



论 文

黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候的尿液蛋白质组学研究

罗珂珂^{1,3†}, 陈昱臻^{2†}, 马媛¹, 李琦¹, 王宏洁¹, 王梦晓¹, 符蕤¹, 张馨方¹, 边宝林^{1*}, 高友鹤^{2*}, 周严严^{1*}

1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

2. 北京师范大学生命科学学院, 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室, 北京 100875

3. 河南中医药大学, 中医药科学院呼吸疾病中医药防治省部共建协同创新中心, 郑州 450046

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: blbian@icmm.ac.cn; gaoyouhe@bnu.edu.cn; yyzhou@icmm.ac.cn

收稿日期: 2025-11-27; 接受日期: 2026-06-11; 网络版发表日期: 2026-09-04

国家自然科学基金(批准号: 82404971)、经方与现代中药融合创新全国重点实验室开放课题(批准号: LSLSKL2024030)、中国中医科学院科技创新工程重点协同攻关项目(批准号: CI2023C057YLL)、中国中医科学院基本科研业务费优秀青年科技人才培养专项-创新类(批准号: ZZ15-YQ-038)、黔科合中引地(批准号: [2024]021)和黔科合人才(批准号: CXTD(2025)052)资助

摘要 本研究运用尿液蛋白质组学方法表征黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候的差异表达蛋白, 初步从尿液样本层面探讨其作用机制。选取32例符合纳入标准的“实热火毒”证候患者采集给药前后尿液, 且另外选取33例健康人员采集尿液。先对其尿蛋白进行提取、用Bradford法测定蛋白浓度、用滤器辅助样品制备的方法酶切尿蛋白, 后采用高效液相色谱-串联质谱技术筛选33例正常人员与32例“实热火毒”证候组患者尿液和32例“实热火毒”证候组患者与服用黄连解毒丸后尿液中差异表达的蛋白, 采用层次聚类分析和主成分分析区分样品, 用DAVID数据库对鉴定到的差异蛋白进行生物学过程和分子功能富集分析, 用京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集相关通路, 并检索文献对差异蛋白进行功能分析。“实热火毒”证候组与健康组筛选出差异蛋白473个, “实热火毒”证候给药前后筛选出差异蛋白283个, 其中两组共有且存在明显治疗趋势的差异蛋白有DRG2, SNX4, LANCL2等, 其可通过调节炎症反应、调控自噬通路、介导细胞因子释放等改善“实热火毒”证候。DAVID富集分析结果显示, 筛选出的差异蛋白主要参与细胞迁移、细胞内蛋白转运、囊泡介导的运输、免疫反应、三羧酸循环、糖酵解、脂质代谢过程的调节等生物学过程, KEGG富集分析主要包括细胞外基质-受体相互作用、三羧酸循环、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酮酸代谢、核苷酸糖的生物合成、AMPK信号通路等。“实热火毒”证候下尿液蛋白与健康状态、给药后的尿液蛋白差异显著, 大部分差异蛋白与上火或病毒感染相关, 同时黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候主要参与能量代谢过程, 尤其是三羧酸循环、糖酵解、AMPK信号通路等。本研究筛选出的差异表达蛋白或可作为“实热火毒”证候的潜在靶点, 为更深层次科学解释“实热火毒”证候打开新的窗口。

关键词 黄连解毒丸, “实热火毒”证候, 临床尿液样本, 蛋白质组学, 作用机制

引用格式: 罗珂珂, 陈昱臻, 马媛, 等. 黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候的尿液蛋白质组学研究. 中国科学: 生命科学, 2026, 56: 2226–2239
Luo K-K, Chen Y-Z, Ma Y, et al. A urinary proteomics study on Huanglian Jiedu Wan in the treatment of “excessive heat-toxin” syndrome (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2026, 56: 2226–2239, doi: 10.1360/SSV-2025-0388

《黄帝内经》的病机十九条中开始出现“火”这一概念内涵,即“诸热瞀瘵、诸痛痒疮、诸逆冲上、诸躁狂越、诸病浮肿、疼酸惊骇,皆属于火”^[1]。现代医学认为“实热火毒”证候是易感人群在疲劳、精神紧张、辛热饮食等一系列诱因作用下,导致机体发生能量代谢加快、氧化应激增强、菌群失调、免疫稳态破坏为主的内环境紊乱^[2]。中医学则认为,“实热火毒”证候与先天禀赋、感受六淫邪气、情志不畅、饮食不节等因素密切相关^[3]。其中症状重、来势猛的属实火,包括外邪上扰、邪热炽盛、湿热蕴结、肝郁化火等证候,实火属阳盛而热^[4]。实热火毒证的中医证候包括红肿热痛、口舌生疮、小便黄赤、咽喉肿痛、面红目赤、大便燥结等^[5]。

在临床中,中医治疗“实热火毒”证候的治法通常是清热泻火,黄连解毒丸作为本课题组研发的国内首个获批临床研究的中药证候类新药,源于经典名方黄连解毒汤,首载于东晋葛洪的《肘后备急方》^[6]。由黄连、黄芩、黄柏和栀子按3:2:2:3的比例配伍组成,具有清热泻火的作用,在临床中常用于治疗三焦实热火毒证^[7],其临床研究表明,在改善“实热火毒”证候患者咽喉肿痛、口鼻气热、燥苔症状、小便黄赤、大便燥结等方面具有显著优势。本课题组前期研究基础表明,“实热火毒”证候的发生与炎症-能量代谢-氧化应激密切相关,黄连解毒丸对其治疗机制与三磷酸腺苷(ATP)和三羧酸(TCA)循环有关^[8]。课题组前期多聚焦实热火毒证宏观症状与治疗“实热火毒”证候的经典方剂疗效关联、黄连解毒丸治疗实热火毒证候的生物标志物的研究,从血浆和唾液角度探索治疗机制,但是从尿液微观层面探讨黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候作用机制仍未阐明,本研究拟填补此空白。

在生物医学研究中,尿液生物样本具有显著优势,相较于其他体液,尿液样本具有采集过程简单、受试者依从性高等特点^[9]。另外尿液被认为不受稳态机制的调控,是接受、积累内环境稳态产生变化的体液,能够更敏感地反映机体病理生理改变^[10],因此采用尿液生物样本开展蛋白质组学研究,能更直观地观察差异表达蛋白,更能快速反映机体的“实热火毒”证候状态;随着蛋白质分离技术和质谱的发展,蛋白质组学已被广泛应用于临床样品的分析,可用于识别组织、细胞、体液中蛋白质的变化,其具有高敏感性、高特异性和高通量等特性,能提供有价值的疾病信息^[11]。尿蛋白质组学在寻找新的早期预测慢性肾脏病及诊断

的特异标志物中已显示出极大的临床应用潜力,本研究借助其优势开展探索,例如通过分析尿液样本中差异蛋白与“实热火毒”证候的关联,明确证候相关分子特征,有望为中医药现代化研究,在证候客观化、诊疗技术创新等方面,提供新的技术应用范例。

本实验旨在通过临床尿液样本中“实热火毒”证候给药前后和“实热火毒”证候组与健康组尿液蛋白中的差异表达蛋白,结合尿液蛋白质组学,系统探究黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候的内在机制,通过该研究,期望发挥尿液全面、系统、灵敏地反映机体状态的优势,分析“实热火毒”证患者的尿液蛋白质组学,为“实热火毒”证候领域研究打开新的窗口。

1 实验样本

天津中医药大学第二附属医院为临床研究责任单位,临床试验前由该院伦理委员会审核批准研究方案及知情同意书(批准文号:2019-037-02),其他临床试验研究单位也分别在试验前进行伦理审批或伦理记录。本研究收集天津中医药大学第二附属医院、黑龙江中医药大学第二附属医院、辽宁中医药大学附属医院、成都中医药大学附属医院、湖南中医药大学第一附属医院的门诊病例,运行时间为2020年6月至2021年3月。根据中医证候和临床表现的纳入和排除标准,结合西医诊断口腔溃疡、牙龈炎、急性咽炎和便秘。共采集229例受试者,选取黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候改善明显的32例患者开展尿液蛋白质组学分析。同时招募同时期入组的健康志愿者33例作为正常对照组^[12]。确诊为“实热火毒”证候的患者按照每次2袋,每日2次的原则服用由贵州百灵企业集团制药股份有限公司生产提供的规格为2.5 g/袋的黄连解毒丸。每例患者用药期至少3 d,用药至实热火毒证评价表中列出的主要症状消失或满5 d为准。

