

· 基础研究 ·

基于体外模拟消化与蛋白质组学技术的
鸡内金研究与分析[△]袁铭君¹, 叶杨玉¹, 付璐¹, 周一鸣^{1,2}, 刘姣¹, 李军德¹, 袁媛¹, 张恬^{1*}

1. 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700;

2. 中国中医科学院 中医药健康产业研究所, 江西 南昌 330029

【摘要】 目的: 通过体外模拟消化研究与蛋白质组学技术, 分析鸡内金的促消化作用及其蛋白质组成, 为完善鸡内金质量评价体系提供参考。**方法:** 采集市售鸡内金, 鉴定其性别来源、测量其厚度、记录其颜色; 利用静态多室多酶体外消化模型, 考察不同性状鸡内金对底物消化率的影响, 并利用蛋白组学技术鉴定鸡内金中蛋白质组分。**结果:** 添加鸡内金后, 底物干物质消化率与能量消化率分别增加了 5.8% 和 8.2%; 鸡内金颜色及原动物性别对底物干物质消化率与能量消化率均无显著影响; 厚度与干物质消化率相关性显著 ($P<0.05$), 但未遵循线性规律。鸡内金厚度与淀粉酶活力呈极显著正相关 ($P<0.01$), 随厚度增加, 淀粉酶活力上升。共从鸡内金中鉴定到 1541 种蛋白质, 相对丰度较高的蛋白有胃动蛋白 2、富含半胱氨酸的分泌蛋白、埃兹蛋白等。所测蛋白质主要富集在代谢、核糖体、碳代谢、蛋白酶体、三羧酸循环等京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路上, 其中富集到代谢通路上的蛋白质最多 (240 种)。**结论:** 体外模拟消化实验在一定程度上可体现鸡内金促消化能力, 可为鸡内金或其他消食类中药质量评价提供参考; 推测胃动蛋白 2 和埃兹蛋白与鸡内金健脾消食的功效有关。

【关键词】 鸡内金; 消化率; 蛋白质组学**【中图分类号】** R282 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-4890(2023)01-0064-09**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20220714002**Digestion-promoting Function and Protein Composition of Galli Gigerii Endothelium Corneum: A Study Based on *in Vitro* Simulated Digestion and Proteomics**YUAN Ming-jun¹, YE Yang-yu¹, FU Lu¹, ZHOU Yi-ming^{1,2}, LIU Jiao¹, LI Jun-de¹, YUAN Yuan¹, ZHANG Tian^{1*}

1. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Institute of Traditional Chinese Medicine Health Industry, China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanchang 330029, China

【Abstract】 Objective: To study the digestion-promoting function and protein composition of Galli Gigerii Endothelium Corneum (GGEC) via simulated digestion *in vitro* and proteomics tools and provide reference for improving the quality evaluation system of GGEC. **Methods:** The GGEC sample was purchased from the market, with the animal sex identified, the thickness measured, and the color recorded. A static multi-compartment and multi-enzyme digestion model was used to investigate the effects of the GGEC samples with different animal sexes, thickness, and colors on substrate digestibility. Proteomic tools were employed to identify the proteins in GGEC. **Results:** The addition of GGEC increased the dry matter digestibility and energy digestibility of the substrate by 5.8% and 8.2%, respectively. The color and animal sex of GGEC had no significant effect on the dry matter digestibility or energy digestibility of the substrate. The thickness of GGEC was correlated with dry matter digestibility ($P<0.05$), which did not follow a linear rule. GGEC thickness had a positive correlation with amylase activity ($P<0.01$). In addition, a total of 1541 proteins were identified from GGEC, of

[△] **【基金项目】** 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82104346); 中国中医科学院科技创新工程项目 (CI2021A04012, CI2021A05202); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (ZZXT202007)

* **【通信作者】** 张恬, 助理研究员, 研究方向: 药用动物与动物药材; E-mail: lffmsfe@126.com

which gastrokine 2, cysteine-rich secretory protein, ezrin, etc. had high relative abundance. The identified proteins were mainly enriched in the metabolism, ribosome, carbon metabolism, proteasome, and tricarboxylic acid cycle pathways, and the metabolism pathway was enriched with the most proteins (240). **Conclusion:** The simulated digestion *in vitro* can reflect the digestion-promoting ability of GGEC and provide reference for the quality evaluation of GGEC or other Chinese medicines for digestion. Gastrokine 2 and ezrin may be associated with the role of GGEC in invigorating spleen and promoting digestion.

