

基于 iTRAQ 技术研究滋阴降火方药知柏地黄丸对阴虚“上火”SD 大鼠血清蛋白组的影响

刘昌铭¹ 毛连根¹ 杨 粟¹ 江婷婷² 陈钟梁¹ 屠慧惠¹ 陈 静¹
胡玉婷² 甘 霖² 李仲杰¹ 李继承^{1,2}

(1 浙江大学细胞生物学研究所, 杭州, 310058; 2 华南理工大学医学院, 广州, 510006)

摘要 目的:研究知柏地黄丸治疗阴虚“上火”的生物学机制。方法:应用 iTRAQ-2DLC-MS/MS 蛋白组学技术检测阴虚“上火”大鼠在知柏地黄丸治疗前后的血清蛋白组学表达谱,筛选并鉴定与知柏地黄丸治疗作用相关的蛋白质群,并应用生物信息学对差异表达的蛋白进行功能富集分析,揭示知柏地黄丸对阴虚“上火”治疗作用的生物学机制。结果:与正常大鼠比较,阴虚“上火”对照组大鼠血清中有 47 个差异蛋白,其中有 20 个表达上调,27 个表达下调。知柏地黄丸治疗后,有 19 个差异蛋白恢复至正常或接近正常水平。通过生物信息学分析,发现这些蛋白主要集中在免疫反应与物质代谢过程。其中参与免疫反应的蛋白主要有有补体成分 4 (C4)、凝血因子 X (F10)、激酶相关磷酸蛋白 2 (Skap2);参与代谢作用的蛋白有 L 乳酸脱氢酶 A 链 (Ldha)、果糖二磷酸醛缩酶 A (Aldoa)、花生四烯酸脂肪氧合酶 (Alox12)、GDP 分解酶抑制剂 1 (Arhgdia)、肌球蛋白轻链 (Myl6)。结论:阴虚“上火”主要表现为机体免疫反应与物质代谢发生紊乱,知柏地黄丸可以通过调节免疫与物质代谢反应治疗阴虚“上火”。

关键词 阴虚“上火”;知柏地黄丸;蛋白组学;iTRAQ;免疫;代谢

Study on Ziyin Jianghuo Formula Zhibai Dihuang Pill on Serum Protein of SD Rats with Yin-deficiency Shanghuo Based on iTRAQ

Liu Changming¹, Mao Liangen¹, Yang Su¹, Jiang Tingting², Chen Zhongliang¹, Tu Huihui¹, Chen Jing¹,
Hu Yuting², Gan Lin², Li Zhongjie¹, Li Jicheng^{1,2}

(1 Institute of Cell Biology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2 School of Medicine, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: To explore the therapeutic mechanism of Zhibai Dihuang Granule (ZDG) in Yin-deficiency-heat (YDH) syndrome. **Methods:** iTRAQ-2DLC-MS/MS technique was applied to screen the differentially expressed serum proteins between ZDG treated rats and YDH syndrome rats. The serum protein profiles were analyzed by bioinformatics tools, such as Gene Ontology (GO) database, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway database. Compared with normal rats, 47 differentially expressed proteins were shown in the serum of YDH syndrome rats, including 20 up-regulated proteins and 27 down-regulated proteins. Nineteen proteins returned to normal after ZDG treatment, which mostly involved in immune reaction and metabolism. Complement C4 (C4), coagulation factor X (F10), and Src kinase-associated phosphoprotein 2 (Skap2) participated in immune response, while L-lactate dehydrogenase A chain (Ldha), Fructose-bisphosphate aldolase A (Aldoa), Arachidonate 12-lipoxygenase (Alox12), Rho GDP-dissociation inhibitor 1 (Arhgdia), and Myosin light polypeptide 6 (Myl6) mainly related to metabolic process. **Conclusion:** YDH syndrome is highly associated with the disturbance of immune function and metabolism, and ZDG treats YDH syndrome mostly through regulating immune activity and metabolic process.

