

# 蒙古黄芪和膜荚黄芪水溶性蛋白表达

赵营莉<sup>1</sup>, 李娟<sup>1</sup>, 方兴<sup>2</sup>, 高贝贝<sup>2</sup>, 檀庭飞<sup>2</sup>, 宫鹏<sup>2</sup>, 夏泉<sup>2\*</sup>

(1. 合肥市第二人民医院, 合肥 230011; 2. 安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230022)

**[摘要]** 目的: 蒙古黄芪和膜荚黄芪都为药用黄芪,二者亲缘关系近,成分相似,药用价值尚未区分。该研究旨在建立蒙古黄芪和膜荚黄芪的水溶性蛋白表达谱,了解两种黄芪之间存在的差别。方法: 样品采用水超声提取和丙酮沉淀的方法得到黄芪水溶性蛋白成分,质谱级胰酶酶解后的肽段经 nano ESI-LC-MS/MS 分析,采用 Proteome Discoverer 1.4 软件比对豆科蛋白数据库鉴定蛋白,再使用非标记定量软件 SIEVE 分析蒙古黄芪与膜荚黄芪水溶性蛋白质表达的差异。最后运用生物信息学方法分析 2 种黄芪共有蛋白的分类、分子功能、参与的生物过程和信号通路。结果: 蒙古黄芪鉴定特异性蛋白有 920 个,膜荚黄芪鉴定的特异性蛋白有 717 个,2 种黄芪中共同表达的蛋白有 472 个,其中二者的差异表达蛋白有 21 个,如 PR-10 蛋白, NDK-1 蛋白,谷蛋白 A<sub>2</sub>,磷脂酶 D 等蛋白在两种黄芪中差异表达。蒙古黄芪高表达蛋白 14 个,膜荚黄芪高表达蛋白 7 个。结论: 蒙古黄芪和膜荚黄芪的水溶性蛋白表达谱存在显著差异,特异性蛋白、差异表达蛋白和共同表达的蛋白可为今后两种黄芪的鉴别、药理作用机制的研究和寻找作用靶点提供参考。

**[关键词]** 黄芪; 水溶性蛋白表达谱; 蛋白质组学; 生物信息学; 蒙古黄芪; 膜荚黄芪

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)05-0137-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200512

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191126.1817.010.html>

**[网络出版时间]** 2019-11-27 10:40

## Ater-soluble Protein Profiles of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *A. membranaceus*

ZHAO Ying-li<sup>1</sup>, LI Juan<sup>1</sup>, FANG Xing<sup>2</sup>, GAO Bei-bei<sup>2</sup>, TAN Ting-fei<sup>2</sup>, GONG Peng<sup>2</sup>, XIA Quan<sup>2\*</sup>

(1. The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011, China;

2. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China)

**[Abstract]** **Objective:** *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *A. membranaceus* are medicinal *Astragalus*, which are closely related and similar in composition, but with unclear medicinal value. Water-soluble protein profiles for *A. membranaceus* var. *mongholicus* and *A. membranaceus* were established to explore the differences between the two kinds of *Astragalus Radix*. **Method:** The water-soluble protein components were obtained through water ultrasonic extraction and acetone precipitation. After digested with trypsin, the obtained peptides were analyzed by nano ESI-LC-MS/MS method. Proteome Discovery 1.4 software was used to identify the proteins by comparing with the legume protein database, and the different expression water-soluble proteins were analyzed by the label-free quantitative software SIEVE. Finally, relevant information for common expression proteins, including classification, molecular function, involved biological process and signaling pathway, were analyzed by bioinformatics. **Result:** There were 920 and 717 specific proteins identified for *A. membranaceus* var. *mongholicus* and *A. membranaceus*, respectively. Totally 472 proteins were found to be co-expressed, in which 21

**[收稿日期]** 20190712(011)

**[基金项目]** 国家中医药管理局全国中药特色技术传承人才培养项目

**[第一作者]** 赵营莉, 硕士, 药师, 从事中药药理学和肿瘤基础研究, Tel:0551-62965321, E-mail:2433895340@qq.com

**[通信作者]** \*夏泉, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 从事天然药物活性成分的筛选研究, Tel:0551-62922154, E-mail:xiaquan2010@163.com

were differentially expressed, such as PR-10 protein, NDK-1 protein, glutelin A<sub>2</sub>, and phospholipase D. There were 14 highly expressed proteins in *A. membranaceus* var. *mongholicus* and 7 highly expressed proteins in *A. membranaceus*. **Conclusion:** There are significant differences in water-soluble protein profiles for two kinds of *Astragalus Radix*. Specific proteins, differentially expressed proteins and common expressed proteins can provide references for the identification of *A. membranaceus* var. *mongholicus* and *A. membranaceus*. It also can be used to define pharmacological mechanisms and search for drug action targets.

