

基于 iTRAQ 技术的中医实热“上火”血清蛋白质组学特征分析

陈娟 徐莉 谢冠群 周佳 谢志军 甘静 范永升

(浙江中医药大学基础医学院, 杭州, 310053)

摘要 目的:筛选实热“上火”血清差异表达蛋白,为实热“上火”机制的深入研究提供科学依据。方法:采用相对和绝对定量同位素标记(iTRAQ)对血清蛋白质进行检测,结合生物信息学分析(GO、STRING)筛选实热“上火”与正常非“上火”人群差异显著的蛋白质。结果:与正常对照组比较,实热上火组血清筛选出49个差异蛋白质,其中上调的22个,下调的27个。载脂蛋白C3(Apo C3)、乳酸脱氢酶(LDH)和维生素K依赖蛋白S(PROSI)等显著上调,而载脂蛋白A4(Apo A4)、超氧化物歧化酶3(SOD3)和纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI-1)等显著下调。结论:观察组脂质代谢、糖酵解异常与氧化应激、炎症反应的发生密切相关,且凝血功能下降,易造成出血,筛选的差异蛋白可为实热“上火”的生物学基础研究提供依据。

关键词 实热上火; iTRAQ; 血清蛋白质组学; 生物标志物

Analysis of Serum Proteomics Features of “Shanghuo” in Traditional Chinese Medicine Based on iTRAQ Technology

Chen Juan, Xu Li, Xie Guanqun, Zhou Jia, Xie Zhijun, Gan Jing, Fan Yongsheng

(College of Basic Medical Sciences, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Abstract Objective: To screen differentially expressed proteins in excessive heat “shanghuo” serum and provide a scientific basis for in-depth study on the mechanism of excessive heat “shanghuo”. **Methods:** Serum proteins were detected by relative and absolute quantitative isotope labeling (iTRAQ), and bioinformatics analysis (GO, STRING) was used to screen the proteins that were significantly different between the normal fever group and normal non-lit group subjects. **Results:** Compared with the normal control group, 49 differentially expressed proteins were screened by excessive heat “Shanghuo” group, with 22 up-regulated and 27 down-regulated. Apolipoprotein C3 (Apo C3), lactate dehydrogenase (LDH), and vitamin K-dependent protein S (PROSI) were significantly up-regulated while Apo A4, SOD3 and the plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) and so on were significantly down-regulated. **Conclusion:** The abnormal lipid metabolism and glycolytic abnormality in the “shanghuo” crowd are closely related to the occurrence of oxidative stress and inflammation, and the coagulation function is decreased, leading to easily bleeding. The differential proteins screened can provide references for biological foundation of basic research on “shanghuo”.

Key Words Excessive heat; iTRAQ; Serum proteomics; Biomarker

中图分类号: R22; R24 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.008

“上火”是对身体出现口疮、鼻衄、牙宣、目赤、咽痛、口干便秘等症状的统称,发生率较高,且与口腔溃疡、失眠症等多种常见病的发病密切相关^[1]。《素问·阴阳应象大论》“壮火食气”“少火生气”,论述了火的不同作用;火为热之极、热为火之渐,火热同类,常连在一起。《素问·至真要大论》病机十九条,其中9条涉及“火、热”病机,强调了火热致病的重要性。现代医学对“上火”还没有统一认识,认为“上火”与机体免疫功能失调情况下出现的局部感染、应激状态下机体内环境失衡及能量代谢等相关,医学上也称之为应激性疾病^[2-3]。随着社会的发展

和亚健康观念的提出,人们的健康意识不断提高,现代医学对上火尚缺乏有效的治疗方法,而中医学分别采用清热泻火法、滋阴降火法等治疗,疗效较为明显,但是中医注重宏观观察,缺乏对“上火”科学内涵的认识。因此,运用现代的科学方法方法来研究“上火”发生机制,不仅能够丰富其科学内涵,同时对于防治“上火”和提高人们的健康水平也有着重要的现实意义。

生命活动的功能执行者是蛋白质,绝大多数生命调控过程、各种代谢过程、疾病的原发过程以及大多数药物作用靶标均发生在蛋白质水平。现阶段,

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2014CB543001);973计划子课题(2014CB543001-1);浙江中医药大学基础医学院科技创新团队项目(JCIT2016-1)

作者简介:陈娟(1984.09—),女,博士,副教授,研究方向:中西医结合防治疑难病,E-mail:mytw_00@163.com

通信作者:范永升(1955.11—),男,博士,教授,国家重点学科带头人,研究方向:中医药防治风湿自身免疫系统病,E-mail:fysjzjcm@163.com

血清蛋白质组学的研究越来越受到国内外的关注,血清中含有的蛋白质种类很多,只有不断进行筛选和鉴定,才能进一步帮助探明疾病的发生、监控疾病的进程和每个阶段相应蛋白表达水平的关联性[4]。相对和绝对定量同位素标记(iTRAQ)技术自开展以来,在疾病研究和药物监测方面应用广泛,其不但可以检测出更多的低丰度蛋白,甚至可以灵敏的检测到其他技术无法检测到的跨膜蛋白,具有高灵敏度、高分辨率、标记效率高、样品兼容性和重复性好等优点,在血清蛋白质组学的研究中被广泛应用[5-6]。