Key Words YDH syndrome, Zhibai Dihuang Granule, Proteomics, iTRAQ, Immunity, Metabolism

中图分类号:R22 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.003

阴虚“上火”常表现为口干舌燥、目干涩痛、心烦等“上火”症状,或伴有复发性口舌生疮、牙龈肿痛、咽喉肿胀等黏膜炎性病变,多见于劳损久病或热病之后而致阴液内耗的患者。当今社会,随着生活节奏的加快以及工作压力的增加,人们劳神较多,阴津亏损,“阴虚生内热”,从而导致“上火”。阴虚“上

火”越来越受到关注,逐渐成为一个不容忽视的问题。据报道,目前阴虚“上火”较多的发生在学业或工作压力大的人群^[1],而且在不断年轻化,15~34 岁年龄段的人群“上火”的比例明显高于其他年龄段^[2]。阴虚“上火”虽然尚未达到疾病的临床诊断标准,但是作为一种亚健康状态已经影响到人的正

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2014CB543002)

作者简介:刘昌铭(1990.05—),男,博士研究生,研究方向:阴虚“上火”的血清生物学标志物研究,E-mail:liucm523@126.com

通信作者:李继承(1957.12—),男,硕士,教授,浙江大学细胞生物学研究所所长,研究方向:肺结核生物学标志物及其中医证候的生物学研究,E-mail:lijichen@zju.edu.cn

常生活状态,严重降低生命质量。

阴虚“上火”又称虚火,与实火不同,它是由阴津损耗导致机体不能制阳,引起阳亢的状态,因此阴虚“上火”的治疗应该以滋阴为主。知柏地黄丸是一种滋阴降火的经典中药方剂,由知母、黄柏、熟地黄、山茱萸、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻八种成分组成^[3]。知柏地黄丸处方最早源于明代著名医学家张景岳所著《景岳全书》,治疗阴虚“上火”证已有上千年的历史,不仅在治疗阴虚“上火”方面有显著疗效,对于阴虚火旺相关的甲状腺功能亢进、肾病综合征、尿路感染、前列腺炎、更年期综合征等疾病均有明显的治疗和改善作用。但是,知柏地黄丸作为中药复方制剂,由多种成分构成,而且中药治疗疾病往往作用于体内多个靶点^[4],其治疗机制一直未能明确。阐明知柏地黄丸治疗阴虚“上火”的作用机制不仅能够丰富“上火”的生物学内涵,而且可以提高知柏地黄丸临床应用中的科学性,对中药的临床应用与优化起到指导作用。

在本研究中,我们应用目前蛋白组学 iTRAQ-2DLC-MS/MS 研究知柏地黄丸治疗前后大鼠血清蛋白组的变化,筛选并鉴定和知柏地黄丸治疗相关的血清蛋白质,通过对差异表达的蛋白进行多重生物信息学分析,进行蛋白的生物学功能以及信号通路富集,确定知柏地黄丸治疗阴虚“上火”的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物 实验用清洁级雌性 SD 大鼠 60 只,体重(200±20)g,由浙江省医学科学院提供,动物合格证号:SCXK(浙)2014-0001。辛热药物水煎剂(附子、干姜、肉桂按 1:1:1 比例常规制成 2 g/mL 浓度煎剂),药物从杭州胡庆余堂购买。知柏地黄丸从浙江中医药大学第二门诊部购买。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 所有动物均饲养在恒温(21~23℃),12 h 光照与 12 h 黑暗循环更替的动物房,自由进食饮水。实验开始之前在该环境饲养 1 周以适应环境。大鼠随机分为正常对照组(20 只)、阴虚“上火”组(40 只)。阴虚动物模型参照前人方法建立^[6]:对照组大鼠每天定时灌胃热性中药煎剂,剂量为 2 mL/100 g;对照组大鼠给予等量无菌生理盐水,连续给药 21 d。实验第 12 天,用滤纸片在 40% 冰醋酸中浸泡 24 h 后贴于阴虚“上火”组大鼠口腔两侧颊部黏膜上烧灼 60 s 造成口腔溃疡,获得阴虚“上火”大鼠模型。

1.2.2 给药方法 从第 22 天起,模型大鼠随机分

为阴虚“上火”组和知柏地黄丸观察组,每组 20 只。观察组大鼠给予知柏地黄丸 8.64 g/(kg·d)(根据人与大鼠体表面积换算),连续给药 7 d,其余 2 组给予等量无菌生理盐水。实验过程中观察大鼠的外貌体征以及行为变化,每 3 天记录 1 次体重。最后一次给药后 2 h,腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉大鼠,剂量为 0.2 mL/100 g,采用颈总动脉留置针的方法收集大鼠血液。血液 4℃ 静置 2 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,取血清,分装,−80℃ 保存。脊椎脱臼法处死大鼠,留取大鼠胸腺、肾上腺、脾脏并称重。动物实验严格按照浙江大学动物保护与使用委员会相关规定执行。