2 实验方法

2.1 实验技术路线

实验共设置3组受试对象,包含32名“实热火毒”证候用药前组、同一批32名“实热火毒”证候患者服用黄连解毒丸组以及33名健康志愿者对照组,流程(图1)依次为采集三组人群尿液样本,经尿液总蛋白提取与蛋

白酶解处理后, 采用非标记(label-free)液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)技术对样本进行蛋白质组学分析, 最终通过生物信息学方法筛选出“实热火毒”证候的特征差异蛋白、功能注释及富集通路。

2.2 尿液样品的处理

2.2.1 尿蛋白提取与定量

将收集到的尿液样本在4℃的条件下以12000×g离心30 min, 取上清液转移到新的离心管中。加入二硫苏糖醇溶液(dithiothreitol, DTT, Sigma, 美国)至终浓度为20 mmol/L, 涡旋混匀后金属浴37℃加热1 h, 冷却至室温。加入碘乙酰胺溶液(iodoacetamide, IAA, Sigma)至终浓度为50 mmol/L, 涡旋混匀后点甩, 室温避光反应40 min。加入四倍上清体积的预冷无水乙醇, 均匀混合后于-20℃沉淀36 h。4℃, 10000×g离心30 min后, 弃上清, 将蛋白沉淀重悬于适量裂解液中(8 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 25 mmol/L二硫苏糖醇, 50 mmol/L Tris), 得尿蛋白提取液, 用Bradford法测定蛋白浓度。

2.2.2 尿蛋白酶切

使用滤器辅助样品制备(FASP)的方法^[13], 取100 μg尿蛋白样品加入1.5 mL离心管中, 加入UA溶液(8 mol/L尿素, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 8.5)使总体积为200 μL。将200 μL UA溶液加入到10 kD超滤管(Pall, Port Washington, 美国)的滤膜上, 按照14000×g 10 min, 18℃的条件离心洗涤两次, 加入处理后的蛋白样品, 在14000×g, 40 min, 18℃条件下进行离心, 再加入200 μL UA溶液, 涡旋混匀后, 18℃, 14000×g离心40 min, 弃下层滤过液, 重复一次; 加入25 mmol/L

NH₄HCO₃溶液, 涡旋混匀后, 18℃, 14000×g离心40 min, 弃下层滤过液, 重复一次。更换新的套管, 加入100 μL NH₄HCO₃溶液, 以胰酶:蛋白为1:50的质量比加入胰蛋白酶(Trypsin Gold, Promega, 美国)进行消化, 37℃水浴过夜后收集溶有肽段的溶液。最后通过HLB柱(Waters, 美国)除盐, 用真空干燥仪抽干, 放入-80℃冰箱保存。

2.3 液相色谱-串联质谱分析

酶解后的样品加入0.1%的甲酸复溶, 使用BCA试剂盒对肽段进行定量, 将肽段浓度稀释为0.5 μg/μL, 以样品:iRT为10:1的体积比加入iRT试剂(Biognosis)。每个样品取1 μg通过EASY-nLC 1200色谱系统(Thermo Fisher Scientific, 美国)分离, 使用Orbitrap Fusion Lumos Tribrid质谱仪(Thermo Fisher Scientific)分析并采集质谱数据, 每个样本重复采集3次。每隔15针样品, 对汇集肽进行单次DIA分析, 作为整个分析过程的质量控制。

将样品以0.4 μL/min的流速加载到C18反相色谱柱(75 μm×2 cm, 3 μm)和反相分析柱(75 μm×25 cm, 2 μm), 使用流动相A(0.1%甲酸)、流动相B(80%乙腈+0.1%甲酸)梯度洗脱90 min: 0 min, 4% B相; 0~54 min, 20% B相; 54~72 min, 30% B相; 72~75.36 min, 50% B相; 75.36~82.12 min, 90% B相; 82.12~90 min, 2% B相。质谱运行时参数设置如下: 喷雾电压设置为2.5 kV, 在400~1200 *m/z*范围内获得完整的MS扫描, 分辨率为120000, MS/MS扫描在Orbitrap模式下采集, 扫描范围为200~2000 *m/z*, 分辨率为30000, 高能碰撞解离(HCD)能量为32%。

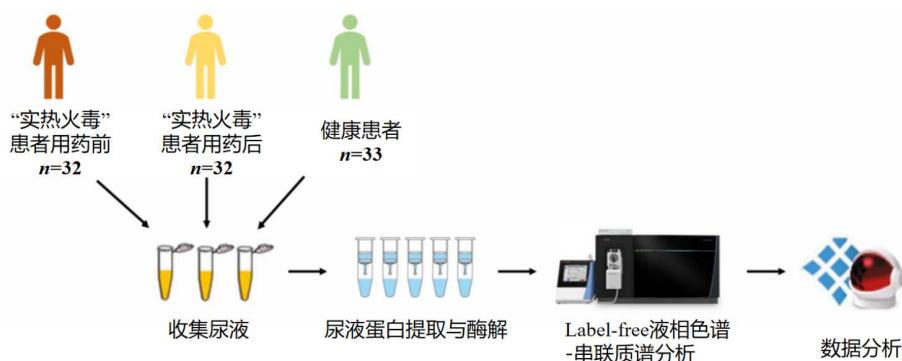


图1 探索“实热火毒”证候对机体尿液蛋白质组影响的技术路线

Figure 1 Technical route for exploring the impact of the “excessive heat and fire toxin” syndrome on the body’s urinary proteome

2.4 数据库搜索与数据处理

DIA采集结果导入Spectronaut Pulsar软件进行分析处理, 通过对MS2的各碎片离子峰面积求和计算肽强度, 将各自的肽强度相加计算蛋白质强度。

2.5 数据分析

分别比较健康组与“实热火毒”证候组、“实热火毒”证候给药前后鉴定到的蛋白。“实热火毒”证候组与健康组的比较中, 根据组间变化倍数(fold change, FC) ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 , 双尾非配对 t 检验分析 $P < 0.05$ 的标准筛选差异蛋白; “实热火毒”证候给药前后比较中, 根据FC ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 , 双尾配对 t 检验分析 $P < 0.05$ 的标准筛选差异蛋白。

使用微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)进行层次聚类分析(hierarchical cluster analysis, HCA)和主成分分析(principal component analysis, PCA), 使用UniProt网站(<https://www.uniprot.org/>)和DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行生物学分析, 并在PubMed数据库(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)与中国知网(<https://www.cnki.net/>)中检索文献, 对差异蛋白进行功能分析。

3 结果与讨论

对“实热火毒”证候给药前后及健康组共97个样品进行LC-MS/MS分析, 按每个蛋白特异性多肽 ≥ 2 个, 蛋白质水平错误发现率FDR $< 1\%$ 的标准, 总共鉴定到4183个蛋白。

3.1 “实热火毒”证候组与健康组比较分析

3.1.1 “实热火毒”证候组与健康组对比尿液蛋白质鉴定情况

比较“实热火毒”证候组患者与健康组个体尿液, 根据FC ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 , 双尾非配对 t 检验 $P < 0.05$ 的标准, 共鉴定到473个差异蛋白, 差异蛋白的详细信息列于网络版附表1。对鉴定到的差异蛋白进行层次聚类分析与主成分分析(图2; 网络版附图1), 可大致区分“实热火毒”证候组和健康组的样品。

3.1.2 “实热火毒”证候组与健康组对比鉴定到的差异蛋白分析

为了评估本研究鉴定到的差异蛋白随机产生的可

能性, 本研究基于Python代码对其结果进行验证, 结果显示, 至少69.21%的差异蛋白不是随机产生的, 标准差为9.57%(表1)。随后, 使用PubMed数据库和中国知网对473个差异蛋白进行功能分析, 发现多个蛋白被报道与“实热火毒”证候或病毒感染相关。差异蛋白中 P 值最小的前10位、FC值最大的前10位及最小的前10位差异蛋白信息见表2。