本研究以在校大学生为研究对象,基于 iTRAQ 技术对实热“上火”和健康人群血清中蛋白质进行检测,并结合生物信息学方法挖掘观察组与正常非“上火”人群的差异蛋白,寻找其物质基础和可能的分子标志物,为“上火”机理的深入研究提供依据,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取2014年3月至2014年10月浙江中医药大学在校大学生43例,分为观察组(实热“上火”人群)和对照组(正常非“上火”人群),其中观察组21例,对照组22例,其中的一般资料如图1^[7]所示,年龄及性别比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有统计学意义。促凝管采集血液样本,30 min 内以3 000 r/min 离心,分离血清后于 -80°C 保存。

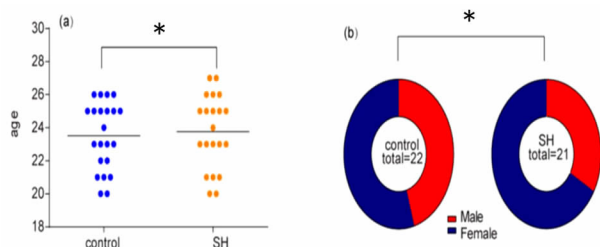


图1 实热上火组与正常对照组的年龄和性别比较

注:control:正常对照组,SH:实热上火组,(a)实热上火组与正常对照组的年龄比较,(b)实热上火组与正常对照组的性别比较。与正常对照组比较,* $P > 0.05$

1.2 诊断标准 采用专家咨询法,通过多轮的专家咨询,确定的“上火”的诊断标准:1个主症(头面部症状)或2个次症(至少1个为头面部症状)。其中“上火”头面部主症:牙龈肿痛、咽喉肿痛、口臭、口腔溃疡、鼻疮疖、热疮(颜面部疱疹)、口苦、目赤干涩;“上火”头面部次症:口角糜烂、目眵增多、舌痛、口渴、鼻衄、鼻腔干燥、齿衄、痤疮、声音嘶哑、头痛;非头面部症状:大便干结、心烦、小便黄、多食易饥、

五心烦热、痔疮发作、潮热、失眠^[7]。

1.3 纳入标准 实热“上火”的纳入标准为:1)1个主症+舌象或脉象,其中主证为:眼眵或痰或涕等分泌物增多、黄稠,发热或恶热、目赤、面红、牙龈肿痛、大便秘结;舌脉为舌红苔黄燥、脉数有力^[7]。2)平和质健康人群(作为正常对照组),符合《中医体质分类与判定》^[8]中平和质的判定标准;3)年龄18~60周岁;4)自愿参加本实验研究并同意签署临床研究知情同意书者。

1.4 排除标准 1)不符合纳入标准者;2)合并精神病、肿瘤、自身免疫性疾病以及系统靶器官严重病变等疾病的患者;3)妊娠及哺乳期的妇女;4)研究中认为有任何不适宜入选的情况^[7]。

1.5 试剂与仪器 iTRAQ 试剂盒(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA),胰蛋白酶(Sigma, St. Louis, MO, USA)。Agilent MARS-14柱(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA),旋转真空浓缩器RVC 2-25,Christ, Osterode, Germany),旋转真空浓缩器(RVC 2-25, Christ, Osterode, Germany),聚乙烯基柱($2.1 \times 100 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, $200 \mu\text{m}$; Nest Group, Inc., Southborough, MA, USA), ZORBAX 300SB-C18柱($5 \mu\text{m}$, $200 \text{ \AA}$, $0.1 \times 150 \text{ mm}$, Microm, Auburn, CA, USA), Triple TOF 5600系统(Applied Biosystems)。

1.6 方法

1.6.1 酶解与 iTRAQ 标记 将每组样本的血清混合,根据 iTRAQ 试剂盒说明书对各组血清样品进行 iTRAQ 标记。为了富集低丰度蛋白,使用 Agilent MARS-14 柱去除 14 种高丰度蛋白,包括白蛋白, IgG 和触珠蛋白等,然后蛋白质被浓缩和脱盐,通过 Bradford 方法定量蛋白质样品的洗脱液。将每组的蛋白质样品($100 \mu\text{g}$)还原,烷基化,并用胰蛋白酶在 37°C 下消化过夜。正常对照组和实热上火组分别应用 115 和 118 试剂标记。