1.2.3 iTRAQ-2DLC-MS/MS 技术检测大鼠血清差异蛋白 样品处理及 iTRAQ 标记: iTRAQ 标记按照 iTRAQ 试剂盒(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)说明书进行操作。每组各 100 μg 蛋白质加入预冷的丙酮(丙酮:样品体积比=5:1),−20℃ 沉淀 1 h。12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用试剂盒中自带的溶解液 Dissolution Buffer(20 μL)和 1% SDS(1 μL)充分混悬溶解样品。加入还原试剂,60℃ 反应 1 h。将还原的蛋白样品烷基化,胰蛋白酶(Sigma, St. Louis, MO, USA)37℃ 消化过夜,然后进行 iTRAQ 标记。对照组样本用报告标签 118 标记,阴虚“上火”组样本用报告标 119 标记,观察组样本 121 标记。室温下反应 60 min。将标记的肽段混合,脱盐、干燥。

1.2.4 第一维强阳离子柱(SCX)分离 标记后的混合肽段用强阳离子交换柱(SCX)进行分馏。将样本混合物溶于 A 相缓冲液(10 mM KH₂PO₄, 25% ACN, pH 2.6)上柱,然后用 B 相缓冲液(350 mM KCl, 10 mM KH₂PO₄, 25% ACN, pH 2.6)以 0~80% 的浓度梯度、200 μL/min 的流速洗脱 1 h。洗脱后的样品浓度在波长 214 nm/280 nm 处 OD 值读数获得。接着进行第二维反向液质联用质谱分析。

1.2.5 第二维反相液质联用(RPLC-MS) 混合样品真空干燥后重悬在 20 μL HPLC Buffer A(5% ACN, 0.1% 甲酸)中,注入 ZORBAX 300SB-C18 RP column(5 μm, 300 Å, 0.1 mm×150 mm; Microm, Auburn, CA, USA),然后用 Buffer B(95% ACN, 0.1% 甲酸)以浓度梯度为 5%~35% 的浓度梯度、0.3 μL/min 的流速洗脱 90 min。然后用 Q-STAR XL(Applied Biosystem, USA)系统一级质谱(MS)和串联质谱(MS/MS)分析。质谱分析设定标准:MS 扫描范围 m/z 为 400~1 800;MS/MS 扫描范围 m/z 为 100~2 000。IDA 采集模式:1 个图谱选择 20 个最强的母离子进行串

表 1 阴虚上火 SD 大鼠阴虚“上火”组、知柏地黄丸观察组和对照组体重比较($\bar{x} \pm s$)

组别	0 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
对照组($n=20$)	213.22 $\pm$ 5.36	240.74 $\pm$ 7.89	270.65 $\pm$ 9.48	305.26 $\pm$ 9.66	330.39 $\pm$ 3.84	337.17 $\pm$ 15.15
阴虚“上火”组($n=20$)	205.14 $\pm$ 7.30	218.46 $\pm$ 17.06	246.92 $\pm$ 17.86	256.96 $\pm$ 30.36 *	277.50 $\pm$ 32.93 *	298.47 $\pm$ 26.48 *
观察组($n=20$)	205.14 $\pm$ 5.88	227.82 $\pm$ 12.46	235.47 $\pm$ 20.55	257.57 $\pm$ 26.30 *	277.30 $\pm$ 24.43 *	303.86 $\pm$ 34.43 *

注:与对照组比较,* $P<0.05$

表 2 阴虚上火 SD 大鼠阴虚“上火”组、知柏地黄丸观察组和对照组体重增长率比较(%)

组别	0 d	5 d	10 d	15 d	20 d	25 d
对照组	0	12.91	12.42	12.79	8.23	2.05
阴虚“上火”组	0	6.49	13.03	4.07	7.99	7.56
观察组	0	11.06	3.36	9.39	7.66	9.58