**[Key words]** *Astragalus Radix*; water-soluble protein profiles; proteomics; bioinformatics; *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*; *A. membranaceus*

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 和膜荚黄芪 *A. membranaceus* 的干燥根,具有补气升阳、固表止汗、利水消肿<sup>[1]</sup> 的功效。黄芪主要含有黄酮类、多糖类、皂苷类和氨基酸类成分,对机体心血管系统、免疫系统等作用效果显著,具有较好的抗肿瘤、抗疲劳、抗衰老作用<sup>[2]</sup>。黄芪药材所含的活性成分直接影响其临床所发挥的功效,因此黄芪质量评价受到长期关注。研究表明,不同基原、产地及生长年限的黄芪,所含化学成分存在明显的差异<sup>[3]</sup>;基于药效的评价发现,不同产地和种植方式的黄芪药理作用也有显著的差异,直接影响黄芪商品的质量规格等级,需建立更加全面、客观的黄芪药材质量评价标准<sup>[4]</sup>。目前评价黄芪药材质量的方法,除考察外观性状外,常综合有效成分如黄酮类、多糖类、皂苷类等含量分析,但这些评价标准有多种,且方法存在一定的差异<sup>[5]</sup>。近年来,为了更加全面合理地评价黄芪的质量,建立了黄酮类成分的指纹图谱<sup>[6]</sup>,多糖成分的糖指纹图谱<sup>[7]</sup>,皂苷类和黄酮类成分的核磁指纹图谱<sup>[8-9]</sup>。全面分析总结黄芪所含成分对提高黄芪质量和临床疗效具有重要意义。

黄芪作为“药食两用”的中药材,市场需求大,野生资源极少,目前主要采用栽培的方式生产。资源调查表明,栽培的黄芪品种中,约 80% 为蒙古黄芪,其次为膜荚黄芪<sup>[10]</sup>。从植物形态上看,由于蒙古黄芪和膜荚黄芪存在一定差异,因而相对容易鉴别;但药材或饮片的鉴别则需要建立更加有效、客观的分析方法。研究发现,蒙古黄芪和膜荚黄芪所含的化学类成分十分相似,通常蒙古黄芪较膜荚黄芪中含量高,但尚无法依据这些成分评价和区别这两种黄芪<sup>[11]</sup>。除了指纹图谱技术可用于评价和鉴别两种黄芪,所含蛋白质的成分差异,也是一个值得探索研究的方向。已有采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术建立蒙古黄芪蛋白质指纹图谱的研究,为蒙古黄芪药材的质量控制提供了参考<sup>[12]</sup>。随着现代分析

技术的发展,具有高通量筛选特点的蛋白质组学技术如能用于黄芪蛋白质成分的分析,将有助于更全面地了解这 2 种黄芪之间存在的差别。

蛋白质组学采用高分辨的蛋白质分离技术和高效的蛋白质鉴定技术,从整体水平上动态和定量研究生命现象及规律,近年来在分子生物学领域得到广泛应用。凭借其高通量筛选的优势,已在中医药研究中得到越来越广泛地应用,包括中药作用机制研究、中药材质量评价、中药作用靶点的筛选和中药资源研究等,促进了中药研究的现代化发展<sup>[13-14]</sup>。已有报道采用二维凝胶电泳的方法分析 3 种野生水稻品种和人工种植水稻之间蛋白质表达谱存在显著差异,并且是提高水稻营养质量的重要基因资源<sup>[15]</sup>。通过组合肽配体库技术和聚乙二醇分级沉淀法富集金银花低丰度蛋白后,用非标记蛋白质定量分析方法发现金银花蛋白质表达谱中次生代谢相关蛋白与其活性成分的产生有密切的相关性<sup>[16]</sup>。同时,蛋白质组学技术结合生物信息学分析,对于揭示中药道地药材分子作用机制、中药资源的研究提供了新的研究思路和技术手段<sup>[17]</sup>。蛋白质组学技术结合生物信息学分析建立了黄芪蛋白表达谱方面的研究,目前尚未见相关文献报道,是值得探索的领域。

本研究拟采用蛋白质组学方法,建立蒙古黄芪和膜荚黄芪的水溶性蛋白表达谱;阐明 2 种黄芪的共同表达蛋白、差异性蛋白和特异性蛋白表达情况,探讨蒙古黄芪和膜荚黄芪之间水溶性蛋白表达的差异;采用生物信息学方法分析差异蛋白涉及的生物学意义,并为今后在蛋白水平上鉴别 2 种黄芪基原和药理学作用研究提供实验基础。

## 1 材料

7 个蒙古黄芪植物样品分别采集自甘肃、河北、内蒙古(1~7 号),蒙古黄芪对照药材(8 号,中国食品药品检定研究院,批号 120974-201311);膜荚黄芪植物样品采集自河北(9~10 号),膜荚黄芪对照