1.6.2 MS/MS 鉴定与数据分析 iTRAQ 试剂将 2 个样品组混合,脱盐和干燥。通过强阳离子交换(SCX)液相色谱法使用聚乙烯基柱将 iTRAQ-标记的肽分段。总共收集 10 个 SCX 组分,浓缩并溶解。随后加载样品到 ZORBAX 300SB-C18 柱。组件进行 SCX 色谱法到 MS 分析 2 次。峰面积的比率的 iTRAQ 报告离子反映了相对丰富的肽和蛋白质。蛋白使用 ProteinPilotTM 软件(Applied Biosystems, Version 4.2)进行鉴定和定量,使用 ProGroup 算法识别肽,MS/MS 数据通过人类国际蛋白指数数据库(HIPI, version 3.87)搜索^[9-10]。统计分析以组间表达差

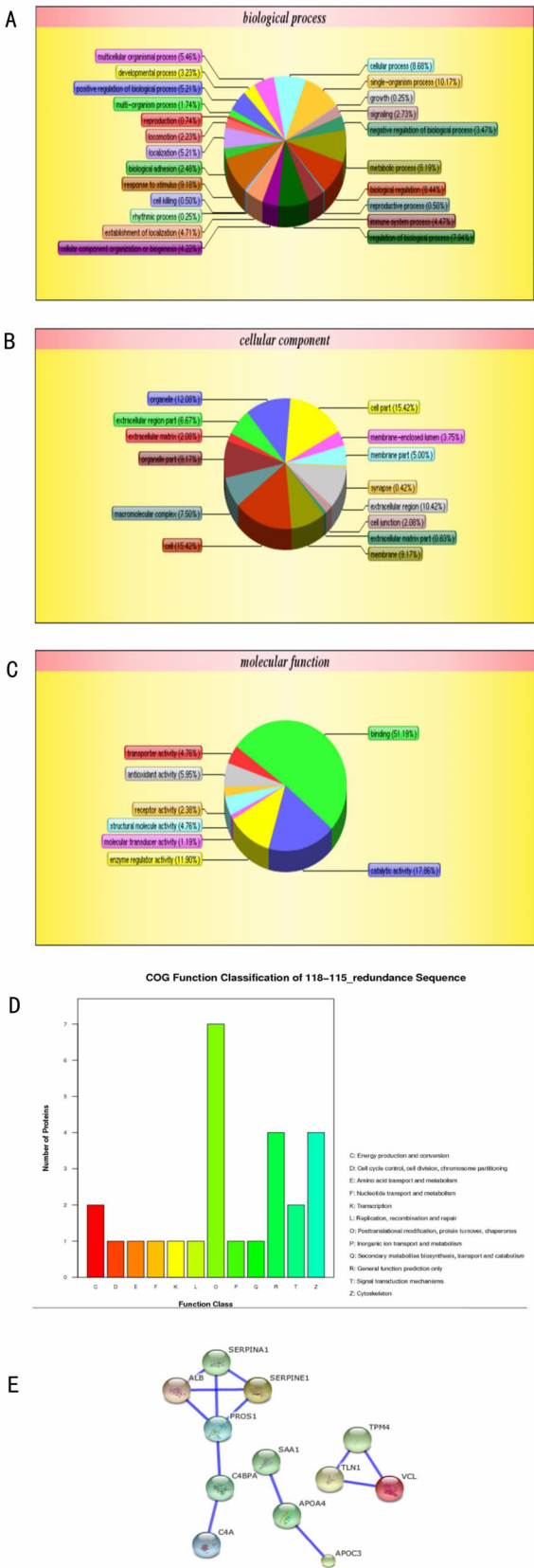


图 2 数据采集的实热“上火”血清蛋白生物标志物分析
注:(A)生物过程;(B)细胞成分;(C)分子功能;(D) COG 功能分类;(E)通过 String 软件分析的蛋白质网络作用图

异 >1.5(上调)或 <0.5(下调),且以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,筛选差异蛋白质。

1.6.3 生物信息学分析 差异表达蛋白质的细胞组分,分子功能和生物学过程通过 Gene Ontology (GO)数据库进行分析,相互作用网络通过 STRING 软件分析 (<http://string-db.org/>) 分析,相互作用可信度为 0.9(可信度最大值为 1),并且将鉴定到的蛋白质和 COG(Cluster of Orthologous Groups of proteins 蛋白相邻类的聚簇)数据库进行比对,预测这些蛋白质可能的功能并对其做功能分类统计。

2 结果

2.1 血清蛋白质组鉴定分析结果 使用 iTRAQ-2D LC-MS/MS 筛选对照组与实热“上火”组差异蛋白,实验重复 2 次,2 次鉴定结果中共有蛋白质取 2 次鉴定的平均值,分别鉴定的以当次结果为准。使用 R 程序包 TopGO,选取 $P < 0.05$ 的富集结果,使用 string database 进行分析,相互作用可信度为 0.9。