注:与对照组比较,* $P<0.05$

级扫描^[7]。iTRAQ 报告离子的峰面积的比值反映了样品中蛋白质的相对丰度和蛋白质^[8]。应用 ProteinPilot 软件(Version 3.0, revision 114732, Applied Biosystems),在 International Protein Index (IPI) 数据库中查询 MS/MS 质谱数据,进行差异蛋白的鉴定和定量。参数设置包括:消化酶为 trypsin,半胱氨酸修饰为甲基甲烷硫基磺酸,样品采用 iTRAQ 标记赖氨酸和氨基端,检测蛋白阈值 >1.3 ,即报告置信度要在 95% 以上,至少 1 条肽段匹配,而且该肽段对该蛋白质置信度在 95% 以上。差异倍数大于 1.25 或小于 0.8 认为 2 者之间差异有统计学意义^[9]。

1.2.6 生物信息学分析 差异蛋白的分子生物学功能、细胞成分和生物学过程分析参阅 GO 数据库(<http://www.geneontology.org/>)。蛋白信号通路查阅 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。蛋白与蛋白之间相互作用关系网络借助 STRING 软件完成(<http://string.embl.de/>)。

1.2.7 数据分析 实验数据用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析用 GraphPad Prism version 5.01 软件,单样本 t 检验用来检测 2 组之间的差异,非参数分析用 Mann-Whitney U-test 检测。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体征变化 造模过程中发现,对照组大鼠出现毛色枯黄、大便干结等“上火”症状。第 12 天用冰醋酸诱导口腔溃疡后,对照组大鼠口腔两侧颊部黏膜上出现直径约 4 mm 的近圆形溃疡,边界较清晰,表面轻度充血,提示溃疡模型成功。第 14 天建模完成时,观察组大鼠体重(277.50 ± 32.93)显著低于对照组(330.39 ± 3.84),差异有统计学意义

($P<0.0001$)。知柏地黄丸治疗 1 周后,观察组大鼠与对照组大鼠比较,口腔溃疡炎症症状缓解、毛发变光滑,体重有回升,但差异无统计学意义。

表 3 知柏地黄丸治疗前后差异蛋白中有恢复趋势的蛋白质

Protein ID	Gene symbol	Protein name	Ratios		
			M/C	T/M	T/C
P08649	C4	Complement C4	2.61	0.35	0.92
Q63207	F10	Coagulation factor X	1.69	0.42	0.71
Q920G0	Skap2	Src kinase-associated phosphoprotein 2	0.60	1.71	1.02
Q64119	Myl6	Myosin light polypeptide 6	0.58	2.01	1.16
P85972	Vcl	Vinculin	0.55	1.33	0.74
F1LQ70	Alox12	Arachidonate 12-lipoxygenase	0.55	1.56	0.86
P05065	Aldoa	Fructose-bisphosphate aldolase A	0.52	2.15	1.12
P61983	Ywhag	14-3-3 protein gamma	0.51	2.40	1.22
Q08163	Cap1	Adenylyl cyclase-associated protein 1	0.48	2.23	1.08
Q63610	Tpm3	Tropomyosin alpha-3 chain	0.44	3.02	1.34
P62963	Pfn1	Profilin-1	0.42	2.96	1.25
Q9QX27	Stt18	Suppression of tumorigenicity 18 protein	0.37	1.96	0.73
Q68FR2	Bin2	Bridging integrator 2	0.37	3.37	1.25
P04642	Ldha	L-lactate dehydrogenase A chain	0.36	3.31	1.20
P68511	Ywhah	14-3-3 protein	0.35	3.08	1.07
Q5X173	Arhgdia	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	0.33	5.60	1.85
P63102	Ywhaz	14-3-3 protein zeta/delta	0.32	2.65	0.84
Q5XFX0	Tagln2	Transgelin-2	0.28	2.07	0.57
P09495	Tpm4	Tropomyosin alpha-4 chain	0.22	5.50	1.20

注:C,正常对照组;M,阴虚“上火”组;T,知柏地黄丸观察组

2.2 脏器称重结果 对 3 组大鼠重要脏器进行称重,肝脏、脾脏和肾上腺重量在 3 组大鼠之间均无显著性差异。阴虚“上火”组、观察组大鼠胸腺重量显著低于对照组大鼠。见图 1。