经鉴定共得到28个差异蛋白, 其中ELAC2, RGL2, PC, TFIIC, GBF1, DCTD, LANCL2蛋白是本研究发现的最为显著的差异蛋白。ELAC2(FC=0, $P=1.23 \times 10^{-3}$)参与线粒体tRNA加工、tRNA 3'端加工、tRNA降解等生物学过程。研究表明, 突变体ELAC2中RNase Z活性受损会干扰线粒体翻译, 影响细胞能量代谢^[24]; RGL2(FC=0.05, $P=1.55 \times 10^{-9}$)属于RalGDS家族成员, RalGDS是Ras信号通路中的下游效应分子。Ras蛋白是调节多种细胞功能的关键分子, 可通过RalGDS, PI3-K等下游效应分子调节细胞增殖、存活、凋亡和死亡, 单纯疱疹病毒1型(herpes simplex virus 1, HSV-1)以Ras依赖的方式在感觉神经元中建立潜伏感染^[14,15]; PC(FC=0.02, $P=2 \times 10^{-3}$)也是鉴定得到的与能量相关的差异表达蛋白。与课题组前期发现TCA循环是实热“实热火毒”证候人群中能量代谢相关的主要变化之一^[26], 相同的是; HSV-1通过丙酮酸羧化酶增强TCA循环的回补反应, 促进草酰乙酸生成, 支持嘧啶核苷酸的生物合成, 促进病毒复制^[25]。TFIIC是一种多功能蛋白质复合物^[16], 是HSV-1基因转录和复制所必需的, 敲低TFIIB可下调HSV-1基因表达, 且病毒复制减少7倍以上。GBF1(FC=0.03, $P=7.40 \times 10^{-6}$)是多种RNA病毒感染的宿主因子^[21], 其磷酸化会引起高尔基体囊泡化, 从而抑制病毒复制^[22], 有潜力成为开发广谱抗病毒疗法的靶标。DCTD(FC=0.12, $P=5.87 \times 10^{-5}$)参与DNA单核苷酸前体dTTP合成的主要途径。HSV感染BHK-21/C13细胞后, 诱导deoxycytidylate deaminase活性显著增加^[23]。LANCL2(FC=25.51, $P=5.6 \times 10^{-3}$), 研究发现在脱落酸的作用下, LANCL2被激活, 可减少过度神经炎症与A β 沉积^[28]。Neprilysin(FC=2, $P=1.3 \times 10^{-7}$), HSV-1感染可调节NEP的转录和表达^[20]。

同时还鉴定到差异蛋白L-lactate dehydrogenase A chain, L-lactate dehydrogenase B chain, Fermitin family homolog 3, Keratin, type II cytoskeletal 1, EH domain-containing protein 1。研究发现, 与正常对照组相比, “实

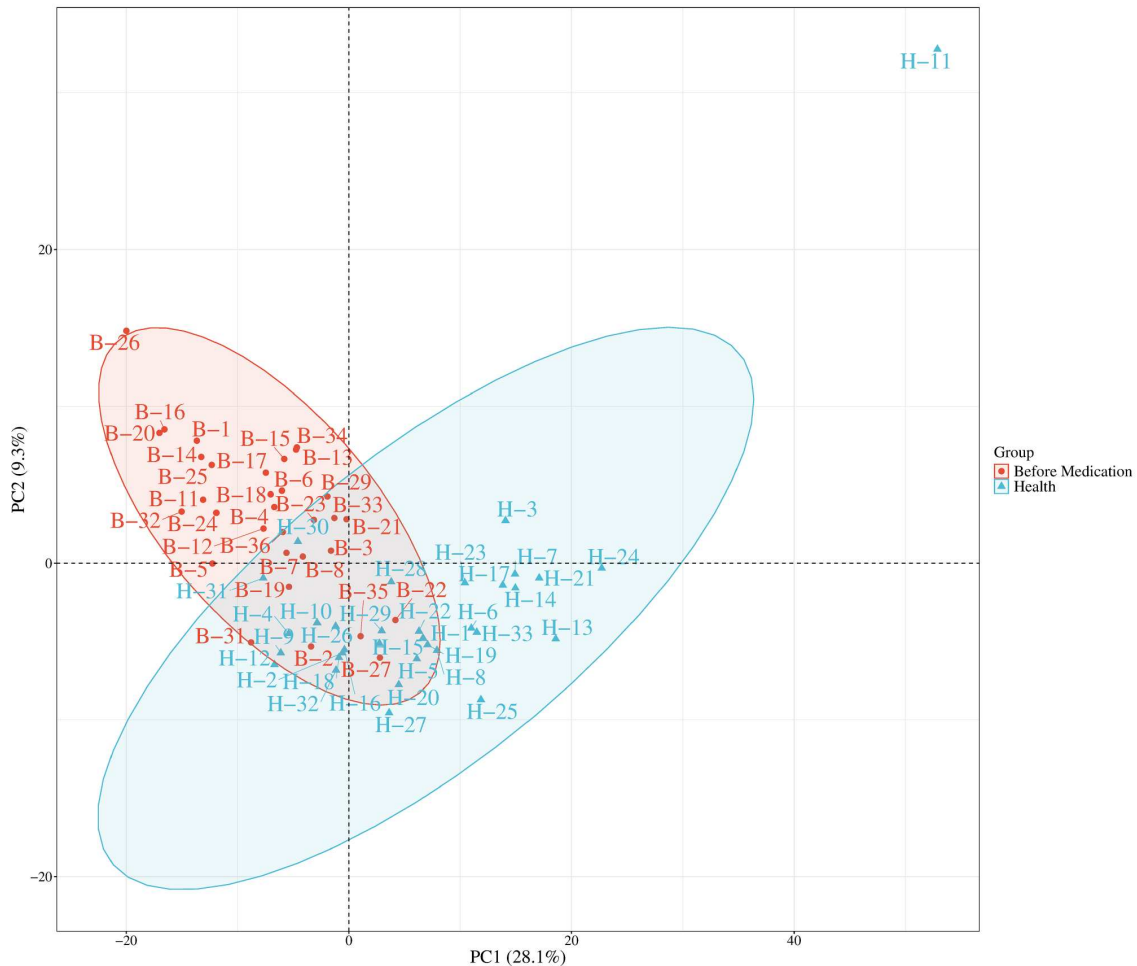


图 2 “实热火毒”证候组和健康组对比鉴定到的差异蛋白主成分分析结果

Figure 2 Principal component analysis results of differential proteins identified in the comparison between the “excessive heat-toxin” syndrome group and the healthy group

热火毒”证候人群血清中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、Fermitin family homolog 3、Keratin, type II cytoskeletal 1显著上调, EH domain-containing protein 1显著下调, 可能与机体糖酵解异常和炎症反应密切相关^[29]。

此外, “实热火毒”证候属于中医“热证”范畴, 实热证和虚热证都存在T细胞免疫功能紊乱, 其中Th3通过分泌TGF- β 和少量IL-4, IL-10促进sIgA分泌, 增强黏膜免疫力^[30]。本实验在“实热火毒”证候组与健康组比较鉴定到差异蛋白interleukin-4 receptor subunit alpha; “实热火毒”证候还与肠道菌群失调存在一定关联, 肠道菌群结构及功能失调可诱导氧化应激, 腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)活性

下降, 同时促炎因子分泌增多, sIgA分泌减少, 导致肠黏膜免疫屏障被破坏, 引发局部炎症反应^[30]。本研究也鉴定到差异蛋白AMPK, AMPK是细胞能量代谢的核心调控因子, 当细胞能量短缺时, 它会被激活, 一方面通过促进葡萄糖摄取、糖酵解及脂肪酸 β -氧化等分解代谢途径“开源”, 增加ATP生成; 另一方面通过抑制蛋白质、脂肪、糖原等合成代谢途径“节流”, 减少不必要的能量消耗, 最终实现细胞能量收支平衡, 维持机体能量代谢稳定。

3.1.3 “实热火毒”证候组与健康组对比富集到的生物学通路分析

使用DAVID数据库对“实热火毒”证候组和健康组

表 1 “实热火毒”证候组与健康组对比随机分组结果**Table 1** Random grouping results of comparison between “excessive heat and fire toxin” syndrome group and healthy group

抽样组别	差异蛋白数量	随机产生的差异蛋白数量	可靠差异蛋白占比
1	331	106.14	67.93%
2	446	103.97	76.69%
3	377	105.13	72.11%
4	261	97.83	62.52%
5	500	104.67	79.07%
6	341	104.63	69.32%
7	218	91.59	57.99%
8	210	102.31	51.28%
9	570	106.47	81.32%
10	368	96.13	73.88%