2.2 观察组与对照组血清差异表达蛋白 进一步筛选到观察组与对照组间 49 个差异表达蛋白,包括 22 个表达上调蛋白(>2.0 倍, $P < 0.05$)(表 1)和 27 个下调蛋白(<0.5 倍, $P < 0.05$)(表 2)。见表 1-2。GO 富集分析差异化表达的蛋白质主要参与单一生物过程(10.17%)、刺激应答(9.18%)和生物调节(8.44%)(图 2A)此外,蛋白质集中定位于细胞(15.42,15.42%)和细胞器(12.08%)(图 2B),多数具有结合(51.19%)、催化活性(17.86%)酶调节活性(11.90%)(图 2C)。该 COG 功能分类图显示:蛋白质功能主要集中在次生代谢产物生物合成、转运、分解代谢(7 个蛋白质)(图 2D)。蛋白质相互作用网络图集中指向纤溶-凝血-补体系统,以及脂质代谢异常(图 2E)。

2.3 血清差异蛋白筛选与鉴定 观察组与对照组存在显著差异的 49 个蛋白质中,经过筛选鉴定,发现和“上火”病证相关的主要差异蛋白有载脂蛋白(ApoC3、ApoA4)、补体蛋白(C4A、C4BPA)、炎症因子(SAA1、CRP)、凝血功能相关因子类(PROS1、A1AT、PAI-1)、糖酵解相关酶 LDH 及抗氧化蛋白酶 SOD3 等。

3 讨论

载脂蛋白是一类家族较庞大的蛋白,包括 A、B、C、E 族等,脂质必须和载脂蛋白结合才能正常转运,与脂质代谢的平衡息息相关。载脂蛋白(Apo)C3 和 A4 基因,它们是 ApoA1/C3/A4/A5 基因簇的成员,在脂质代谢中起重要作用,其多态性变异可导致高

表 1 实热“上火”与正常人群相比显著上调的差异蛋白质 (22 个)

Proteins	Name	Gene	Name	Model/Control	Style
sp P08519 APOA_HUMAN	Apolipoprotein (a) OS = Homo sapiens GN = LPA PE = 1 SV = 1	LPA		50. 0556034	Up
sp P30041 PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6 OS = Homo sapiens GN = PRDX6 PE = 1 SV = 3	PRDX6		5. 09675547	Up
sp Q9UNZ2 NSF1C_HUMAN	NSFL1 cofactor p47 OS = Homo sapiens GN = NSFL1C PE = 1 SV = 2	NSFL1C		3. 872576	Up
sp O75636 FCN3_HUMAN	Ficolin-3 OS = Homo sapiens GN = FCN3 PE = 1 SV = 2	FCN3		3. 47271311	Up
sp P02656 APOC3_HUMAN	Apolipoprotein C-III OS = Homo sapiens GN = APOC3 PE = 1 SV = 1	APOC3		2. 97993696	Up
sp P04003 C4BPA_HUMAN	C4b-binding protein alpha chain OS = Homo sapiens GN = C4BPA PE = 1 SV = 2	C4BPA		2. 84976804	Up
sp P02768 ALBU_HUMAN	Serum albumin OS = Homo sapiens GN = ALB PE = 1 SV = 2	ALB		2. 69156301	Up
sp Q06323 PSME1_HUMAN	Proteasome activator complex subunit 1 OS = Homo sapiens GN = PSME1 PE = 1 SV = 1	PSME1		2. 6546061	Up
sp P36980 FHR2_HUMAN	Complement factor H-related protein 2 OS = Homo sapiens GN = CFHR2 PE = 1 SV = 1	CFHR2		2. 61954355	Up
sp P01009 A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin OS = Homo sapiens GN = SERPINA1 PE = 1 SV = 3	SERPINA1		2. 58991843	Up
sp Q86UX7 URP2_HUMAN	Fermitin family homolog 3 OS = Homo sapiens GN = FERMT3 PE = 1 SV = 1	FERMT3		2. 55858588	Up
sp P04264 K2C1_HUMAN	Keratin,type II cytoskeletal 1 OS = Homo sapiens GN = KRT1 PE = 1 SV = 6	KRT1		2. 53121793	Up
sp Q96KN2 CNDP1_HUMAN	Beta-Ala-His dipeptidase OS = Homo sapiens GN = CNDP1 PE = 1 SV = 4	CNDP1		2. 52800405	Up
sp P07225 PROS_HUMAN	Vitamin K-dependent protein S OS = Homo sapiens GN = PROS1 PE = 1 SV = 1	PROS1		2. 42580152	Up
sp P00338 LDHA_HUMAN	L-lactate dehydrogenase A chain OS = Homo sapiens GN = LDHA PE = 1 SV = 2	LDHA		2. 31206489	Up
sp Q14766 LTBP1_HUMAN	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1 OS = Homo sapiens GN = LTBP1 PE = 1 SV = 4	LTBP1		2. 18498403	Up
sp P13489 RINI_HUMAN	Ribonuclease inhibitor OS = Homo sapiens GN = RNHI PE = 1 SV = 2	RNHI		2. 12813902	Up
sp P23528 COF1_HUMAN	Cofilin-1 OS = Homo sapiens GN = CFL1 PE = 1 SV = 3	CFL1		2. 12695706	Up
sp Q14520 HABP2_HUMAN	Hyaluronan-binding protein 2 OS = Homo sapiens GN = HABP2 PE = 1 SV = 1	HABP2		2. 10429043	Up
sp P02741 CRP_HUMAN	C-reactive protein OS = Homo sapiens GN = CRP PE = 1 SV = 1	CRP		2. 07725793	Up
sp P00450 CERU_HUMAN	Ceruloplasmin OS = Homo sapiens GN = CP PE = 1 SV = 1	CP		2. 05986845	Up
sp O95747 OXSRI_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase OSR1 OS = Homo sapiens GN = OXSRI PE = 1 SV = 1	OXSRI		2. 01372409	Up