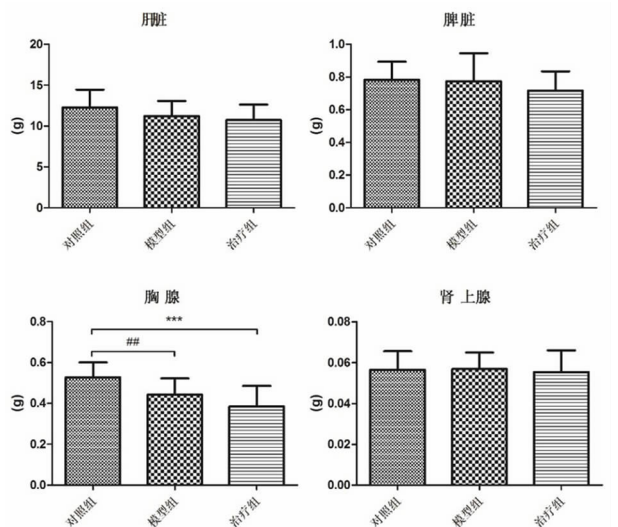


图 1 阴虚“上火”组、对照组、知柏地黄丸观察组大鼠重要脏器重量比较

2.3 蛋白组学结果 iTRAQ 结果显示,对照组大鼠与对照组大鼠血清中共有 47 个差异表达蛋白,其中上调蛋白有 20 个,下调蛋白有 27 个。对差异性蛋白进行生物信息学分析,GO 功能富集结果表明,差异蛋白主要参与生物调节、刺激应答、代谢过程;KEGG 分析显示差异蛋白集中在神经信号通路、补体与凝血通路。见图 2-3。知柏地黄丸治疗前后血清中共出现 42 个差异蛋白,其中 19 个蛋白恢复正常水平或存在恢复趋势(表 3),主要分为 2 大类:1)是与免疫反应相关,分别是补体成分 4(C4)、激酶相关磷蛋白 2(Skap2)、凝血因子 X(F10);2)是参与物质代谢过程的蛋白,分别是(Ywhah)、L 乳酸脱氢酶 A 链(Ldha)、果糖二磷酸醛缩酶 A(Aldoa)、花生四烯酸脂肪氧合酶(Alox12)、肌球蛋白轻链(Myl6)、抑制致癌性 18 蛋白(St18)。

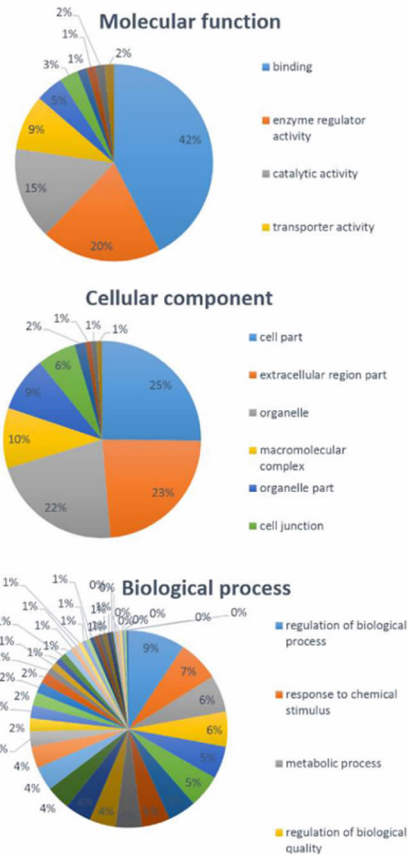


图 2 阴虚“上火”组与对照组血清差异蛋白 GO 分析

3 讨论

现代医学认为“上火”是一种应激反应,而且与神经-内分泌-免疫网络失衡相关,可引起机体免疫功能失调^[10]。大量研究发现,阴虚“上火”可能与机体免疫功能失调有关,当阴虚“上火”发生时,机体免疫物质生成不足,免疫功能低下,易出现各种类型的免疫缺陷病^[11]。与平和质人群比较,阴虚“上火”

