

# 基于蛋白质组学技术的半夏和水半夏的研究与分析

王玉团, 邢晟(山东省食品药品检验研究院, 山东省食品药品安全检测工程技术研究中心, 济南 250101)

**摘要:** 目的 基于蛋白质组学技术对半夏和水半夏进行研究, 为正确用药提供支持。方法 将半夏和水半夏进行酶解, 通过纳升级液相色谱质谱联用方法进行多肽分离及质谱数据采集, 采用蛋白质比对软件进行数据处理。结果 两者的多肽图谱具有一定的相似性, 在 14, 19, 52 和 55 min 附近均有响应很强的色谱峰, 在 32 和 43 min 附近两者色谱图有明显的不同。半夏中多肽种类更加丰富, 有 1 346 种, 比水半夏多 312 种。半夏和水半夏两者共有的多肽数为 296 种, 共有多肽种类占总多肽种类数分别为 22%和 29%。含量前 10 的蛋白质 9 个是相同的, 且主要为凝集素蛋白质, 但相对含量差异显著。结论 两者主要多肽及蛋白质在种类和相对含量方面存在明显差异, 临床上水半夏不能盲目替代半夏使用。

**关键词:** 半夏; 水半夏; 蛋白质组; 多肽

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)14-1708-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.14.008

引用本文: 王玉团, 邢晟. 基于蛋白质组学技术的半夏和水半夏的研究与分析[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(14): 1708-1711.

## Research and Analysis of Pinellia Rhizoma and Typhonii Flagelliformi Rhizoma Based on Proteomics Technology

WANG Yutuan, XING Sheng(Shandong Institute for Food and Drug Control, Shandong Research Center of Engineering and Technology for Safety Inspection of Food and Drug, Jinan 250101, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To provide support for proper medication by researching Pinellia Rhizoma and Typhonii Flagelliformi Rhizoma based on proteomics technology. **METHODS** Pinellia Rhizoma and Typhonii Flagelliformi Rhizoma were subjected to enzymatic hydrolysis, peptide separation and mass spectrometry data collection were performed by nanoliter liquid phase mass spectrometry, and data processing was performed using protein comparison software. **RESULTS** The two polypeptide profiles were similar to each other, and there were strong absorption peaks near 14, 19, 52 and 55 min, and the chromatograms of the two peptides were significantly different around 32 and 43 min. There were 1 346 kinds of polypeptides in Pinellia Rhizoma, and 312 species more in Pinellia Rhizoma than in Typhonii Flagelliformi Rhizoma. About 296 kinds of polypeptides were the same in Pinellia Rhizoma and Typhonii Flagelliformi Rhizoma, the same polypeptides were 22% and 29% of the total species respectively. Nine of the top 10 proteins were the same, and they were mainly lectin proteins, but the relative contents were significantly different. **CONCLUSION** There are significant differences in the kinds and relative contents of the main polypeptides and proteins between them, Typhonii Flagelliformi Rhizoma could not replace Pinellia Rhizoma blindly in clinical practice.

**KEYWORDS:** Pinellia Rhizoma; Typhonii Flagelliformi Rhizoma; proteome; polypeptide

半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternate* (Thunb) Breit 的干燥块茎, 临床上主要用于湿痰寒痰、呕吐反胃、胸脘痞闷、痈肿痰核等症<sup>[1-2]</sup>。水半夏为天南星科植物水半夏(鞭檐犁头尖) *Typhonium flagellaforme* (Lodd.) Blume 的干燥块茎, 临床上主要用于咳嗽痰多、痈疮疔肿等症<sup>[3]</sup>。两者来源于同科且均属于燥湿化痰、止咳平喘类中药, 都可用于治疗痰多咳嗽等症<sup>[4]</sup>, 两者在中医临床上治疗咳嗽痰多症候方面不分伯仲。

水半夏的种植条件要求相对较低, 采收相对省时省力, 且产量高, 故水半夏的市场价格相对于半夏便宜, 仅约为半夏的 1/5, 且两者又具有相似的功能主治, 造成在水半夏种植的主要地区(广西和江西

等省份)中医临床调剂大量使用水半夏而不使用半夏的情况。但药理及毒理研究表明<sup>[5-7]</sup>, 水半夏的毒性约为半夏的 3.2 倍, 而其镇咳、镇吐的药理作用弱于半夏, 且水半夏无止呕作用, 故临床上盲目用水半夏替代半夏使用会带来较大的用药安全隐患。