表 2 实热“上火”与正常人群相比显著下调的差异蛋白质 (27 个)

Proteins	Name	Gene	Name	Model/Control	Style
sp P19971 TYPH_HUMAN	Thymidine phosphorylase OS = Homo sapiens GN = TYMP PE = 1 SV = 2	TYMP		0. 4875285	Down
sp P08294 SODE_HUMAN	Extracellular superoxide dismutase[Cu-Zn] OS = Homo sapiens GN = SOD3 PE = 1 SV = 2	SOD3		0. 47519499	Down
sp P01609 KV117_HUMAN	Ig kappa chain V-I region Scw OS = Homo sapiens PE = 1 SV = 1	IGKV		0. 4655861	Down
sp P37802 TAGL2_HUMAN	Transgelin-2 OS = Homo sapiens GN = TAGLN2 PE = 1 SV = 3	TAGLN2		0. 44902885	Down
sp P0DJ19 SAA2_HUMAN	Serum amyloid A-2 protein OS = Homo sapiens GN = SAA2 PE = 1 SV = 1	SAA2		0. 44055489	Down
sp P04220 MUCB_HUMAN	Ig mu heavy chain disease protein OS = Homo sapiens PE = 1 SV = 1	MUCB		0. 42923856	Down
sp Q9BS26 ERP44_HUMAN	Endoplasmic reticulum resident protein 44 OS = Homo sapiens GN = ERP44 PE = 1 SV = 1	ERP44		0. 4207266	Down
sp P06727 APOA4_HUMAN	Apolipoprotein A-IV OS = Homo sapiens GN = APOA4 PE = 1 SV = 3	APOA4		0. 41688704	Down
sp P0C0L4 C04A_HUMAN	Complement C4-A OS = Homo sapiens GN = C4A PE = 1 SV = 2	C4A		0. 41548924	Down
sp P01834 IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region OS = Homo sapiens GN = IGKC PE = 1 SV = 1	IGKC		0. 41066755	Down
sp P05121 PAI1_HUMAN	Plasminogen activator inhibitor 1 OS = Homo sapiens GN = SERPINE1 PE = 1 SV = 1	SERPINE1		0. 40926069	Down
sp P69905 HBA_HUMAN	Hemoglobin subunit alpha OS = Homo sapiens GN = HBA1 PE = 1 SV = 2	HBA1		0. 36962521	Down
sp P18206 VINC_HUMAN	Vinculin OS = Homo sapiens GN = VCL PE = 1 SV = 4	VCL		0. 36432648	Down
sp P67936 TPM4_HUMAN	Tropomyosin alpha-4 chain OS = Homo sapiens GN = TPM4 PE = 1 SV = 3	TPM4		0. 34783313	Down
sp Q9Y490 TLN1_HUMAN	Talin-1 OS = Homo sapiens GN = TLN1 PE = 1 SV = 3	TLN1		0. 34227319	Down
sp P0DJ18 SAA1_HUMAN	Serum amyloid A-1 protein OS = Homo sapiens GN = SAA1 PE = 1 SV = 1	SAA1		0. 33253664	Down
sp O14791 APOL1_HUMAN	Apolipoprotein L1 OS = Homo sapiens GN = APOL1 PE = 1 SV = 5	APOL1		0. 32002056	Down
sp P30498 IB78_HUMAN	HLA class I histocompatibility antigen,B-78 alpha chain OS = Homo sapiens GN = HLA-B PE = 1 SV = 1	HLA-B		0. 30760971	Down
sp Q15691 MARE1_HUMAN	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 OS = Homo sapiens GN = MAPRE1 PE = 1 SV = 3	MAPRE1		0. 29376501	Down
sp P0C0L5 C04B_HUMAN	Complement C4-B OS = Homo sapiens GN = C4B PE = 1 SV = 2	C4B		0. 25242271	Down
sp O95810 SDPR_HUMAN	Serum deprivation-response protein OS = Homo sapiens GN = SDPR PE = 1 SV = 3	SDPR		0. 19668598	Down
sp P54727 RD23B_HUMAN	UV excision repair protein RAD23 homolog B OS = Homo sapiens GN = RAD23B PE = 1 SV = 1	RAD23B		0. 1485936	Down
sp Q9H4M9 EHD1_HUMAN	EH domain-containing protein 1 OS = Homo sapiens GN = EHD1 PE = 1 SV = 2	EHD1		0. 1127197	Down
sp P35579 MYH9_HUMAN	Myosin-9 OS = Homo sapiens GN = MYH9 PE = 1 SV = 4	MYH9		0. 09950321	Down
sp Q12923 PTN13_HUMAN	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 13 OS = Homo sapiens GN = PTPN13 PE = 1 SV = 2	PTPN13		0. 09404095	Down
sp P52565 GDIR1_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 1 OS = Homo sapiens GN = ARHGDI1 PE = 1 SV = 3	ARHGDI1		0. 04570882	Down
sp O00299 CLIC1_HUMAN	Chloride intracellular channel protein 1 OS = Homo sapiens GN = CLIC1 PE = 1 SV = 4	CLIC1		0. 01870682	Down