药材(11, 12 号, 中国食品药品检定研究院, 批号 121462-201003, 121462-201304)。所有植物样品均由河北省邯郸市药品检验所的孔增科教授鉴定, 两种黄芪样品的信息见表 1。

表 1 黄芪样品信息

Table 1 Information of Astragalus Radix

编号	类别	来源
1	蒙古黄芪(药材)	甘肃菜子坪
2	蒙古黄芪(药材)	张家口涿源
3	蒙古黄芪(药材)	甘肃
4	蒙古黄芪(药材)	内蒙古武川
5	蒙古黄芪(药材)	甘肃陇西
6	蒙古黄芪(药材)	山西浑源
7	蒙古黄芪(药材)	甘肃
8	蒙古黄芪(粉末)	中国食品药品检定研究院
9	膜荚黄芪(药材)	河北安国
10	膜荚黄芪(药材)	河北定州
11	膜荚黄芪(粉末)	中国食品药品检定研究院
12	膜荚黄芪(粉末)	中国食品药品检定研究院

UltiMate3000 型高效液相色谱仪, Q-Exactive 型质谱仪, Proteome Discoverer 蛋白质组学工作站 (V2.0), SIEVE 非标记定量软件 (V2.3) (赛默飞世尔科技公司); HC-3018R 型高速冷冻离心机 (中科中佳科学仪器有限公司); H. H. S 型电热恒温水浴锅 (上海医疗器械三厂); Speed Vac concentrator 型旋转真空浓缩仪 (美国 Labconco 公司); 牛血清白蛋白 (BSA, 批号 AP0027), 丙酮 (国药集团化学试剂有限公司, 批号 20160601); 8M 尿素, 25 mmol·L<sup>-1</sup> Tris (Sigma, 批号 U4884, 10708976001); 甲酸 (阿拉丁, 批号 L807102) 和 乙腈 (Tedia 公司, 批号 18115020); 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量试剂盒 (碧云天公司, 批号 P0012S); 质谱级胰酶 Trypsin Gold Promega V5280 (Pierce 公司, 批号 0000340803)。豆科蛋白质组数据库 Leguminosae. fasta (下载自 ftp://ftp.uniprot.org/)。生物信息学网站 Panther (<http://www.pantherdb.org>)。

## 2 方法

**2.1 水溶性蛋白质的提取、定量和酶解** 称取药材粉末 0.5 mg 至离心管中, 加入双蒸水 5 mL, 超声 20 min, 以 12 000 r·min<sup>-1</sup> 转速离心 20 min, 吸取上清液后加入 3 倍体积的丙酮溶液并涡旋震荡, 于冰箱中静置沉淀过夜。以 5 000 r·min<sup>-1</sup> 转速离心

10 min 2 次后弃去上清, 得到的沉淀分 2 次、每次用丙酮 2 mL 洗涤, 离心后吸弃丙酮, 沉淀置于 4 ℃ 挥干。蛋白质沉淀用溶液 (8 mol·L<sup>-1</sup> 尿素, 25 mmol·L<sup>-1</sup> 的 Tris, 盐酸调 pH 8.0) 复溶, BCA 法测定蛋白质浓度。按照 1:50 的比例加入质谱级胰酶, 37 ℃ 水浴 17 h 后在真空旋转浓缩仪上干燥。

**2.2 水溶性蛋白质的 nanoLC-MS/MS 分析** 干燥的样品加入 0.1% 甲酸 50 μL 复溶, 采用 C<sub>18</sub> 色谱柱 (0.1 mm × 100 mm, 5 μm) 分离, 进样量 5 μL (2.5 μg)。流动相 A 为 5% 乙腈 (含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为 95% 乙腈 (含 0.1% 甲酸); 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 5% B; 5 ~ 45 min, 5% ~ 35% B; 45 ~ 50 min, 35% ~ 90% B; 50 ~ 55 min, 90% B; 55 ~ 56 min, 90% ~ 5% B; 56 ~ 65 min, 5% B)。2 个检测样本之间加一次流动相 A 进样以消除样本的残留, BSA 作为质控样本随行检测。

Q-Exactive 串联质谱: 母离子分辨率 70 000 MWFH。肽段筛选采用 HCD 模式碰撞能量为 27 eV, 子离子碎片分辨率 17 500 MWFH。一级扫描和二级扫描范围分别为 *m/z* 350 ~ 1 800, 200 ~ 2 000; 离子源电压 1.6 kV, 扫描模式正离子模式。动态排除设定为 15 s 内相同的母离子 MS/MS 不超过 2 次。自动增益控制通过离子阱 (Orbitrap) 来实现, 对 Orbitrap 内控制聚集量在 3 eV 以上的离子进行二级扫描鉴定。