众所周知, 中药发挥其药理作用的物质基础是其所含有的多种化学成分, 如黄酮、多糖、皂苷、有机酸、蛋白质等, 各种化学物质药理活性的相对强弱及含量多寡与其功能主治和毒性息息相关。现代研究表明<sup>[8-10]</sup>, 半夏类中药含有大量的凝集素类蛋白, 该类蛋白质具有祛痰、抗肿瘤、抗凝集等药理活性, 而且是目前已知的唯一与甘露糖结合而不与葡萄糖结合的具有凝集素样作用

作者简介: 王玉团, 男, 硕士, 副主任中药师 Tel: (0531)81216585 E-mail: wytuan@163.com

的蛋白,是半夏主要的功效物质之一。本研究主要运用蛋白组学技术对半夏及水半夏所含的主要蛋白质和多肽进行比对研究,分析两者主要蛋白质和多肽的组成差异。试验中将收集的半夏及水半夏样品参照动物类药材蛋白质组研究方法,将所含的凝集素类蛋白质用胰蛋白酶酶切成多肽,通过纳升级液相色谱和实验室自制色谱柱对多肽进行分离,采用高分辨质谱仪进行数据采集,最后用蛋白质比对软件进行搜库比对与鉴定。

## 1 仪器与材料

EASY-nLC 1000纳升级液相色谱联用Fusion-Orbitrap高分辨质谱仪(Thermo公司);ReproSil-PurC<sub>18</sub>-AQ Trap富集柱(0.2 mm×3.5 cm, 5 μm)、ReproSil-Pur C<sub>18</sub>-AQ分离柱(75 μm×25 cm, 3 μm)(实验室自制)。

胰蛋白酶(Sigma公司,批号:SLBG6452V);半夏对照药材(中国食品药品检定研究院提供,批号:121272-201605);水半夏于2017年9月于江西省赣州市信丰县收集,经山东中医药大学刘红燕副教授鉴定为天南星科植物水半夏*Typhonium flagellaforme* (Lodd.) Blume.的干燥块茎;二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、碘代乙酰胺(Iodoacetamide, IAA)、碳酸氢铵、乙酸均为分析纯;甲酸、乙腈均为质谱纯。

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

精密称取半夏及水半夏药材细粉各20 mg,置2 mL离心管中,精密加入1 mL 1% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>溶液和20 μL DTT溶液(0.5 mol·L<sup>-1</sup>),充分摇匀,置100 °C烘箱处理10 min,取出放冷至室温,精密加入50 μL IAA溶液(0.55 mol·L<sup>-1</sup>),混匀,避光反应30 min,离心;精密量取上清液500 μL,加入5 μL胰蛋白酶溶液,于37 °C培养箱酶解15 min,离心,取上清液用0.22 μm滤膜过滤,取滤液即得。

### 2.2 纳升级液相色谱条件

采用实验室自制的ReproSil-PurC<sub>18</sub>-AQ Trap富集柱(0.2 mm×3.5 cm, 5 μm)和ReproSil-Pur C<sub>18</sub>-AQ分离柱(75 μm×25 cm, 3 μm)。流动相A为0.1%甲酸,流动相B为乙腈,梯度洗脱(0~5 min, 98%→93% A; 5~47 min, 93%→78% A; 47~57 min, 78%→67% A; 57~62 min, 67%→10% A; 62~70 min, 10% A),流速300 nL·min<sup>-1</sup>。

### 2.3 高分辨质谱条件

采用Fusion-Orbitrap高分辨质谱仪, Nanospray

Flex离子源,正离子模式,喷雾电压为2.1 kV,离子传输毛细管温度为275 °C, S-Lens传输效率设置为60%。一级质谱采用Orbitrap作为质量分析器,分辨率为60 000(*m/z* 400),采集范围为350~1 550 Th;二级质谱采用离子阱作为质量分析器,采用Rapid Scan模式进行扫描,采用HCD碎裂模式,碎裂能量NCE设置为35%。