脂血症,是心血管疾病的易感因素。ApoC3 是有效抑制 VLDL-TG 水解作用的重要因子,浓度升高见于

代谢综合征、动脉粥样硬化等,是形成心血管疾病的危险因子。ApoC3 也能激活 NF-κB 和单核细胞,促

进各种炎症反应和导致动脉粥样硬化。ApoA4 参与乳糜微粒合成和分泌,并参与胆固醇逆向转运,是高密度脂蛋白(HDL)和乳糜微粒(CM)的主要成分,具有抗炎和抗动脉硬化的属性,是一种重要的“内源性”抗氧化剂^[11]。C 反应蛋白(CRP)是机体在理化因素、肿瘤、外伤、感染等刺激下由肝脏合成而产生的急性时相反应蛋白,可反映疾病严重程度和转归情况,感染或非感染性炎症反应时血清 CRP 明显升高,因此常常作为诊断感染的生物学指标^[12]。综上所述,结果显示观察组 CRP 和 ApoC3 显著上调,ApoA4 显著下调,说明观察组的脂质代谢异常,抗炎、抗氧化能力降低与炎症反应的发生密切相关。

超氧化物歧化酶(SOD)在机体中作为重要的防御体系,能消除新陈代谢过程中产生的有害物质,其有 3 种亚型:胞质内的 SOD1、线粒体内 SOD2 及细胞外 Cu/Zn-SOD(SOD3)^[13]。Cu/Zn-SOD 因其重要的生理功能和巨大的治疗潜能,被认为是超氧化物歧化酶家族最重要的一类酶。研究表明 Cu/Zn-SOD 具有抗血管生成和抗炎作用,可通过阻止免疫细胞浸润和抑制白细胞与血管内皮细胞黏着参与免疫应答,其不仅可作为一种抗氧化剂,而且还能作为信号传播的一个控制器,参与信号传导。目前通过基因敲除和转基因越来越多的研究结果揭示,SOD3 与衰老、高血压、糖尿病、细胞凋亡与增生等相关^[14-16]。本研究发现观察组 SOD3 表达显著降低,推测实热“上火”引起的炎症反应、抗氧化能力降低等症状与 SOD3 的变化密切相关。观察组多发生局部炎症反应,如口腔溃疡、牙龈炎等,本课题代谢组学结果发现,患者血中乳酸出现上调,推测炎症反应部位物质分解代谢加快,组织耗氧量增加,局部出现微循环障碍,影响氧供应,引发无氧糖酵解增强,释放的乳酸未能及时被清除,在血液中堆积^[7]。乳酸脱氢酶(LDH)是一种糖酵解酶,广泛存在于机体各种组织中,其中以心肌、骨骼肌和肾脏含量最为丰富,当组织细胞受到炎症反应等损伤时会释放到细胞外,导致血中含量明显增加。本研究发现 LDH 表达显著升高,结合同批次人群代谢组学结果乳酸含量的升高,证实实热“上火”情况下糖酵解增强。