对比鉴定到的差异蛋白进行生物学过程和分子功能富集分析(网络版附图2A和B)。这些差异蛋白主要参与蛋白质定位于含CENP-A的染色质、端粒组织、巨核细胞分化的负调控、核小体组装、囊泡介导的运输、TCA循环、内吞作用、糖酵解、脂质代谢过程的调节、丙酮酸代谢等生物学过程。研究表明,实热“实热火毒”证候人群中能量代谢相关的变化主要集中在糖酵解、TCA循环、脂质代谢三个方面^[26]。在分子功能中,发现这些差异蛋白大多具有蛋白结合、染色质的结构成分、GTP结合等功能。

京都基因和基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析(网络版附图2C)结果显示,多个代谢相关通路被显著富集,如氨基酸的生物合成、碳代谢、TCA循环、半胱氨酸和蛋氨酸代谢、丙酮酸代谢、核苷酸糖的生物合成、氨基糖和核苷酸糖的代谢、戊糖磷酸途径、乙醛酸和二羧酸代谢、2-氧代羧酸代谢、果糖和甘露糖代谢、糖酵解/糖异生、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢、淀粉和蔗糖代谢等,同时还可富集到系统性红斑狼疮、中性粒细胞胞外陷阱形成、AMPK信号通路等通路。

3.2 “实热火毒”证候给药前后比较分析

3.2.1 “实热火毒”证候给药前后对比尿液蛋白质鉴定情况

比较“实热火毒”证候给药前后的患者尿液,根据 $FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67 ,双尾配对 t 检验 $P < 0.05$ 的标准,共鉴定

到283个差异蛋白,差异蛋白的详细信息列于网络版附表2。对鉴定到的差异蛋白进行层次聚类分析与主成分分析(图3;网络版附图3),可大致区分“实热火毒”证候给药前后的样品。

3.2.2 “实热火毒”证候给药前后鉴定到的差异蛋白分析

首先,在本研究中,通过第3.1.2节中的Python代码对差异蛋白结果进行随机验证,结果显示,至少34.16%的差异蛋白不是随机产生的,标准差为8.30%(表3)。其次,使用PubMed数据库和中国知网对283个差异蛋白进行功能分析,差异蛋白中 P 值最小的前10位、 FC 值最大的前10位及最小的前10位差异蛋白信息见表4。

给药前后对比分析也可鉴定到多个被报道与“实热火毒”证候或病毒感染相关的差异蛋白,如VAMP-3, EXOC4, RAI。全基因组关联分析发现,囊泡相关膜蛋白基因VAMP-3和VAMP-8的遗传变异与牙周炎风险增加相关^[31,32]。Entamoeba gingivalis可通过VAMP-8/VAMP-3介导的胞吐途径引发慢性炎症和组织破坏, VAMP-3和VAMP-8是治疗牙周炎的潜在靶点,有助于减轻牙周炎相关感染中组织损伤,保护黏膜完整性^[33]。EXOC-4家族成员EXOC-2是SARS-CoV-2感染的重要宿主因子之一,敲低EXOC-2可上调IFN γ 1表达,抑制SARS-CoV-2感染^[35]。RAI通过抑制NF- κ B和Sp1作用阻断HIV-1转录和复制^[34]。“实热火毒”状态下,机体免疫功能下降,疾病易感性增加^[36]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)在机体的免疫反应、炎症反应等过程中发挥重要作用,肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白2(TNFAIP2)是一种由TNF- α 诱导表达的蛋白质。使用TNF- α 和IL-1拮抗剂可有效缓解牙龈组织的炎症,减少附着结缔组织和骨组织损失^[37]。

研究分析发现,“实热火毒”证候组和健康组,“实热火毒”证候给药前后共有的差异蛋白有DRG2, SNX4, LANCL2等。Li^[38]和Ko等人^[39]指出,DRG2过表达可以消除SIRT1对ac-NF- κ B p65的脱乙酰化能力、增加IL-6 mRNA表达以及抑制Jurkat细胞的生长和聚集,从而增强炎症反应;DRG2还可通过增强过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)活性,从而抑制抗原呈递细胞中NF- κ B活性和IL-6的产生,阻碍TH17分化^[40],进而抑制炎症反应。SNX4是一类细胞能量调控蛋

表 2 “实热火毒”证候组与健康组对比P值最小的前10位、FC值最大的前10位及最小的前10位差异蛋白
Table 2 The top 10 differential proteins with the smallest P-values, the top 10 with the largest FC values, and the top 10 with the smallest FC values in the comparison between the “excessive heat and fire toxicity” syndrome group and the healthy group

UniProt数据库 蛋白编号	蛋白名称	差异倍数	P值	参考文献
O15211	Ral鸟嘌呤核苷酸解离刺激物2	0.05	1.55×10^{-9}	[14,15]
P22732	溶质载体家族2	2.54	4.69×10^{-8}	
Q9UKN8	普通转录因子ⅢC	0.03	6.26×10^{-8}	[16~19]
P08473		2.00	1.30×10^{-7}	[20]
Q93050	脑啡肽酶	3.01	1.87×10^{-7}	
A0PKJ1	溶质载体家族5成员10	3.56	5.21×10^{-7}	
P31431	多配体蛋白聚糖-4	2.74	6.60×10^{-7}	
P15144	氨肽酶N	1.51	6.66×10^{-7}	
Q1EHB4	Na ⁺ 偶联单羧酸转运蛋白	2.77	6.81×10^{-7}	
Q495M3	溶质载体家族36成员2	2.21	8.88×10^{-7}	
Q92538	高尔基体特异性布雷菲德菌素A抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子1	0.03	7.40×10^{-6}	[21,22]
P32321	胞苷脱氨酶	0.12	5.87×10^{-5}	[23]
Q9BQ52	elaC核糖核酸酶Z2	0	1.23×10^{-3}	[24]
P55039	发育调控GTP结合蛋白2抗体	13.76	1.36×10^{-3}	
P11498	丙酮酸羧化酶	0.02	2.00×10^{-3}	[25,26]
Q86Y78	含Ly6/尿激酶型纤溶酶原激活物受体结构域蛋白6	0.12	2.89×10^{-3}	
O95219	分选连接蛋白-4	28.67	3.16×10^{-3}	[27]
Q9NS86	羊毛硫氨酸合成酶C样蛋白2	25.51	5.60×10^{-3}	[28]
Q9Y4F4	轴丝微管TOG结构域阵列调控蛋白1	20.33	8.24×10^{-3}	
Q29865	人类白细胞抗原 I 类组织相容性抗原Ca链	0.18	2.11×10^{-2}	
P02585	骨骼肌肌钙蛋白C	0.15	2.32×10^{-2}	
Q4G148	葡萄糖苷木糖基转移酶1	60.13	2.80×10^{-2}	
P25713	金属硫蛋白3	0.15	3.03×10^{-2}	
Q9Y6G9	动力蛋白细胞质1轻中间链1	13.89	3.13×10^{-2}	
Q9HA65	TBC1结构域家族成员17	24.34	3.76×10^{-2}	
Q9Y295	发育调控的GTP结合蛋白1	20.46	3.93×10^{-2}	
Q58EX2	细胞黏附分子伴侣蛋白2抗体	24.97	3.99×10^{-2}	
O15382	线粒体支链氨基酸转氨酶	20.18	4.41×10^{-2}	

白^[41], Chai等人^[42]认为过表达的SNX4抑制TfnR内吞, 经ROS生成、免疫细胞功能障碍、炎症因子放大等机制促进炎症反应. 同时SNX4复合物作为自噬的正调节因子, SNX4-Atg20清除受损线粒体、功能失调的过氧化氢酶体, 减少促炎信号^[43], 还可以间接促进非选择性自噬, 从而维持液泡膜的融合能力^[44]. LANCL2作为ABA信号通路的上游^[45], 对激酶有广泛的结合亲和力, 是细胞发育过程的一种新的调节因子^[46], LANCL2过表达增强了ABA诱导的粒细胞中[Ca²⁺]cyt升高, 通过NF-κB的核转位刺激多种细胞因子和生长因子的转录和释放, 进而促使炎症反应^[47]. LANCL2也可以触发

CXCR3⁺巨噬细胞中IL-10的释放^[48], Bassaganya等人^[49]发表的一项研究表明, 新的LANCL2配体BT-11激活LANCL2减少TNF-α, MCP-1和IFNγ, 且还会导致辅助性Th1 CD4⁺ T细胞的减少和调节性T细胞的增加^[50], 维持免疫稳态, 降低炎症损伤, 调节“实热火毒”证候.