**2.3 蛋白质的鉴定** Q-Exactive 质谱产生的原始数据经 X-Calibur 工作站输出后, 导入 SEQUEST 和 Proteome Discoverer 软件, 经过比对 Uniprot 网站下载的豆科蛋白质非冗余数据库检索, 得到被检测的黄芪水溶性蛋白质相关信息, Proteome Discoverer 1.4 软件以电子表格的形式导出包括蛋白质 GI 号、肽段覆盖率、相对分子质量、等电点、得分和蛋白名称等信息, 同时产生 .msf 格式的文件, 用于后续非标记定量分析 (Label-free) 软件 SIEVE 使用。

**2.4 非标记定量分析两种黄芪的差异性表达蛋白** 采用非标记定量分析 (Label-free) 软件 SIEVE 分析 2 种黄芪差异性表达的蛋白。差异性表达的标准设置为至少 6 个肽段匹配, 超过 10% 的序列覆盖率, 肽段的得分 > 16, 表达差异在 1.2 倍以上 (*P* < 0.05)。

## 3 结果

**3.1 蒙古黄芪和膜荚黄芪水溶性蛋白质鉴定** 12 个黄芪样品经 LC-MS/MS 测定后所得的数据, 经 Proteome Discoverer 软件中的 SEQUEST 程序比对

UniProt 数据库中下载的的豆科蛋白数据库后,得到黄芪水溶性蛋白相关信息。12 个样品的 LC-MS/MS 总离子流图谱见图 1。对 2 种黄芪水溶性蛋白鉴定