此外,研究观察组炎症反应及免疫相关差异蛋白均存在于凝血与补体级联反应信号通路,是内源性凝血激活途径和经典补体激活途径的重要调节蛋白。在细胞信号传导中蛋白并不是孤立存在的,众多的蛋白在同一条生化反应途径中执行各自的生理

功能,不同的蛋白信号通路通过媒介又相互联系,在凝血与补体级联反应信号通路中,补体 C4 具有中和病毒的生物学活性,可水解为 C4A、C4B,它们在补体活化、促进吞噬、防止免疫复合物沉着和中和病毒等方面发挥作用。补体 C4BP 是一种可溶性血浆糖蛋白,是补体激活经典途径中一个重要调节蛋白^[17]。维生素 K 依赖蛋白 S (PROS1) 是参与补体活化过程调控的一种血浆蛋白质,PROS1 能与 C4BP 结合,参与补体活化,补体的过度(异常)活化可以引起炎症反应及组织损伤。同时 PROS1 也是一种抗凝血因子,可以作为辅因子激活蛋白 C,抑制血液凝固^[18]。SERPINA1 基因编码的蛋白 α 1-抗胰蛋白酶(A1AT) 的升高能够抑制凝血酶活性,抑制血纤维蛋白凝血酶原的生成,从而抑制纤维蛋白凝块降解^[17]。SERPINE1 基因编码的蛋白纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 是纤溶酶原激活剂 tPA 和 uPA 的主要抑制剂,是纤溶系统的主要调节因子,PAI-1 不仅在纤溶过程和维持凝血和纤溶的动态平衡中有作用,在体内许多的生理过程中都有作用,例如能抑制蛋白的降解,如凝血、结缔组织演变、补体激活、炎症反应过度反应等^[19-20]。PAI-1 表达降低可引起纤溶(酶)活性异常增强,影响凝血功能,造成出血,说明观察组的凝血功能下降。

综上所述,观察组的症状可能通过纤溶-凝血-补体级联反应信号通路引起,该信号通路上的差异蛋白可作为“上火”生物学基础研究的潜在靶点。另外该信号通路间接激活炎症反应,载脂蛋白、SOD3 的变化引起抗氧化能力降低可能是实热“上火”表征的另一路径或靶向治疗的关注点。

参考文献

- [1] 马捷,宋月晗,梁嵘,等. “上火”科学内涵的文献研究[J]. 中医学报,2016,31(3):372-375.
- [2] 李思敏,包洁,梅雨君,等. 论“上火”与饮食[J]. 黑龙江中医药,2015,44(2):6-7.
- [3] 唐晓阳,谢冠群,范永升. 现代医学对上火的认识及其对中医治疗的启示[J]. 浙江临床医学,2013,15(3):389-390.
- [4] Gianazza E, Miller I, Palazzolo L, et al. With or without you-Proteomics with or without major plasma/serum proteins[J]. J Proteomics,2016(140):62-80.
- [5] 王秋红,王悦,杨欣,等. 基于 iTRAQ 技术的血清蛋白质组学研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,1(1):5-7.
- [6] Anderson NL, Matheson AD, Steiner S. Proteomics: applications in basic and applied biology[J]. Curr Opin Biotechnol,2000,11(4):408-412.