3.2.3 “实热火毒”证候给药前后富集到的生物学通路分析

使用DAVID数据库对“实热火毒”证候给药前后鉴定到的差异蛋白进行生物学过程和分子功能富集分析(网络版附图4A和B). 这些差异蛋白主要参与囊泡沿

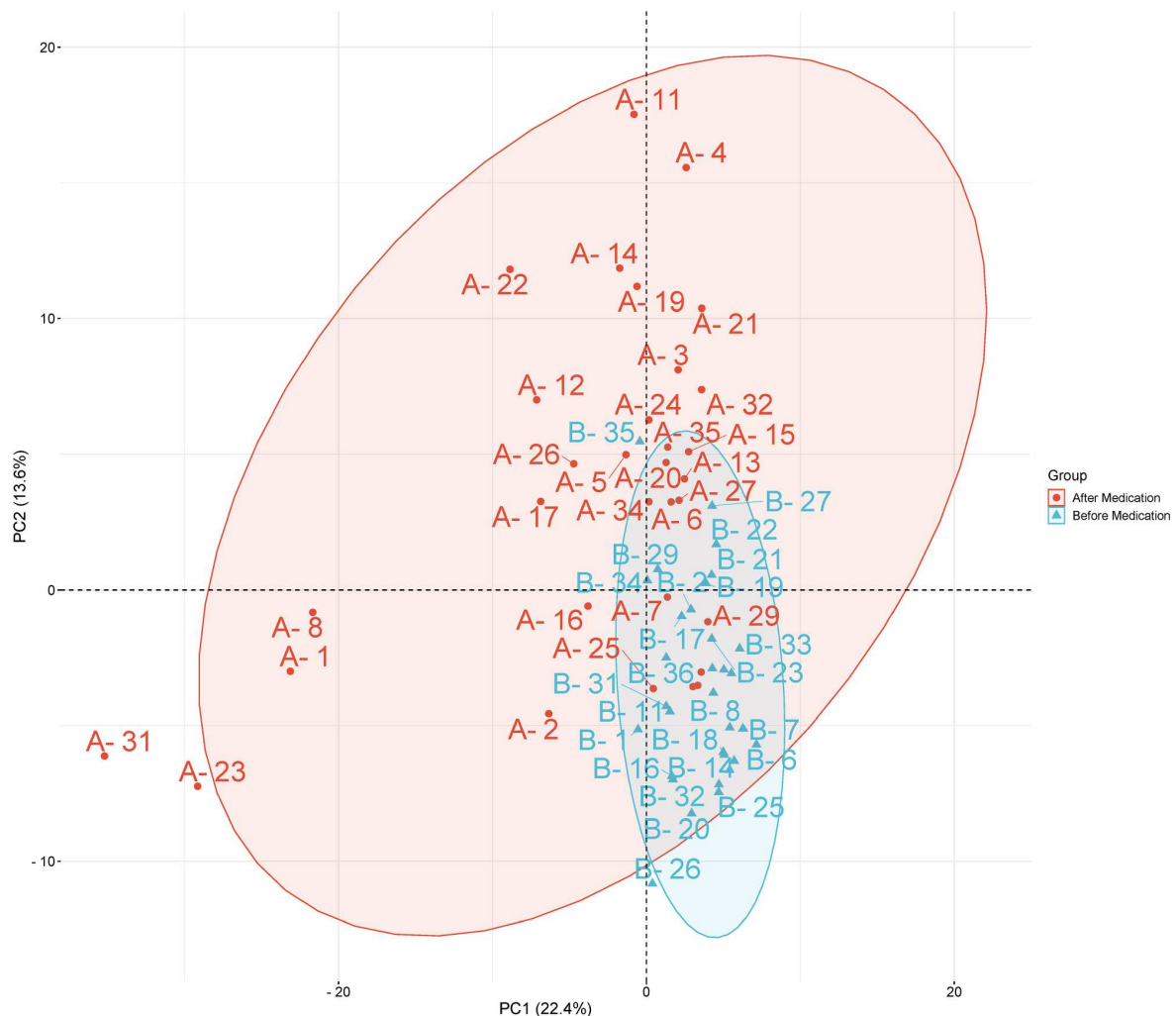


图3 “实热火毒”证候给药前后鉴定到的差异蛋白主成分分析结果

Figure 3 Results of principal component analysis of differential proteins identified before and after administration in the “excessive heat-toxin” syndrome

着肌动蛋白丝运输、细胞迁移、细胞内蛋白转运、囊泡介导的运输、免疫反应等生物学过程, 可富集到脂质结合等分子功能. KEGG富集分析显示(网络版附图4C), 细胞外基质-受体相互作用、内吞作用、细胞黏附分子、钴胺素运输和代谢等通路被显著富集.

4 讨论

近年来, 随着对中医证候现代内涵的深入研究, “实热火毒”证候作为一种典型的病理状态, 逐渐被证实与复发性口腔溃疡、牙龈炎、急性咽炎、便秘、冠心病等多种疾病的发生发展密切相关. 本研究通过对

33例健康组和32例“实热火毒”证候组尿液蛋白鉴定, 经验证发现至少69.21%的差异蛋白不是随机产生的, 标准差为9.57%, 同时对32例“实热火毒”证候患者给药前后的尿液蛋白进行鉴定, 随机分组验证结果表明至少34.16%的差异蛋白不是随机产生的, 标准差为8.30%. 有趣的是, 黄连解毒丸干预后, 可信差异蛋白比例降低, 表明药物干预后可显著降低“实热火毒”证候状态下的蛋白表达, 使机体恢复健康状态, 但同时也提示, 药物的干预效应可能具有个体差异性. 经组间对比鉴定得到, DRG2, SNX4, LANCL2这三个蛋白均存在于这两组对比鉴定的差异蛋白中, 表明三者可能是黄连解毒丸调控“实热火毒”证候的核心、高特

表 3 “实热火毒”证候给药前后对比随机分组结果
Table 3 Random grouping results of “excessive heat and fire toxin” syndrome before and after administration

抽样组别	差异蛋白数量	随机产生的差异蛋白数量	可靠差异蛋白占比
1	168	118.85	29.26%
2	194	127.20	34.43%
3	190	114.72	39.62%
4	178	115.38	35.18%
5	151	109.39	27.56%
6	204	119.36	41.49%
7	178	120.01	32.58%
8	251	125.81	49.88%
9	168	114.14	32.06%
10	147	118.25	19.56%

异性靶点。

基于本实验得到的两组共有差异蛋白结合本课题组前期通过尿液代谢组学筛选得到的与“实热火毒”证候相关的蛋白^[51]表明, “实热火毒”证候与能量代谢、炎症因子和氧化应激因子等密切相关^[52]。其中代谢产物酰基肉碱类是能量代谢核心参与者, 通过介导脂肪酸进入线粒体 β -氧化供能, 进而间接作用于炎症^[53]; L-谷氨酰胺通过参与蛋白质合成、免疫细胞活化调控“实热火毒”证候^[54]; 脂肪酸衍生物通过调控巨噬细胞, 进而关联能量代谢与炎症^[55,56]; 亮菌素可激活脂肪酸氧化酶促进脂肪酸氧化供能, 直接参与能量代谢, 间接引发炎症; 泛酸以泛酰辅酶A形式参与糖、脂代谢, 是能量代谢重要辅助因子, 同时为炎症状态下细胞供

表 4 “实热火毒”证候给药前后鉴定到的P值最小的前10位、FC值最大的前10位及最小的前10位差异蛋白
Table 4 The top 10 differential proteins with the smallest P-values, the top 10 with the largest FC values, and the top 10 with the smallest FC values identified before and after administration for the “excessive heat-toxin” syndrome