者血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平升高,IL-2 水平降低,表明机体炎性细胞因子表达出现异常^[12-13]。此外,“上火”人群外周血中 CD3、CD4 细胞百分值低于正常人^[14],说明阴虚“上火”人群 T 细胞免疫功能发生紊乱。另有研究发现,阴虚“上火”可能与机体代谢过程紊乱有关。王召平等人发现,“上火”人群出现脂代谢与核酸代谢失常,体重指数、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、尿酸高于非上火人群,而高密度脂蛋白胆固醇低于非上火人群。我们在研究中发现,阴虚“上火”大鼠血清差异蛋白主要集中在生物学调节过程、刺激应答过程与代谢过程,说明“上火”是机体对多种外界刺激做出应答所产生的一种病理状态。这些刺激通常是长期劳作、熬夜、久病劳损,或食辛辣食物,机体通过各种生物学功能上的调节对外界刺激做出应答。通过对差异表达的血清蛋白进行 KEGG pathway 富集分析,我们发现差异蛋白主要富集在神经信号传导、补体与凝血通路,说明机体对“上火”的调节可能通过神经信号通路传递,在补体与凝血通路做出调节,也印证了前人提出的阴虚“上火”与神经-内分泌-免疫网络失衡相关。

我们用知柏地黄丸治疗阴虚“上火”大鼠,发现治疗前后血清差异蛋白同样集中在免疫反应与代谢过程。C4 与 F10 属于补体与凝血信号通路的蛋白。F10 具有促炎效应,在体内参与凝血酶(Thrombin)的合成,可诱导产生 IL-6、IL-8 等各种炎性细胞因子。我们在实验中发现 F10 在阴虚“上火”大鼠血清显著高表达,表明体内炎症反应增强。知柏地黄丸治疗后,血清 F10 水平降低,提示知柏地黄丸可能从缓解炎症反应治疗阴虚“上火”。C4 是补体激活经典途径与凝集素途径都存在的重要蛋白,C4 表达水平的变化可以影响下游膜攻击复合物(MAC)的功能,影响机体免疫功能。知柏地黄丸能够使 C4 水平降低,说明可能从补体激活水平治疗阴虚“上火”。此外,Skap2 在知柏地黄丸治疗后显著升高,Skap2 参与 B 淋巴细胞的活化过程,说明知柏地黄丸还可以促进 B 细胞活化,改善机体免疫功能。此外,知柏地黄丸治疗也引起了物质代谢相关蛋白的显著性变化。果糖二磷酸醛缩酶 A 和 L-乳酸脱氢酶 α 链均参与糖酵解和糖异生,是体内葡萄糖代谢的重要途径,也是机体提供能量的重要反应。我们前期的研究也证实,阴虚“上火”大鼠血清差异蛋白中,碳水化合物代谢,尤其是糖酵解和糖异生途径,在代谢途径中占很大比例。有研究报道,“上火”大鼠的体内能量生产与能量消耗均有一定程度的增

强。因此,结合我们的结果,阴虚“上火”状态下的能量代谢增强可能由于糖酵解与糖异生反应在体内出现异常。在知柏地黄丸治疗后,参与糖酵解与糖异生的果糖二磷酸醛缩酶 A 和 L-乳酸脱氢酶 α 链均恢复至正常水平,因此推断知柏地黄丸治疗阴虚“上火”还可能通过调节糖酵解与糖异生反应来稳定能量代谢过程。