将“2.1”项下制备的供试品溶液,分别进样1 μL,按“2.2”项下纳升级液相色谱条件和高分辨质谱条件进样分析,采集数据。

## 3 结果

### 3.1 多肽色图谱

半夏和水半夏的多肽图谱(即总离子流色谱)具有一定的相似性,结果见图1。其中在14, 19, 52, 55 min附近均有响应很强的色谱峰出现,提示两者所含多肽类物质在种类和含量方面具有一定的相似性。在32, 43 min附近两者色谱图又明显的不同,说明两者含有特异性的多肽或某些多肽含量差异显著。其中在14.69 min(半夏)和14.14 min(水半夏)处的多肽为SAASLNSR、在18.91 min(半夏)和18.95 min(水半夏)处的多肽为LLAC(+57.02)R、在52.33 min(半夏)和51.86 min(水半夏)处的多肽为LVMQGDC(+57.02)NLVLYGGDR、在55.68 min(半夏)和55.57 min(水半夏)处的多肽为PLAFFPENADDDTVR(sub Q)。在32.44 min附近水半夏的色谱峰比半夏响应明显,该多肽主要为GNYALVVHPEGR及其修饰多肽GN(+0.98)YAFVVHPEGR。在43.97 min附近半夏的色谱峰比水半夏响应明显,该多肽主要为AVGSTNHLLSGEILDTNGHLR。为准确鉴定上述多肽的来源,在NCBI的数据库里对水半夏和半夏上述多肽进行了Blast(The Basic Local Alignment Search Tool)比对分析,结果显示上述多肽均存在于天南星科的凝集素前体蛋白中,说明上述相对含量较高的多肽均来自于半夏和水半夏的凝集素类蛋白。

### 3.2 多肽种类数及差异性

利用UniPortKB收录的与半夏相关的211个蛋白质(截至2018年2月1日)作为蛋白质组数据库,采用PEAKS Studio 8.5软件对样品中的蛋白质进行解析鉴定。因存在部分含量非常低的多肽,故多次同法制备样品进样分析,发现重复性较差,说明该类多肽可能来自环境污染等方面,应对参数进行合理设置,以排除该类多肽对分析带来的干

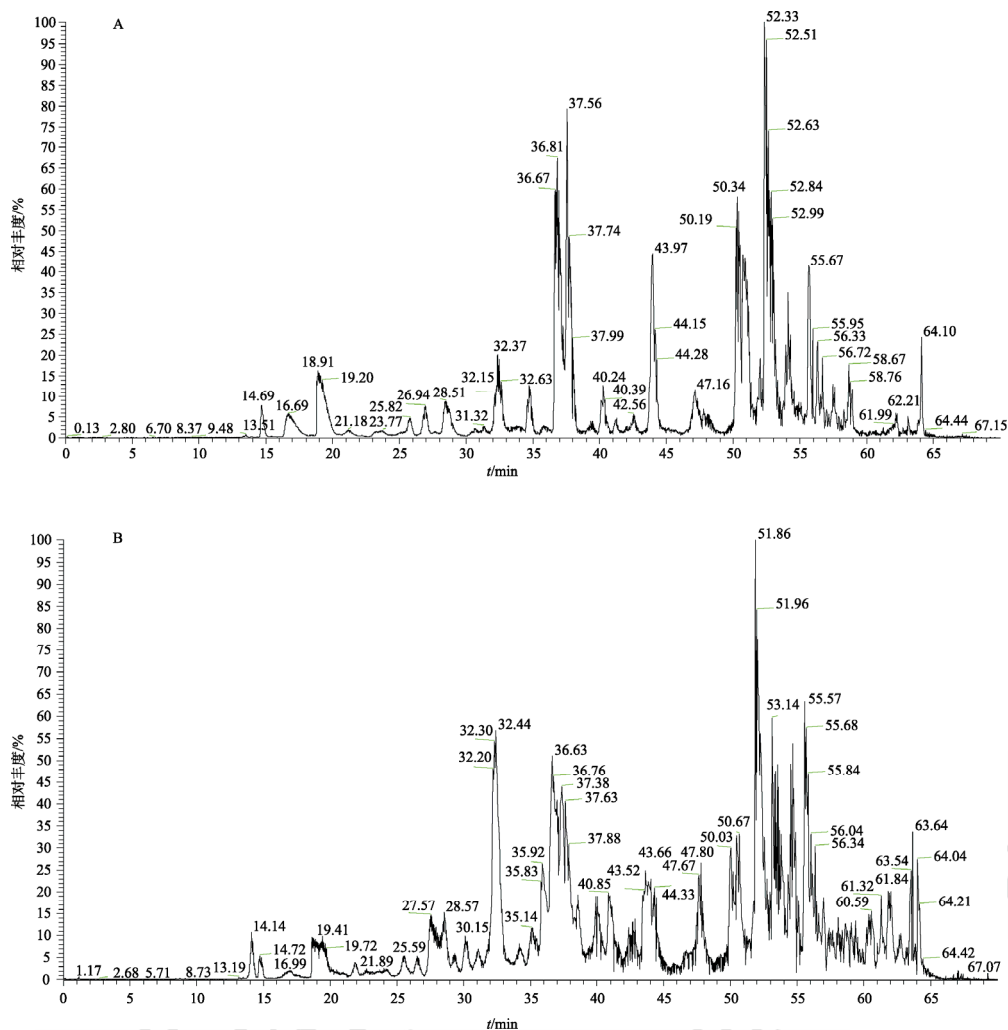


图1 多肽色谱图

A-半夏; B-水半夏。

Fig. 1 Polypeptide chromatograms

A-Pinellia Rhizoma; B-Typhonii Flagelliformi Rhizoma.