UniProt数据库 蛋白编号	蛋白名称	差异倍数	P值	参考文献
O15211	Ral鸟嘌呤核苷酸解离刺激物2	0.04	4.30×10^{-10}	[14,15]
Q9UKN8	普通转录因子ⅢC	0.01	3.31×10^{-8}	[16~19]
Q92538	高尔基体特异性布雷德菌素A抗性鸟嘌呤核苷酸交换因子1	0.00	4.82×10^{-6}	[21,22]
Q86U17	丝氨酸蛋白酶抑制剂A11	0.06	8.60×10^{-6}	
Q96CG8	胶原三螺旋重复蛋白-1	0.58	2.60×10^{-5}	
Q9Y2B5	含VPS9结构域蛋白1	1.77	3.78×10^{-5}	
Q8NEY8	脉周蛋白1	3.42	7.42×10^{-5}	
Q6UWV6	外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶	0.65	1.21×10^{-4}	
Q9Y5E6	原钙黏蛋白 β -3	0.36	1.52×10^{-4}	
Q9Y547	鞭毛内转运蛋白25同源物	2.26	1.89×10^{-4}	
Q9NVL8	代谢与能量相关因子	7.00	1.35×10^{-3}	
P16157	锚蛋白-1	10.74	4.29×10^{-3}	
Q9BQP9	BPI折叠包含家族A成员3	0.14	4.73×10^{-3}	
Q9NS86	羊毛硫氨酸合成酶C样蛋白2	10.96	1.34×10^{-2}	[28]
O75153	成簇线粒体蛋白同源物	0.10	1.45×10^{-2}	
Q14258	E3泛素/ISG15连接酶	16.16	1.57×10^{-2}	
P55039	发育调控GTP结合蛋白2	5.97	1.80×10^{-2}	
P0CG12	肾和前列腺癌中表达降低的蛋白	7.29	2.23×10^{-2}	
Q14160	scribble同源蛋白	0.09	2.50×10^{-2}	
Q15836	囊泡相关膜蛋白3	∞	2.92×10^{-2}	[31~33]
Q8WUF5	RelA相关抑制剂	0.06	3.26×10^{-2}	[34]
Q7L5Y9	E3泛素连接酶	0.08	3.43×10^{-2}	
Q9H0T7	Ras相关蛋白Rab-17	6.89	3.47×10^{-2}	
O95219	分选连接蛋白4	6.39	3.92×10^{-2}	
Q96A65	外泌体复合物	27.49	4.46×10^{-2}	[35]
P52799	EFNB2蛋白	0.10	4.62×10^{-2}	

能提供支持^[57]; 次黄嘌呤作为嘌呤代谢中间产物, 参与核苷酸合成, 直接关联能量代谢^[58]; 除上述代谢相关物质外, 蛋白层面的调控因子也在“实热火毒”证候中发挥关键作用, 且与代谢-炎症调控存在交互. DRG2, SNX4, LANCL2在不同组间比较中重复出现, 是本研究的核心发现之一. 三者并非独立的差异蛋白, 而是构成了调控“实热火毒”证候的协同网络: DRG2作为GTP 结合蛋白, 通过细胞增殖分化促进炎症反应^[59]; SNX4作为分选连接蛋白, 通过调控内体运输, 过度表达时抑制自噬, 放大局部炎症信号^[60]; LANCL2作为免疫调控受体, 进一步驱动巨噬细胞等免疫细胞的异常活化, 调控信号通路刺激细胞因子释放^[61], 形成“屏障损伤-炎症放大-免疫紊乱”的级联反应, 最终导致“实热火毒”证候. 此外, DRG2促炎产生的炎性微环境, 可能激活SNX4异常调控自噬的通路; LANCL2介导的细胞因子释放, 又可反作用于DRG2, SNX4表达, 形成“炎症-自噬-信号通路”交互的复杂网络^[62,63]. 黄连解毒丸或通过同时干预代谢产物、蛋白

的协同作用节点, 如阻断DRG2与SNX4间炎性信号传递、调节LANCL2通路与自噬关联, 从多靶点、多通路层面破解“实热火毒”病理体系通过其调节机制进而控制“热证”的产生.

本研究利用尿液蛋白质组有助于全面、系统地探索上火这一常见但目前尚未被广泛认可的医学定义背后的生物学机制, 为上火领域研究打开新的窗口, 也为中医药其他领域的研究提供借鉴. 但本研究仍然存在局限性: 样本量有限、样本基线特征未严格分层、研究方法单一, 这些因素可能干扰DRG2, SNX4, LANCL2蛋白检测及实热火毒证候评估, 且可能遗漏实热火毒机体应答的关键生物学信息. 未来研究将通过扩大样本数量、深化机制转化, 进一步探索黄连解毒丸如何通过代谢产物、相关蛋白治疗“实热火毒”证候, 维持机体稳态, 同时结合中医整体观念, 诠释黄连解毒丸调控蛋白、维持机体稳态与“清热泻火、调和阴阳”理论的关联, 完善实热火毒证候现代生物学内涵.

参考文献

- Zhang F B, Zhang Y, Li D F, et al. Effects of Huanglian Jiedu Decoction on β -defensin in rats with gingivitis of excessive fire-toxin syndrome (in Chinese). *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2019, 34: 3999–4002 [张方博, 张毅, 李德凤, 等. 黄连解毒汤对“实热火毒”证候牙龈炎大鼠 β -防御素的影响. *中华中医药杂志*, 2019, 34: 3999–4002]
- Fan Y S. Understanding the syndrome of “excess-heat and fire-toxin” from the perspective of modern biology (in Chinese). *Chin J Integr Med*, 2018, 38: 1415–1417 [范永升. 从现代生物学认识“实热火毒”证候. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38: 1415–1417]
- Bao J, Zhang X Z, Dou X B, et al. Discussion on the pathogenesis of traditional Chinese medicine excess-heat syndrome of “excess-heat fire toxin” based on the energy regulation function of AMPK (in Chinese). *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2018, 33: 4171–4176 [包洁, 张喜召, 窦晓兵, 等. 基于AMPK能量调节功能探讨中医“实热火毒”证候的发病机制. *中华中医药杂志*, 2018, 33: 4171–4176]
- Sun Q C, Du Y, Xie G Q, et al. Analysis on the etiology and pathogenesis of “excess fire and heat-toxin syndrome” from the perspective of dysfunction of Sanjiao Qi transformation (in Chinese). *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2020, 35: 972–974 [孙旗策, 杜羽, 谢冠群, 等. 从三焦气化失常分析“实热火毒”证候的病因病机. *中华中医药杂志*, 2020, 35: 972–974]
- Hu H Y, Wang H C, Wang H, et al. Evaluation criteria and interpretation of intense heat syndrome (excessive fire-heat toxin) (in Chinese). *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37: 2998–3002 [胡海殷, 王虎城, 王辉, 等. 火热炽盛证(实热火毒)评价标准及其解读. *中华中医药杂志*, 2022, 37: 2998–3002]
- Luo K K, Wang H J, Wang M X, et al. Identification and validation of clinical biomarkers for the treatment of excess heat causing fire toxins syndrome with Huanglian Jiedu Pill (in Chinese). *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2025, 36: 176–183 [罗珂珂, 王宏洁, 王梦晓, 等. 黄连解毒丸治疗“实热火毒”证候临床生物标志物辨识验证研究. *时珍国医国药*, 2025, 36: 176–183]
- Luo K K. Exploration and screening of clinical biomarkers of Huanglian Jiedu Pills in treating excess-heat and fire-toxin syndrome (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2022 [罗珂珂. 黄连解毒丸治疗实热火毒证临床生物标志物的探索与筛选. 硕士学位论文. 北京: 中国中医科学院, 2022]
- Luo K, Zhao H, Bian B, et al. Huanglian Jiedu Decoction in the treatment of the traditional Chinese medicine syndrome “Shanghuo”—an intervention study. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 616318

