  - 11 Wang J, Wang L, Lou GH, et al. Coptidis Rhizoma; a comprehensive review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [ J ]. Pharm Biol, 2019, 57(1) :193-225.
  - 12 Zhao T, Tang H, Xie L, et al. *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology [ J ]. J Pharm Pharmacol, 2019, 71 :1353-1369.
  - 13 Varga MG, Peek RM. DNA transfer and toll-like receptor modulation by *Helicobacter pylori* [ J ]. Curr Top Microbiol Immunol, 2017, 400(1) :169-193.
  - 14 Zhou H, Coveney AP, Wu M, et al. Activation of both TLR and NOD signaling confers host innate immunity-mediated protection against microbial infection [ J ]. Front Immunol, 2018, 9(1) :3082.
  - 15 Wei S, Liu Q. Long noncoding RNA MALAT1 modulates sepsis-induced cardiac inflammation through the miR-150-5p/NF- $\kappa$ B axis [ J ]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12:3311-3319.
  - 16 Zhang Y, Yan J, Li C, et al. LncRNA H19 induced by *Helicobacter pylori* infection promotes gastric cancer cell growth via enhancing NF- $\kappa$ B-induced inflammation [ J ]. J Inflamm (Lond), 2019, 16(1) :23.
  - 17 Li J, Yin P, Gong P, et al. 8-Methoxypsoralen protects bovine mammary epithelial cells against lipopolysaccharide-induced inflammatory injury via suppressing JAK/STAT and NF- $\kappa$ B pathway [ J ]. Microbiol Immunol, 2019, 63:427-437.
  - 18 Devi S, Ansari SA, Vadivelu J, et al. *Helicobacter pylori* antigen HP0986(TieA) interacts with cultured gastric epithelial cells and induces IL8 secretion via NF- $\kappa$ B mediated pathway [ J ]. Helicobacter, 2014, 19(1) :26-36.
  - 19 Guo T, Qian JM, Zhao YQ, et al. Effects of IL-1beta on the proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells and acid secretion from isolated rabbit parietal cells [ J ]. Mol Med Rep, 2013, 7(1) :299-305.
  - 20 Ma J, Wu D, Hu X, et al. Associations between cytokine gene polymorphisms and susceptibility to *Helicobacter pylori* infection and *Helicobacter pylori* related gastric cancer, peptic ulcer disease; a meta-analysis [ J ]. PLoS One, 2017, 12(4) :e0176463.
  - 21 Bagheri N, Shirzad H, Elahi S, et al. Downregulated regulatory T cell function is associated with increased peptic ulcer in *Helicobacter pylori*-infection [ J ]. Microb Pathog, 2017, 110(1) :165-175.
  - 22 Vecellio M, Cohen CJ, Roberts AR, et al. RUNX3 and T-Bet in immunopathogenesis of ankylosing spondylitis-novel targets for therapy? [ J ]. Front Immunol, 2018, 9(1) :3132.
  - 23 Lin JX, Weng XF, Xie XS, et al. CDK5RAP3 inhibits angiogenesis in gastric neuroendocrine carcinoma by modulating AKT/HIF-1alpha/VEGFA signaling [ J ]. Cancer Cell Int, 2019, 19(1) :282.
  - 24 Cao D, Di M, Liang J, et al. MicroRNA-183 in cancer progression [ J ]. J Cancer, 2020, 11:1315-1324.