扰。相应的参数设置如下: FDR (Peptide-Spectrum Matches)=0.1%、FDR (Peptide Sequences)=0.1%、 $-10\lg P(\text{Peptide}) \geq 20$ 、 $-10\lg P(\text{Protein}) \geq 20$ 、 $\text{Ascore}(\text{Post-translational modification of Peptide}) \geq 0$ 、 $\text{Peptide mutation ion intensity} \geq 0\%$ 、 $\text{ALC}(\text{De novo only}) \geq 50\%$ 、 $\text{Proteins unique peptides} \geq 0$ , 设定无论氨基酸是否修饰还是变异全部进行检测。

半夏中多肽种类更加丰富, 比水半夏多出约300种。半夏和水半夏两者共有的多肽数近300种, 共有多肽种类占总多肽种类数分别为22%和29%, 说明两者的多肽种类组成差异明显, 结果见表1。两者含量前10的多肽组成差异更加明显, 结果见表2。在含量前10的多肽组成中仅有半夏中的GDYALVVHPEKG和水半夏中的GNYALVVHPEGR 2种结构相近的多肽存在。两者都来源于天南星科, 但在多肽组成及相对含量方面显示两者具有

明显的差异, 进一步说明两者应分属为不同的中药, 故临床上水半夏不能替代半夏使用。

表1 多肽检测结果

Tab. 1 Results of peptide detection

| 名称  | 多肽种类<br>总数 | 共有多肽<br>种类数 | 特异性多<br>肽种类数 | 共有多肽种类<br>所占比例/% |
|-----|------------|-------------|--------------|------------------|
| 半夏  | 1 346      | 296         | 1 050        | 22               |
| 水半夏 | 1 034      |             | 738          | 29               |

表2 含量前10的多肽的组成

Tab. 2 Composition of top 10 polypeptides

| 序号 | 半夏中的主要多肽        | 水半夏中的主要多肽                   |
|----|-----------------|-----------------------------|
| 1  | LAGVR           | LVYGPSVFK                   |
| 2  | SAASLN(+0.98)SR | GNYALVVHPEGR                |
| 3  | ALVVHPEGR       | GN(+0.98)YAFVVHPEGR         |
| 4  | SAASLNSR        | AFFPENADDDTVR(sub Q)        |
| 5  | NGNWQSNTANK     | AVGTNHLLSGETLDTN(+0.98)GHLR |
| 6  | SGWGNTK         | PLAFFPENADDDTVR(sub Q)      |
| 7  | LTLTNR          | IYGPSVFK                    |
| 8  | LTITNR          | GELVIKN(+0.98)GDGSIVFR      |
| 9  | ITITNR          | LVMQGD(+57.02)NLVLYGGDR     |
| 10 | GDYALVVHPEKG    | M(sub L)VIYGPSVFK           |

### 3.3 含量前10的蛋白质构成的分析

半夏中含量前 10 的蛋白质中有 7 个为凝集素蛋白质(Lectin 和 Agglutinin), 水半夏中有 6 个为凝集素蛋白质, 提示半夏和水半夏主要蛋白均为凝集素蛋白质。同时两者在含量前 10 的蛋白质中有 9 个是相同的, 说明两者的主要蛋白质种类存在非常高的相似性。含量前 10 的蛋白质排序可以反映出其相对含量的多寡, 虽然两者含有很多相同的蛋白质, 但是在半夏和水半夏中各种蛋白质的相对含量差异明显, 进一步说明两者应分属不同的中药, 结果见表 3。