- 9 Schmidt K, Podmore I. Current challenges in volatile organic compounds analysis as potential biomarkers of cancer. *J Biomarkers*, 2015, 2015: 981458
- 10 Wei J, Gao Y. Early disease biomarkers can be found using animal models urine proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 2021, 18: 363–378
- 11 Xu Y, Xu Y, Liu C H. Research progress of CKD273 based on urinary proteomics in chronic kidney disease (in Chinese). *Med Innov China*, 2020, 17: 165–169 [徐耀, 徐艳, 刘昌华. 基于尿蛋白组学的CKD273在慢性肾脏病中的应用进展. *中国医学创新*, 2020, 17: 165–169]
- 12 Luo K, Zhao H, Wang M, et al. Huanglian Jiedu Wan intervened with “Shi-Re Shanghuo” syndrome through regulating immune balance mediated by biomarker succinate. *Clin Immunol*, 2024, 258: 109861
- 13 Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6: 359–362
- 14 Filippakis H, Spandidos D A, Sourvinos G. Herpesviruses: hijacking the Ras signaling pathway. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1803: 777–785
- 15 Frazier D P, Cox D, Godshalk E M, et al. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter is activated through Ras and Raf by nerve growth factor and sodium butyrate in PC12 cells. *J Virol*, 1996, 70: 7424–7432
- 16 Hsieh Y J, Kundu T K, Wang Z, et al. The TFIIC90 subunit of TFIIC interacts with multiple components of the RNA polymerase III machinery and contains a histone-specific acetyltransferase activity. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 7697–7704
- 17 Gelev V, Zabolotny J M, Lange M, et al. A new paradigm for transcription factor TFIIB functionality. *Sci Rep*, 2014, 4: 3664
- 18 Gu B, Rivera-Gonzalez R, Smith C A, et al. Herpes simplex virus infected cell polypeptide 4 preferentially represses Sp1-activated over basal transcription from its own promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 9528–9532
- 19 Smith C A, Bates P, Rivera-Gonzalez R, et al. ICP4, the major transcriptional regulatory protein of herpes simplex virus type 1, forms a tripartite complex with TATA-binding protein and TFIIB. *J Virol*, 1993, 67: 4676–4687
- 20 Civitelli L, Marocci M E, Celestino I, et al. Herpes simplex virus type 1 infection in neurons leads to production and nuclear localization of APP intracellular domain (AICD): implications for Alzheimer’s disease pathogenesis. *J Neurovirol*, 2015, 21: 480–490
- 21 Uckelely Z M, Moeller R, Kühn L I, et al. Quantitative proteomics of uukuniemi virus-host cell interactions reveals GBF1 as proviral host factor for phleboviruses. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18: 2401–2417
- 22 Wu K X, Yogarajah T, Loe M W C, et al. The host-targeting compound peruvoside has a broad-spectrum antiviral activity against positive-sense RNA viruses. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13: 2039–2055
- 23 Rolton H A, Keir H M. Deoxycytidylate deaminase. Evidence for a new enzyme in cells infected by the virus of herpes simplex. *Biochem J*, 1974, 143: 403–409
- 24 Haack T B, Kopajtich R, Freisinger P, et al. ELAC2 mutations cause a mitochondrial RNA processing defect associated with hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Hum Genet*, 2013, 93: 211–223
- 25 Vastag L, Koyuncu E, Grady S L, et al. Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002124
- 26 Zhou Y Y, Zhao H Y, Wang H J, et al. Correlation between TCM syndrome of excessive heat and fiery toxin and biomarkers (in Chinese). *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2019, 43: 97–102+10 [周严严, 赵海誉, 王宏洁, 等. 中医证候上火与生物标志物之间的相关性. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43: 97–102+10]
- 27 Dong X, Yang Y, Zou Z, et al. Sorting nexin 5 mediates virus-induced autophagy and immunity. *Nature*, 2021, 589: 456–461
- 28 Jeon S H, Kim N, Ju Y J, et al. Phytohormone abscisic acid improves memory impairment and reduces neuroinflammation in 5xFAD mice by upregulation of LanC-like protein 2. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 8425
- 29 Chen J, Xu L, Xie G Q, et al. Analysis of serum proteomic characteristics of traditional Chinese medicine excess heat “excess heat fire-toxin” syndrome based on iTRAQ technology (in Chinese). *World Chin Med*, 2017, 12: 2897–901+907 [陈娟, 徐莉, 谢冠群, 等. 基于iTRAQ技术的中医上火证候血清蛋白质组学特征分析. *世界中医药*, 2017, 12: 2897–901+907]
- 30 Pan Z, Zhu X Y, Fan Y S. Relationship between excess fire-heat toxin syndrome and intestinal flora from the perspective of energy metabolism and mucosal immunity (in Chinese). *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2015, 39: 591–594 [潘照, 朱星瑜, 范永升. 从能量代谢及黏膜免疫看上火证候与肠道菌群的关系. *浙江中医药大学学报*, 2015, 39: 591–594]
- 31 Bochenek G, Häsler R, El Mokhtari N E, et al. The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum Mol Genet*, 2013, 22: 4516–4527
- 32 Munz M, Richter G M, Loos B G, et al. Genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease and periodontitis reveals a novel shared risk locus. *Sci Rep*, 2018, 8: 13678

- 33 Rosenfeld L, Neumann N, Bao X, et al. *Entamoeba gingivalis* induces gingival cell death, collagen breakdown, and host immune response via VAMP8/-3-driven exocytosis pathways. *Infect Immun*, 2025, 93: e0000525
- 34 Takada N, Sanda T, Okamoto H, et al. RelA-associated inhibitor blocks transcription of human immunodeficiency virus type 1 by inhibiting NF- κ B and Sp1 actions. *J Virol*, 2002, 76: 8019–8030
- 35 Yi R, Hashimoto R, Sakamoto A, et al. Exocyst complex component 2 is a potential host factor for SARS-CoV-2 infection. *iScience*, 2022, 25: 105427
- 36 Pan M H, Zhu S R, Duan W J, et al. “Shanghuo” increases disease susceptibility: modern significance of an old TCM theory. *J EthnoPharmacol*, 2020, 250: 112491
- 37 Delima A J, Oates T, Assuma R, et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, 2001, 28: 233–240
- 38 Li B S, Jin A L, Zhou Z Q, et al. DRG2 accelerates senescence via negative regulation of SIRT1 in human diploid fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021(1): 7301373
- 39 Ko M S, Lee U H, Kim S I, et al. Overexpression of DRG2 suppresses the growth of Jurkat T cells but does not induce apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 422: 137–144
- 40 Ko M S, Kim H J, Kim H K, et al. Developmentally regulated GTP-binding protein 2 ameliorates EAE by suppressing the development of TH17 cells. *Clin Immunol*, 2014, 150: 225–235
- 41 Lai S H, Lv S J, Liu Y, et al. Effects of miR-218 regulating SNX4 protein on proliferation and invasion of acute lymphoblastic E6-1 cells (in Chinese). *Air Force Med J*, 2018, 34: 97–100 [赖思含, 吕素娟, 刘英, 等. miR-218调控SNX4蛋白对急性淋巴E6-1细胞增殖和侵袭的影响. *空军医学杂志*, 2018, 34: 97–100]
- 42 Chai Y M, Zhou Z B, Liu R Z, et al. SNX4 is correlated with immune infiltration and prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Oncol*, 2024, 15: 809–824
- 43 Hanley S E, Willis S D, Cooper K F. Snx4-assisted vacuolar targeting of transcription factors defines a new autophagy pathway for controlling *ATG* expression. *Autophagy*, 2021, 17: 3547–3565
- 44 Ma M, Kumar S, Purushothaman L, et al. Lipid trafficking by yeast Snx4 family SNX-BAR proteins promotes autophagy and vacuole membrane fusion. *Mol Biol Cell*, 2018, 29: 2190–2200
- 45 Wang J C. Effects of LanCL1 and LanCL2 deficiency on hypothalamic development and high-fat diet-induced obesity in mice (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2024 [王芥晨. LanCL1和LanCL2缺失对小鼠下丘脑发育及高脂饮食诱导肥胖发生的影响. 硕士学位论文. 成都: 四川农业大学, 2024]
- 46 Sturla L, Fresia C, Guida L, et al. LANCL2 is necessary for abscisic acid binding and signaling in human granulocytes and in rat insulinoma cells. *J Biol Chem*, 2009, 284: 28045–28057
- 47 Zhao Y N. Study on the effects of specific knockout of *LanCL2* gene on the structure and function of the central nervous system in mice (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Chengdu: Chengdu Medical College, 2023 [赵雅妮. 特异性敲除*LanCL2*基因对小鼠中枢神经系统结构和功能的作用研究. 硕士学位论文. 成都: 成都医学院, 2023]
- 48 Guri A J, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. Abscisic acid synergizes with rosiglitazone to improve glucose tolerance and down-modulate macrophage accumulation in adipose tissue: possible action of the cAMP/PKA/PPAR γ axis. *Clin Nutr*, 2010, 29: 646–653
- 49 Bassaganya-Riera J, Guri A J, Lu P, et al. Abscisic acid regulates inflammation via ligand-binding domain-independent activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem*, 2011, 286: 2504–2516
- 50 Leber A, Hontecillas R, Zoccoli-Rodriguez V, et al. Activation of LANCL2 by BT-11 ameliorates IBD by supporting regulatory T cell stability through immunometabolic mechanisms. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24: 1978–1991
- 51 Zhou Y Y, Zhao H Y, Wang H J, et al. Study on urinary metabolomics of patients with oral diseases caused by exuberant stomach fire syndrome intervened by Huanglian Jiedu decoction (in Chinese). *J Zhejiang Chin Med Univ*, 2019, 43: 140–151 [周严严, 赵海誉, 王宏洁, 等. 黄连解毒汤干预胃火炽盛证引起的口腔疾病患者尿液代谢组学研究. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43: 140–151]
- 52 Luo K K, Zhao H Y, Si N, et al. Clinical application value of plasma ATP, 4-HNE and ACTH levels in Huanglian Jiedu Pills for treating excessive fire-toxin syndrome based on phase II clinical trial (in Chinese). *China J Chin Mater Med*, 2023, 48: 1124 [罗珂珂, 赵海誉, 司南, 等. 基于II期临床试验研究血浆中ATP、4-HNE、ACTH水平对黄连解毒丸改善实热火毒证的临床应用价值. *中国中药杂志*, 2023, 48: 1124]
- 53 Corkey B E, Deeney J T. The redox communication network as a regulator of metabolism. *Front Physiol*, 2020, 11: 567796