结果进行统计分析,发现蒙古黄芪的特异性蛋白有 920 个,膜荚黄芪的特异性蛋白有 717 个,在 2 种黄芪中共同表达的蛋白有 472 个,结果见图 2。

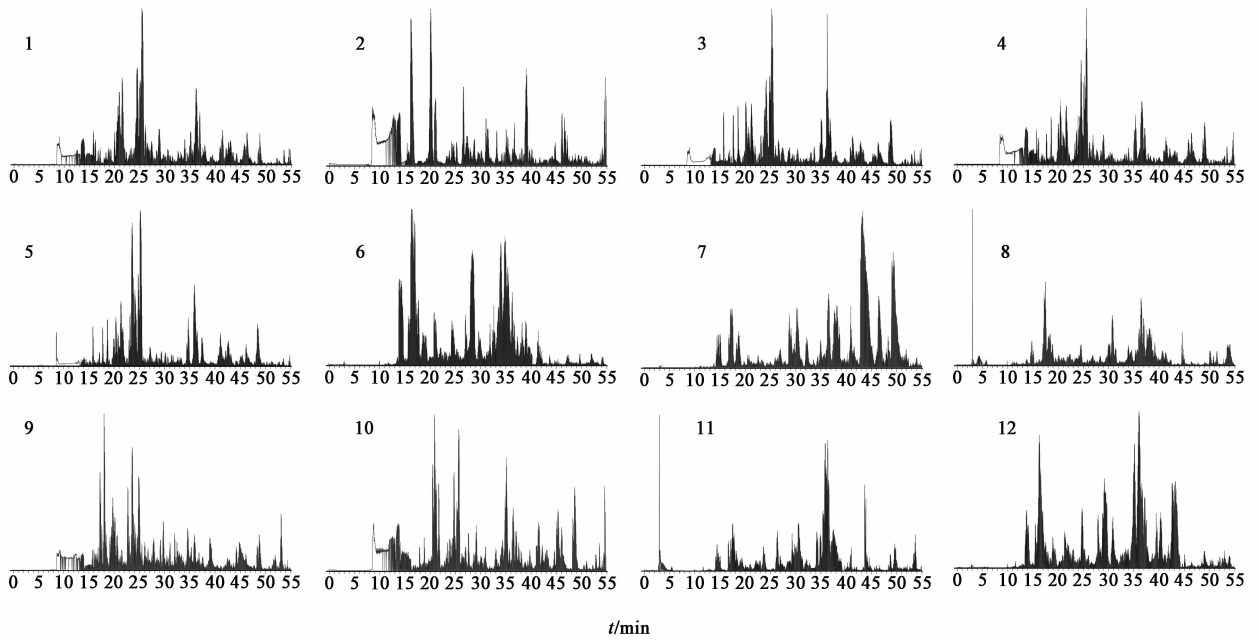


图 1 12 个黄芪样品的总离子流

Fig.1 Total ion current chromatograms of 12 Astragalus Radix samples

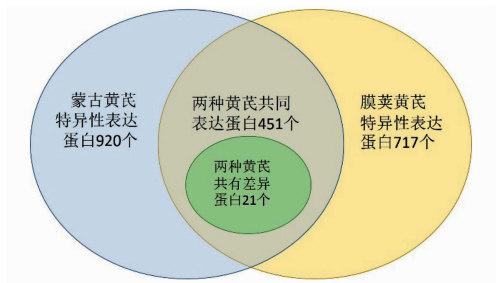


图 2 两种黄芪水溶性蛋白鉴定的情况

Fig.2 Overview of number of proteins identified in two groups

**3.2 蒙古黄芪与膜荚黄芪中差异表达的蛋白** 使用非标记定量软件 SIEVE (V2.3) 分析蒙古黄芪组与膜荚黄芪组蛋白质表达的差异,共发现差异表达蛋白有 21 个 (Ratio: 0.2 ~ 10), 包括 pathogenesis-related protein class 10 (PR-10), nucleoside diphosphate kinase-1 (NDK-1), 谷蛋白 A2 (glutelin type-A 2 $\alpha$ -1) 等,结果见表 2。

**3.3 451 个共有蛋白生物信息学分析** 将 451 个共有蛋白 Protein ID 导入 Panther 生物信息学网站,分析这些蛋白的分类、分子功能、参与的生物过程及信号通路,结果见表 3。这些蛋白质主要是核酸结合蛋白、转移酶、氧化还原蛋白等。主要的分子功能有结合、催化活性、分子功能调节剂、分子换能器

活动、结构分子活性、转录调节因子活性、转运活动。涉及的生物过程包括组织或生物发生、细胞定位、代谢过程、繁殖、应激反应、细胞过程等。黄芪水溶性蛋白参与的分子信号通路研究非常重要,利于揭示其药理作用机制,找寻药物作用靶点。在本研究中,这些蛋白主要参与的信号通路有阿尔茨海默病-衰老素途径,细胞凋亡信号通路,B 细胞激活,钙黏蛋白信号通路,Rho GTP 酶进行细胞骨架调节,嘌呤从头生物合成,嘧啶脱氧核糖核苷酸从头生物合成,嘧啶核糖核苷酸从头生物合成,一般转录调控,糖酵解,异源三聚体 G 蛋白信号通路-Gi alpha 和 Gs alpha 介导的通路,亨廷顿病,趋化因子和细胞因子信号通路介导的炎症,烟碱乙酰胆碱受体信号通路,帕金森病,T 细胞活化,bZIP 转录因子转录调控,Wnt 信号通路。

#### 4 讨论

本研究采用蛋白质组学技术,提取蒙古黄芪和膜荚黄芪的水溶性蛋白进行质谱分析并鉴定,为黄芪水溶性蛋白表达谱的建立提供参考。研究发现,蒙古黄芪鉴定特异性蛋白有 920 个,膜荚黄芪鉴定的特异性蛋白有 717 个,2 种黄芪共同表达的蛋白有 472 个,说明蒙古黄芪和膜荚黄芪的水溶性蛋白表达谱存在显著差异,2 种黄芪所含水溶性蛋白成

表 2 蒙古黄芪与膜荚黄芪 21 个差异表达蛋白

Table 2 21 differentially expressed proteins between *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *A. membranaceus*

No.	蛋白质编号	蛋白质名称	相对分子质量/kDa	等电点	比值
1	359754801	病程相关蛋白 10	16.5	5.07	2.909
2	502173457	核苷二磷酸激酶 1	16.5	6.80	0.461
3	1012365619	谷蛋白 A <sub>2</sub>	38.7	6.16	9.448
4	502080759	磷脂酶 D	92.1	5.78	6.351
5	950962541	转醛醇酶	48.2	6.35	0.771
6	26245395	核苷二磷酸激酶	16.3	7.50	7.882
7	1021584633	蛋白酶体亚基	25.6	5.68	9.551
8	922335764	酪氨酸激酶家族蛋白	27.2	5.66	0.197
9	922391387	α-1,4 葡聚糖合酶	41.0	5.96	5.468
10	112791581	S-腺苷高半胱氨酸水解酶	21.2	5.15	7.610
11	356496132	I 型凝集素	38.6	9.41	3.652
12	87240471	糖苷水解酶 17 家族	43.5	8.65	0.182
13	355490389	钴胺素非依赖性蛋氨酸合成酶	90.6	7.23	1.649
14	1370285	谷胱甘肽还原酶	53.9	7.01	3.572
15	1012363840	半胱氨酸合成酶	34.1	5.31	0.782
16	146215972	铜/锌超氧化物歧化酶	15.2	6.32	0.211
17	1012357012	热休克同源蛋白 70	71.1	5.21	3.066
18	575074860	3-磷酸甘油醛脱氢酶	36.8	7.31	5.993
19	1012169833	受体样-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	82.4	9.14	0.895
20	357470433	营养储藏蛋白	38.4	6.40	8.585
21	657396914	叉头盒蛋白	31.6	5.49	7.503