- herbal medicine treatment on recurrent aphthous stomatitis;a systemic review[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015 (10) : 107-115.
- [7] 张玉华. 口腔溃疡治疗方法研究进展[J]. *中国民康医学*, 2012, 24(10) : 1240-1241.
- [8] 杨秀丽, 薛长松, 范红梅. 复方口腔溃疡膏治疗口腔粘膜溃疡的疗效观察[J]. *中医药信息*, 2002, 19(4) : 48.
- [9] 王德玉. 徐氏三白汤临床运用举隅[J]. *浙江中医杂志*, 2006, 41(1) : 42-43.
- [10] Lee K, Lee B, Lee MH. Effect of Ampelopsis Radix on wound healing in scalded rats [J]. *BMC complementary and alternative medicine*, 2015, 15(1) : 213.
- [11] 高梦珊, 刘帅, 王爱武, 等. 口溃宁颗粒治疗 50 例复发性口腔溃疡疗效观察[J]. *上海口腔医学*, 2016, 25(5) : 579-582.
- [12] 刘峰, 焦亚男. 白芨在口腔溃疡治疗中的应用[J]. *中医临床研究*, 2015, 7(8) : 96-97.
- [13] 刘言振, 林鲁霞, 刘峰, 等. 双层复方白芨口腔贴膜的制备与临床应用[J]. *中医临床研究*, 2014, 6(10) : 17-18.
- [14] Lee YC, Wang TH, Chen SY, et al. Management of viral oral ulcers in children using Chinese herbal medicine: A report of two cases [J]. *Complementary Therapies in Medicine*, 2017(32) : 61.
- [15] 汤佩佩, 郭晓芳, 白明, 等. 白芨外用对疮疡模型的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27(3) : 702-705.
- [16] 杨花, 高昂, 赵兵, 等. 丝瓜络药学研究概况[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(34) : 20990-20991.
- [17] 梁婵婵. 丝瓜络红花汤熏洗治疗关节肿痛[J]. *中国民间疗法*, 2016, 24(7) : 55.
- [18] 李金生, 张茜, 张涛, 等. 中药络石藤的研究进展[J]. *河北中医药学报*, 2016, 31(2) : 55-58.
- [19] 吕卓, 梁韬. 中药合剂治疗豚鼠口腔溃疡的效果[J]. *广西医学*, 2016, 38(4) : 461-463.
- [20] Jin Y, Lin X, Song L, et al. The Effect of Pudilan Anti-Inflammatory Oral Liquid on the Treatment of Mild Recurrent Aphthous Ulcers [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017(2017) : 6250892.
- [21] 谢志军, 王伟杰. 上火病因病机初探[J]. *浙江中医药大学学报*, 2013, 37(3) : 226-228.
- [22] 李思敏, 包洁, 梅丽君, 等. 论“上火”与饮食[J]. *黑龙江中医药*, 2015, 44(2) : 6-7.
- [23] 彭玉梅. 口腔溃疡动物实验模型的建立[J]. *北京口腔医学*, 2008, 16(2) : 85-86.
- [24] 林玲, 魏巍, 吴疆. 白芨的化学成分和药理作用研究进展[J]. *药物评价研究*, 2012, 35(5) : 391-392.
- [25] 杨花, 高昂, 赵兵, 等. 丝瓜络药学研究概况[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(34) : 20990-20991.

(2017-11-03 收稿 责任编辑: 张文婷)

(上接第 2901 页)

- [7] 周佳, 吴德鸿, 韦双双, 等. 基于 GC-MS 对中医实热“上火”血清代谢特征的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(4) : 1789-1792.
- [8] 中华中医药学会. 中医体质分类与判定[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009.
- [9] Wang YS, Cao R, Jin H, et al. Altered protein expression in serum from endometrial hyperplasia and carcinoma patients [J]. *J Hematol Oncol*, 2011, 4(1) : 15.
- [10] Jin GZ, Li Y, Cong WM, et al. 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) : 3418-3428.
- [11] Kang SH, Kim YR, Hong SH. Synergic effects of the ApoC3 and ApoA4 polymorphisms on the risk of hypertension [J]. *Genes & Genom*, 2017(39) : 1-10.
- [12] Wu JJ, Rowan CG, Bechuk JD, et al. Association between tumor necrosis factor inhibitor (TNFi) therapy and changes in C-reactive protein (CRP), blood pressure, and alanine aminotransferase (ALT) among patients with psoriasis, psoriatic arthritis, or rheumatoid arthritis [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2015, 72(5) : 917-919.
- [13] Batinić-Haberle I, Tovmasyan A, Roberts ER, et al. SOD therapeutics: latest insights into their structure-activity relationships and impact on the cellular redox-based signaling pathways [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(15) : 2372-2415.
- [14] Jiang W, Tang L, Zeng J, et al. Adeno-associated virus mediated SOD gene therapy protects the retinal ganglion cells from chronic intraocular pressure elevation induced injury via attenuating oxidative stress and improving mitochondrial dysfunction in a rat model [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(2) : 799-810.
- [15] Doddigarla Z, Parwez I, Ahmad J. Correlation of serum chromium, zinc, magnesium and SOD levels with HbA1c in type 2 diabetes: A cross sectional analysis [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2016, 10(1 Suppl 1) : S126-S129.
- [16] Wei LF, Zhang HM, Wang SS, et al. Changes of MDA and SOD in brain tissue after secondary brain injury with seawater immersion in rats [J]. *Turk Neurosurg*, 2016, 26(3) : 384-388.
- [17] 张海燕, 张森, 吕顺武, 等. 凝血与补体级联反应信号通路对艾滋病湿热内蕴证发病的影响[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(6) : 694-698.
- [18] Rodriguez-Leal GA, Morn S, Corona-Cedillo R, et al. Portal vein thrombosis with protein C-S deficiency in a non-cirrhotic patient [J]. *World J Hepatol*, 2014, 6(7) : 532-537.
- [19] Agirbasli M, Eren M, Yasar S, et al. Functionally stable plasminogen activator inhibitor-1 in a family with cardiovascular disease and vitiligo [J]. *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 2014, 38(1) : 50-56.
- [20] Sahebkar A, Simental-Mendia LE, Watts GF, et al. Impact of fibrates therapy on plasma plasminogen activator inhibitor-1: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Atherosclerosis* 2015, 240(1) : 284-296.

(2017-11-03 收稿 责任编辑: 张文婷)