- 54 Li Y Q, Li H Q, Li H M, et al. The role of glutamine metabolism in immune cells in the treatment of cardiovascular diseases (in Chinese). *Cent South Pharm*, 2025, 23: 1831–1838 [李雨晴, 李昊琦, 李慧敏, 等. 免疫细胞中的谷氨酰胺代谢在心血管治疗中的作用. *中南药学*, 2025, 23: 1831–1838]
- 55 Lipscomb M, Walis S, Marinello M, et al. Resolvin D2 limits atherosclerosis progression via myeloid cell-GPR18. *FASEB J*, 2024, 38: e23555
- 56 Li X T, Wang D Y, Yang W Q, et al. Research progress on the mechanism of ω -3 fatty acids and their derivatives in inhibiting inflammatory responses of atherosclerosis (in Chinese). *Shandong Med J*, 2025, 65: 124–129 [李小彤, 王丹阳, 杨雯晴, 等. ω -3脂肪酸及其衍生物抑制动脉粥样硬化炎症反应的作用机制研究进展. *山东医药*, 2025, 65: 124–129]
- 57 Jia R Z, Jiang C, Jin Q G, et al. Effects and mechanisms of combined intervention of L-carnitine, pantothenic acid and coenzyme Q10 on mice with aerobic exercise fatigue model (in Chinese). *Chin J Tissue Eng Res*, 2022, 26: 165–170 [贾瑞真, 姜超, 金其贯, 等. 左旋肉碱、泛酸、辅酶Q10联合干预有氧运动疲劳模型小鼠的作用及机制. *中国组织工程研究*, 2022, 26: 65–170]
- 58 Gu X Y, Li Z, Zheng Y N, et al. Effects of hypoxanthine on lipid metabolism in mice (in Chinese). *J Jilin Agric Univ*, 2017, 39: 337–342+348 [顾效瑜, 李哲, 郑毅男, 等. 次黄嘌呤对小鼠脂质代谢的影响. *吉林农业大学学报*, 2017, 39: 337–342+348]
- 59 Hong M J, Yoo S S, Choi J E, et al. Functional intronic variant of *SLC5A10* affects *DRG2* expression and survival outcomes of early-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci*, 2018, 109: 3902–3909
- 60 Yu H, Jia W, Li Z, et al. The sorting nexin genes *ChSNX4* and *ChSNX41* are required for reproductive development, stress adaption and virulence in *Cochliobolus heterostrophus*. *JoF*, 2022, 8: 855
- 61 Birnbaum E M, Xie L, Serrano P, et al. BT-11 targets the LANCL2 pathway to attenuate cognitive deficits and hippocampal pathology in Alzheimer's transgenic rats. *Sci Rep*, 2025, 16: 1848
- 62 Yu L, Tang L H, Deng L C, et al. Study on Miaoyao Guanjie Heluo decoction regulating AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway to mediate autophagy, apoptosis, inflammation and oxidative stress in degenerative chondrocytes (in Chinese). *Chin Med Mater*, 2025, 2025: 2064–2070 [余梁, 唐良华, 邓淋城, 等. 苗药关节和络饮调控AMPK/mTOR/ULK1信号通路介导退变软骨细胞自噬、凋亡、炎症及氧化应激反应的研究. *中药材*, 2025, 2025: 2064–2070]
- 63 Yang S X, Zhou Z P, Ma J F, et al. Aqueous extract of *Strychnos nux-vomica* alleviates rheumatoid arthritis in rats by regulating AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway-mediated autophagy (in Chinese). *J Chin Med Mater*, 2025, 2025: 2357–2361 [杨少祥, 周子朋, 马俊福, 等. 马钱子水提取物调节AMPK/mTOR/ULK1信号通路介导自噬减轻大鼠类风湿关节炎. *中药材*, 2025, 2025: 2357–2361]

A urinary proteomics study on Huanglian Jiedu Wan in the treatment of “excessive heat-toxin” syndrome

LUO Ke-Ke^{1,3†}, CHEN Yu-Zhen^{2†}, MA Yuan¹, LI Qi¹, WANG Hong-Jie¹, WANG Meng-Xiao¹, FU Rui¹, ZHANG Xin-Fang¹, BIAN Bao-Lin^{1*}, GAO You-He^{2*} & ZHOU Yan-Yan^{1*}

¹ Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

² Beijing Key Laboratory of Genetic Engineering Drugs and Biotechnology, College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

³ Collaborative Innovation Center for TCM Prevention and Treatment of Respiratory Diseases Co-constructed by Province and Ministry, Academy of Chinese Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

† Contributed equally to this work

* Corresponding authors, E-mail: blbian@icmm.ac.cn; gaoyouhe@bnu.edu.cn; yyzhou@icmm.ac.cn

This study used urine proteomics to characterize the differentially expressed proteins in the treatment of “excessive heat-toxin” syndrome with Huanglian Jiedu Wan (HLJDW), and preliminarily explored its mechanism of action at the level of urine samples. Urine samples were collected from 32 patients with the “excessive heat and fiery toxin” syndrome who met the inclusion criteria before and after administration, and urine samples were additionally collected from 33 healthy subjects. First, urinary proteins were extracted, the protein concentration was determined by the Bradford method, and urinary proteins were enzymatically digested by filter-aided sample preparation. Then, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry was used to screen differentially expressed proteins in urine between 33 normal people and 32 patients in the “excessive fire-toxin” syndrome group, and between 32 patients in the “excessive fire-toxin” syndrome group and 32 HLJDW-medicated patients with “excessive fire-toxin” syndrome. Hierarchical cluster analysis and principal component analysis were used to distinguish samples. The DAVID database was used for enrichment analysis of biological processes and molecular functions of the identified differentially expressed proteins; the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was used to enrich related pathways; and the literature was searched for functional analysis of the differentially expressed proteins. A total of 473 differentially expressed proteins were screened between the “excessive fire-toxin” syndrome group and the healthy group, and 283 differentially expressed proteins were screened between the “excessive fire-toxin” syndrome group and the HLJDW-medicated group. Among them, the differentially expressed proteins common to both groups with obvious therapeutic trends included DRG2, SNX4, and LANCL2, which could improve “excessive heat-toxin” syndrome by regulating inflammatory responses, autophagy pathways, and mediating cytokine release. The results of DAVID enrichment analysis showed that the screened differentially expressed proteins were mainly involved in biological processes such as cell migration, intracellular protein transport, vesicle-mediated transport, immune response, tricarboxylic acid cycle, glycolysis, and regulation of lipid metabolism. KEGG enrichment analysis mainly included extracellular matrix-receptor interaction, tricarboxylic acid cycle, cysteine and methionine metabolism, pyruvate metabolism, biosynthesis of nucleotide sugars, and AMPK signaling pathway. Urinary proteins in “excessive heat-toxin” syndrome is significantly different from those in healthy status and after medication. Most differentially expressed proteins are related to excessive heat or viral infection. At the same time, HLJDW in the treatment of “excessive heat-toxin” syndrome are mainly involved in energy metabolism processes, especially the tricarboxylic acid cycle, glycolysis, AMPK signaling pathway, etc. The differentially expressed proteins screened in this study may serve as potential targets for “excessive heat-toxin” syndrome, opening a new window for a deeper scientific explanation of “excessive heat-toxin” syndrome.

Huanglian Jiedu Wan, “excessive heat-toxin” syndrome, clinical urine samples, proteomics, mechanism of action

doi: [10.1360/SSV-2025-0388](https://doi.org/10.1360/SSV-2025-0388)