注:蛋白质编号是蛋白质的 GI 编号;比值为蒙古黄芪/膜荚黄芪的蛋白含量。

分不同,这可能与种质资源、生长环境等因素存在密切的联系。黄芪水溶性蛋白表达谱的建立,是对现有的黄酮类成分、多糖成分和皂苷类成分评价体系的一个补充,对于综合性评价黄芪的质量具有参考价值,也符合中药多成分、多靶点等特征,应用于黄芪质量控制与评价,能较全面反映了药材的差异性与均一性。

黄芪的主要有效成分是皂苷类、黄酮类和多糖类等次生代谢产物,有研究发现,蒙古黄芪所含的三萜皂苷和黄酮类成分高于膜荚黄芪<sup>[18-19]</sup>。三萜皂苷合成主要经过异戊二烯途径,经甲羟戊酸起始阶段、三萜类骨架构建阶段和糖基化修饰阶段,最终获得不同类型的三萜皂苷产物<sup>[20]</sup>。黄酮类化合物则是由苯丙素起始的植物次生代谢产物,包括黄酮类和异黄酮类,其合成代谢途径中的基因包括编码酶的结构基因和调控基因。黄酮类化合物参与植物生物学过程,包括紫外防护、抗氧化和防御机制,其合成的关键酶是苯丙氨酸解氨酶(PAL)。植物病程相关蛋白 10 (pathogenesis-related protein class 10, PR-10) 基因的沉默会下调 PAL 的表达和查耳酮合成酶转录水平的减少,进而减少某些黄酮类成分的合成,

说明 PR-10 与 PAL 之间存在正相关<sup>[21]</sup>。本研究发现蒙古黄芪中 PR-10 高表达,推测其 PAL 表达也较高,可能是其黄酮类含量比膜荚黄芪高的原因之一,但仍需进一步的研究证实。2-羟基异黄酮合成酶(IFS)作为一种调控基因,能催化芳基转移反应,使黄酮类化合物转化成异黄酮类化合物<sup>[22]</sup>。研究发现,蒙古黄芪经谷胱甘肽(GSH)处理后 IFS 基因表达增加,说明 GSH 具有诱导异黄酮合成的作用<sup>[23]</sup>。谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)主要的生理功能是将氧化型谷胱甘肽还原成还原型谷胱甘肽,本研究发现蒙古黄芪中 GR 的表达是膜荚黄芪 3.57 倍,这可能与蒙古黄芪中含有较高的异黄酮存在一定的关联。

本研究同时发现,核苷二磷酸激酶-1 (nucleoside diphosphate kinase-1, NDPK-1),糖苷水解酶家族 17 (Glycoside hydrolase family 17, GH-17) 等 7 个蛋白在膜荚黄芪中表达较高。NDPK-1 调节淀粉与纤维素的合成途径中碳元素的分布,从而参与淀粉和纤维素的合成,表现为正向调节植物纤维素和反向调节淀粉的含量,在细胞生长发育、非生物胁迫和感病应急等方面发挥重要作用<sup>[24]</sup>。GH-17

表 3 451 个共有蛋白生物信息学分析

Table 3 Bioinformatics analysis of 451 common expression proteins by PANTHER

分析方向	主要内容	比例	分析方向	主要内容	比例	
蛋白质分类	calcium-binding protein (PC00060)	4.2	通路	response to stimulus (GO:0050896)	3.4	
	cytoskeletal protein (PC00085)	4.2		Alzheimer disease-presenilin pathway (P00004)	4.3	
	enzyme modulator (PC00095)	4.2		Apoptosis signaling pathway (P00006)	4.3	
	hydrolase (PC00121)	8.3		B cell activation (P00010) explode	4.3	
	ligase (PC00142)	4.2		Cadherin signaling pathway (P00012)	4.3	
	lyase (PC00144)	4.2		Cytoskeletal regulation by Rho GTPase (P00016)	4.3	
	nucleic acid binding (PC00171)	16.7		De novo purine biosynthesis (P02738)	8.7	
	oxidoreductase (PC00176)	12.5		De novo pyrimidine deoxyribonucleotide biosynthesis (P02739)	4.3	
	receptor (PC00197)	4.2		De novo pyrimidine ribonucleotides biosynthesis (P02740)	4.3	
	transcription factor (PC00218)	8.3		general transcription regulation (P00023)	4.3	
	transferase (PC00220)	16.7		glycolysis (P00024)	8.7	
	transporter (PC00227)	12.5		heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway (P00026)	4.3	
	分子功能	binding (GO:0005438)		26.5	heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction (P00028)	4.3
		catalytic activity (GO:0003824)		55.1	huntington disease (P00029)	8.7
molecular function regulator (GO:0098772)		4.1	inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway (P00031)	4.3		
molecular transducer activity (GO:0060089)		2	nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway (P00044)	4.3		
structural molecule activity (GO:0005198)		2	Parkinson disease (P00049)	8.7		
transcription regulator activity (GO:0140110)		4.1	T cell activation (P00053)	4.3		
translation regulator activity (GO:0045182)		2	Transcription regulation by bZIP transcription factor (P00055)	4.3		
transporter activity (GO:0005215)		4.1	Wnt signaling pathway (P00057)	4.3		
生物过程		cellular process (GO:0009987)	6.8			
		cellular component organization or biogenesis (GO:0071840)	8.5			
	cellular process (GO:0009987)	42.4				
	localization (GO:0051179)	3.4				
	metabolic process (GO:0008152)	33.9				
	reproduction (GO:0000003)	1.7				