表3 含量前10的蛋白质的组成

Tab. 3 Protein composition of top 10

| 序号 | 半夏中的主要蛋白质                                                                      | 水半夏中的主要蛋白质                                                                     |
|----|--------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | Agglutinin OS1=Pinellia ternata PE=4 SV=1                                      | Lectin OS1=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          |
| 2  | Lectin OS1=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          | Lectin OS2=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          |
| 3  | Lectin OS2=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          | Agglutinin OS1=Pinellia ternata PE=4 SV=1                                      |
| 4  | Lectin OS3=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          | Lectin OS3=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          |
| 5  | Lectin OS4=Pinellia ternata PE=4 SV=1                                          | Lectin OS4=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          |
| 6  | Agglutinin OS2=Pinellia ternata PE=4 SV=1                                      | 18.2 class I small shock hsp OS=Pinellia ternata PE=2 SV=1                     |
| 7  | Lectin OS5=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                          | Lectin OS5=Pinellia ternata PE=4 SV=1                                          |
| 8  | 18.2 class I small shock hsp OS=Pinellia ternata PE=2 SV=1                     | Small heat shock protein OS=Pinellia ternata GN=sHSP PE=2 SV=1                 |
| 9  | ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Pinellia ternata GN=atpB PE=3 SV=1 | ATP synthase subunit beta, chloroplastic OS=Pinellia ternata GN=atpB PE=3 SV=1 |
| 10 | Small heat shock protein OS=Pinellia ternata GN=sHSP PE=2 SV=1                 | LOS4 (Fragment) OS=Pinellia ternata PE=2 SV=1                                  |

注: 差异性蛋白质用斜体标示。

Note: Differential proteins were identified in Italics.

### 4 讨论

半夏和水半夏的多肽色谱图具有一定的相似性, 但两者在多肽数量及相对含量方面差异较大; 两者含量前 10 的蛋白质 90%是相同的, 但是蛋白质相对含量差异明显。半夏类中药临床上主要是水煎服用, 所含蛋白类物质经口服后在体内会被酶解或酸解成各种多肽, 所以多肽是半夏类药物在体内最终的药效物质, 因半夏和水半夏在多肽组成及含量方面存在显著的差异, 故对两者的功能主治方面带来较大影响。虽然半夏和水半夏都

具有燥湿化痰、止咳平喘的功能, 但本研究表明两者在蛋白质、多肽的种类及相对含量方面存在明显的差异, 故认为半夏和水半夏属于 2 种不同的中药, 临床上水半夏不能盲目替代半夏使用。虽然该研究表明半夏中多肽种类多于水半夏, 但一些研究表明, 水半夏中蛋白质含量高于半夏, 而水半夏的毒性也强于半夏, 说明两者所含蛋白类物质既是药效物质, 也是毒性物质, 应严格控制使用剂量, 防止使用超量中毒。

试验中还可能尝试利用代谢组学相关研究方法对两者进行化学成分比较, 发现两者所含有的小分子物质在数量和相对含量方面非常相近, 在不同检测波长、不同类型色谱柱、不同供试品溶液制备方法下获得的高效液相指纹图谱相似度都非常高, 未能将两者有效区分开来。本研究利用蛋白组学技术对两者所含有的凝集素类蛋白进行研究, 能够将其区分, 并有效揭示出两者在蛋白质水平上的内在差异, 可对进一步探索半夏与水半夏的药理作用差异提供帮助。

### REFERENCES

- [1] 郭钰芹. 半夏和水半夏的药理特点及配伍应用[J]. 基层医学论坛, 2017(21): 968-969.
- [2] ZHANG D Y. Clinical application and identification of Banxia and Shui Banxia[J]. Clin J Chin Med(中医临床研究), 2016, 8(11): 27-28.
- [3] 韩建红. 半夏与水半夏的鉴别及区分应用[J]. 基层医学论坛, 2015(19): 1211-1212.
- [4] 金阿响. 半夏与水半夏的药理特点及配伍应用[J]. 北方药学, 2014(11): 64-65.
- [5] 邱宝玉, 黄南龙, 张碧玉. 半夏与水半夏的区别与应用[J]. 中国民族民间医药, 2012(21): 60.
- [6] 许卫锋. 半夏及其混淆品水半夏的鉴别与质量研究[D]. 开封: 河南大学, 2007.
- [7] 冷晓波, 尹玉香. 姜半夏不能代替姜半夏[J]. 河南中医, 2013(33): 430-431.
- [8] JIANG X J, LIANG H L, HUANG S. Study on the quality standard of Rhizoma Typhonii Flagelliformis[J]. Asia-Pac Tradit Med(亚太传统医药), 2014, 10(4): 35-36.
- [9] XU W F, ZHANG H X. Determination and comparison of amino acids content of Pinelliae Rhizoma and Typhonii Flagelliformis Rhizoma[J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2011, 25(4): 31-32.
- [10] MENG X L, GUI X J, LI H W, et al. Advance in studies on chemical constituents and pharmacological activities of Typhonium[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2015, 24(17): 1985-1991.

收稿日期: 2019-07-31

(本文责编: 陈怡心)