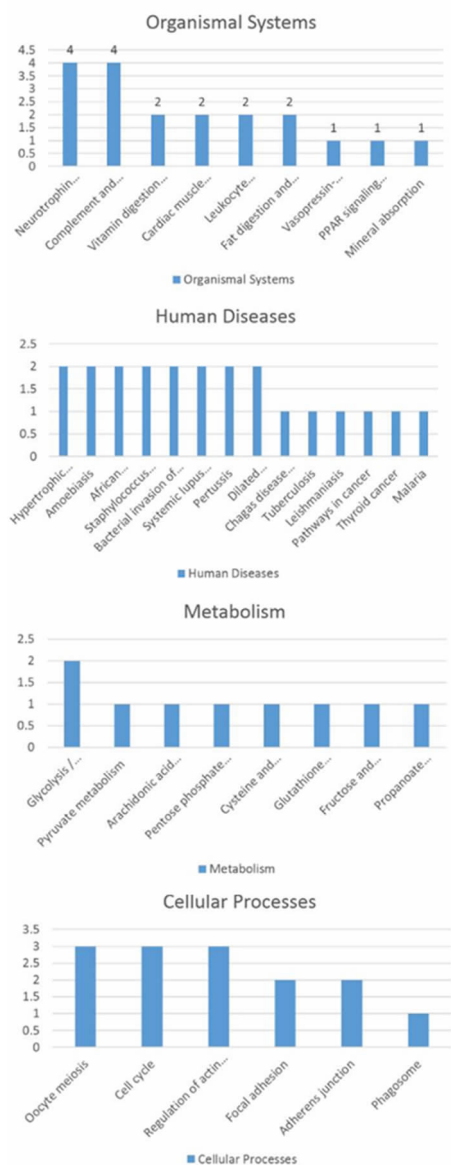


图3 阴虚“上火”组与对照组血清差异蛋白 KEGG 分析

阴虚“上火”是由于在多种刺激下机体免疫功能与代谢过程发生异常所产生的一种病理状态。知柏地黄丸治疗后,与免疫反应相关的补体成分 4、凝血因子 X 和酶相关磷蛋白 2 恢复至正常,说明知柏地黄丸可能通过缓解炎症反应、激活补体通路、促进 B 细胞活化治疗阴虚“上火”。此外,知柏地黄丸的

治疗可以恢复阴虚“上火”大鼠血清果糖二磷酸醛缩酶 A 和 L-乳酸脱氢酶 α 链的表达水平,说明知柏地黄丸还可以通过调节血清糖酵解与糖异生,改善阴虚“上火”大鼠能量代谢的异常。

参考文献

- [1] 于洪洁,王勇,杨丽萍. 阳虚、阴虚体质在大学生中的流行病学调查[J]. 辽宁中医杂志,2013,40(4):619-621.
- [2] Wang Q,Zhu YB. Epidemiological investigation of constitutional types of Chinese medicine in general population; Base on 21,948 epidemiological investigation data of nine provinces in China[J]. China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy,2009,24(1):7-12.
- [3] Zhao L. Metabonomic analysis of the therapeutic effect of Zhibai Dihuang Pill in treatment of streptozotocin-induced diabetic nephropathy[J]. J Ethnopharmacol,2012,142(3):647-656.
- [4] Xie B,Gong T,Gao R, et al. Development of rat urinary HPLC-UV profiling for metabonomic study on Liuwei Dihuang Pills[J]. J Pharm Biomed Anal,2009,49(2):492-497.
- [5] Huygens F,Hussain MA. Proteomic and Bioinformatics Tools to Understand Virulence Mechanisms in Staphylococcus aureus[J]. Current Proteomics,2012,9(1):2-8.
- [6] Zhou Y,Fan Y,Zhang YP, et al. Development of animal model of heat syndrome due to insufficiency of yin fluids[J]. Chinese J Basic Med TCM,2001,7(9):23-25.
- [7] Wang Y,Cao R,Jin H. Altered protein expression in serum from endometrial hyperplasia and carcinoma patients[J]. J Hematol Oncol,2011,4(1):15.
- [8] Jin GZ,Li Y,Cong WM. iTRAQ-2DLC-ESI-MS/MS based identification of a new set of immunohistochemical biomarkers for classification of dysplastic nodules and small hepatocellular carcinoma[J]. J Proteome Res,2011,10(8):3418-28.
- [9] Xu DD,Deng DF,X Li, et al. Discovery and identification of serum potential biomarkers for pulmonary tuberculosis using iTRAQ-coupled two-dimensional LC-MS/MS[J]. Proteomics,2014,14(2-3):322-331.
- [10] 苏鑫,孙大中. “上火”与应激反应相关性探析[J]. 中华中医药杂志,2015,30(1):32-34.
- [11] 王健民. 阴阳学说在免疫反应中的应用[J]. 浙江中医药大学学报,1979,5(1):4-5.
- [12] Wang Q,XJ Ren,SL Yao, et al. Clinical observation on the endocrinal and immune functions in subjects with yin-deficiency constitution[J]. Chin J Integr Med,2010,16(1):28-32.
- [13] Yan HF, et al. Yin deficiency syndrome vexing heat in chest, palms and soles was related to TNF- α IL-1 β IL-6 clinical observation. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine[J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine,2008,26(2):293-295.
- [14] 刘亚梅. 实热证、虚热证患者 T 淋巴细胞亚群的对比性研究[J]. 中医杂志,2005,46(4):289-290.

(2017-11-03 收稿 责任编辑:张文婷)