能从聚合物结构中分离单糖链,并在每次催化事件后非解离性地裂解糖苷键,从而使多糖发生解聚产生寡糖和单糖<sup>[25]</sup>。多糖是黄芪的有效成分之一,有研究发现黄芪中多糖和可溶性糖的含量随季节发生变化,霜后蒙古黄芪中多糖含量高于膜荚黄芪,可溶性糖的含量则低于膜荚黄芪<sup>[26]</sup>。鉴于 GH-17 能酶解多糖的功能,高表达 GH-17 的膜荚黄芪多糖的含量可能相对较低,进而在发挥多糖药理作用方面与蒙古黄芪存在一定的差异。谷蛋白 A<sub>2</sub> 是重要的营养储藏蛋白,可提供人体必须的纤维素和维生素 B 等<sup>[27]</sup>。磷脂酶 D 参与各种生理过程,包括植物对病原体的反应,通过在激素和应激信号中与各种蛋白

质相互作用,发挥功能多样性的防御机制<sup>[28]</sup>。转醛醇酶是磷酸戊糖途径 (PPP) 非氧化阶段的关键酶,与植物的生长发育和环境胁迫应答相关,广泛参与胞内信号转导等<sup>[29]</sup>。核苷二磷酸激酶 (NDPKs) 主要参与维持核苷二磷酸和核苷三磷酸的平衡,与植物生长发育、光合作用、活性氧清除和能量代谢有关<sup>[30]</sup>。S-腺苷高半胱氨酸水解酶属于蛋白水解酶,是生物体内调节甲基循环代谢的关键酶,其活性下降或抑制会影响细胞正常的代谢<sup>[31]</sup>。I 型凝集素是一类跨膜受体样激酶,在生物和非生物应激反应和植物发育中具有一定的作用<sup>[32]</sup>。3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 是糖酵解过程中的关键酶,参与糖酵

解和能量生成,还参与催化微管聚合、调节蛋白质表达与磷酸化等多种其他生理功能<sup>[33]</sup>。研究发现的特异性蛋白、差异表达蛋白和共同表达的蛋白可为今后两种黄芪的鉴别、药理作用机制的研究和寻找作用靶点提供参考。

黄芪的药理作用众多,在心血管方面有着保护心肌的作用,对于血流变性,黄芪有着抗血小板黏附、调节血液成分的作用,在消化系统疾病中有退黄降酶的疗效。此外黄芪还能促进胰岛素分泌,促进蛋白质合成,促进细胞免疫,抗衰老,减少自由基的氧化作用<sup>[28,34]</sup>。在本研究的结果中,生物信息学分析揭示的 451 个共有蛋白所涉及的生物学意义在一定程度上揭示了其可能的药理作用机制。21 个差异表达蛋白提示蒙古黄芪和膜荚黄芪在药理作用方面可能存在一定的不同之处,这需要今后进一步的实验证实。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:300-303.

[2] 吴娇,王聪. 黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J]. 新乡医学院学报,2018,35(9):755-760.

[3] 田华,邓雁如,周坤,等. 蒙古黄芪的化学成分研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(7):70-73.

[4] 曹庆伟,张瑞,李科,等. 蒙古黄芪质量评价及商品规格等级研究进展[J]. 山西医科大学学报,2019,50(6):854-859.

[5] 牛倩芸,万燕晴,李震宇,等. 不同商品等级黄芪质量评价研究[J]. 中药材,2015,38(6):1186-1190.

[6] 牟佳佳,陈芳,陈党辉,等. 黄芪中 5 种黄酮类成分的含量测定及其指纹图谱研究[J]. 药物评价研究,2019,42(5):900-906.

[7] 王迪,刘磊,李科,等. 基于内切-1,3-β-葡聚糖酶水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪鉴别[J]. 中草药,2018,49(10):2320-2327.

[8] 李爱平,陈佳佳,李震宇,等. 基于核磁共振图谱黄芪药材均一性评价研究[J]. 中药材,2017,40(9):2107-2111.

[9] 宋成英,封加福. HPLC 同时测定黄芪药材中毛蕊异黄酮葡萄糖苷和黄芪甲苷[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(11):115-117.

[10] 秦雪梅,李震宇,孙海峰,等. 我国黄芪药材资源现状与分析[J]. 中国中药杂志,2013,38(19):3234-3238.

[11] 李锐,付铁军,及元乔,等. 膜荚黄芪与蒙古黄芪化学成分的高效液相色谱-质谱研究[J]. 分析化学,2005,33(12):1676-1680.

[12] 刘杨,包华音,刘德丽,等. 黄芪蛋白提取方法的比较

[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(20):76-78.

[13] 朱宇伟,于庆云,刘培,等. 蛋白质组学在中医药科学研究中的应用进展[J]. 中国现代中药,2016,18(5):661-665.

[14] 范芳芳,赵可惠,王天虹,等. 蛋白质组学在我国传统医药研究领域应用的文献计量学分析[J]. 中华中医药学刊,2018,36(4):876-879.

[15] JIANG C, CHENG Z, ZHANG C, et al. Proteomic analysis of seed storage proteins in wild rice species of the *Oryza* genus[J]. *Proteome Sci*,2014,12(1):51.

[16] ZHU W, XU X, TIAN J, et al. Proteomic analysis of *Lonicera japonica* Thunb. immature flower buds using combinatorial peptide ligand libraries and polyethylene glycol fractionation[J]. *J Proteome Res*,2016,15(1):166-181.

[17] 谢腾,王升,马炯,等. 生物信息学在中药资源研究中的应用[J]. 中国中药杂志,2012,37(24):3684-3690.

[18] 江蔚新,葛坤如,薛宝玉. 不同种类黄芪根中有效成分的比较[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2004,20(4):387-389.

[19] LI Y, GUO S, ZHU Y, et al. Comparative analysis of twenty-five compounds in different parts of *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* and *Astragalus membranaceus* by UPLC-MS/MS [J]. *J Pharm Anal*,2019,doi: 10.1016/j.jpha.2019.06.002.

[20] 陈颖,孙海燕,曹银萍. 三萜皂苷生物合成途径研究进展[J]. 中国野生植物资源,2019,30(6):15-17.

[21] MUÑOZ C, HOFFMANN T, ESCOBAR N M, et al. The strawberry fruit Fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis[J]. *Mol Plant*,2012,31(1):113-124.

[22] 康亚兰,裴瑾,蔡文龙,等. 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展[J]. 中草药,2014,45(9):1336-1341.

[23] 张丹凤. 蒙古黄芪异黄酮合成酶基因的克隆及序列分析[D]. 福州:福建农林大学,2004.

[24] 朱馨妮,汪珊珊,周佳琴,等. 植物核苷二磷酸激酶研究进展[J]. 生物技术通报,2017,33(11):19-28.

[25] BECKHAM G T, STÅHLBERG J, KNOTT B C, et al. Towards a molecular-level theory of carbohydrate processivity in glycoside hydrolases [J]. *Curr Opin Biotechnol*,2014,27:96-106.

[26] 曹建军,王长如,梁宗锁,等. 不同黄芪品种根中多糖的动态积累及多糖含量比较研究[J]. 西北植物学报,2006,26(6):1263-1266.

[27] CHEN Y, QU L Q, JIA X. Expression pattern of UidA gene under the control of rice glutelin GluA-2 gene upstream sequence in transgenic rice endosperm [J]. *Acta Genetica Sinica*,2004,31(3):281-286.

- [28] LI J, WANG X. Phospholipase D and phosphatidic acid in plant immunity[J]. *Plant Sci*, 2019, 279: 45-50.
- [29] WILLIAMS M, VALAYANNOPOULOS V, ALTASSAN R, et al. Clinical, biochemical, and molecular overview of transaldolase deficiency and evaluation of the endocrine function: Update of 34 patients[J]. *J Inher Metab Dis*, 2019, 42(1): 147-158.
- [30] 朱馨妮, 汪珊珊, 周佳琴, 等. 植物核苷二磷酸激酶研究进展[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(11): 19-28.
- [31] 廖素环, 施李鸣, 温荣辉, 等. S-腺苷高半胱氨酸水解酶在甲基循环中的代谢调节[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(6): 115-118.
- [32] WANG Y, BOUWMEESTER K, BESEH P, et al. Phenotypic analyses of *Arabidopsis* T-DNA insertion lines and expression profiling reveal that multiple L-type lectin receptor kinases are involved in plant immunity[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2014, 27(12): 1390-1402.
- [33] 梁颖, 李玉花. 植物中磷酸甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)在氧化胁迫下的生理功能[J]. *植物生理学通讯*, 2009, 45(10): 1027-1032.
- [34] 汪娟. 黄芪的药理作用研究进展[J]. *医疗装备*, 2018, 31(14): 202-203.

[责任编辑 顾雪竹]