[Keywords] Galli Gigerii Endothelium Corneum; digestibility; proteomics

鸡内金来源于雉科动物家鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson 的干燥砂囊内壁, 具有健脾消食、涩精止遗、通淋化石的功效, 常用于治疗食积不消、呕吐泻痢、小儿疳积、遗尿遗精、石淋涩痛^[1]。据统计, 269 882张内科处方中鸡内金使用频率排在内科用药频率的第35位^[2], 其在医药、保健食品等领域应用不断拓展, 质量问题逐渐受到关注。从神农尝百草至今, 以形、色、味、效等为主的中药质量评价方式占据重要地位。历代本草中不乏有对优质鸡内金的描述, 如“男用雌、女用雄”^[3]、“乌雄者良”^[4]、“色黄者为佳”^[5]等, 历代本草对优质鸡内金的选用说法不一, 但现代并未有相关研究对其进行验证。《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 2020年版鸡内金项下规定“厚约2 mm”^[1], 但厚度与鸡内金功效间的关系尚不明确。此外, 鸡内金物质基础复杂, 普遍认为其活性物质可能为蛋白质类。

体外模拟消化是通过模拟动物消化生理特点, 采用适宜条件, 体外模拟胃肠环境, 并通过检测目标物质变化, 反映摄入物质的生物利用情况, 具有简单、经济、快速、通用、可重复等优点。体外模拟消化已广泛用于饲料、食品、药品及保健品等的检测和评价, 如检测食物消化的稳定性、肠道运输和代谢、预测食物中不同成分的生物利用率及药品缓释等^[6]。蛋白质组学是一种可以了解生物体内蛋白质种类、功能、相互作用等的新兴技术, 已在新药物靶标发现、蛋白质等活性药物的发现领域有所应用^[7]。Risch等^[8]应用蛋白质组学技术研究了蛇毒的蛋白质组成; Bringans等^[9]对蝎子毒液的蛋白质进行了分析, 发现了具有抗菌活性的蛋白; Xu等^[10]发现了牛虻唾液中与凝血、免疫抑制相关的一系列蛋白质和肽。

本研究运用体外模拟消化模型与蛋白质组学技术对鸡内金的促消化作用和鸡内金蛋白质组成进行分析研究, 以期填补其基础研究空白, 为完善质量评价体系提供理论依据, 为活性成分研究提供新的思路。

1 材料

1.1 样品

从山东、四川、湖北、广东、云南、安徽等地采集鸡内金样品20批, 经中国中医科学院中药资源中心李军德研究员鉴定为雉科动物家鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson 的干燥砂囊内壁。每批次取单一完整样品5份, 共计100份鸡内金作为体外消化试验样品, 从20批鸡内金中取单一完整样品44份进行淀粉酶及胃蛋白酶活力测定, 取20批中的3批鸡内金用于蛋白质组学检测。玉米、豆粕等组成的混合物作为底物, 粉碎, 过60目筛, 其能量为17 031 J·g⁻¹。

表1 鸡内金样品信息

序号	生产厂家	批号
1	亳州市沪谯药业有限公司	1804130142
2	康美药业股份有限公司	180106621
3	康美药业股份有限公司	18050401
4	亳州市沪谯药业有限公司	1712200292
5	广州市香雪制药股份有限公司	201703001A
6	康美药业股份有限公司	180701051
7	浙江华宇药业股份有限公司	180717-1
8	云南向辉药业有限公司	P20180645
9	安徽药知源中药饮片有限公司	180401
10	上海德华国药制品有限公司	2018062302
11	康美药业股份有限公司	180405111
12	湖北天济药业有限公司	20180102
13	上海德大堂国药制品有限公司	17121906
14	康美药业股份有限公司	180308041
15	江西樟树天齐堂中药饮片	1806005
16	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司	1804003
17	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司	1804004
18	浙江华宇药业股份有限公司	180603-1
19	江西樟树天齐堂中药饮片有限公司	1807006
20	北京芝参堂药业有限公司 (北京众润中空高杨树大药房)	

1.2 仪器

SHA-C型恒温水浴振荡器 (常州润华电器有限

公司); 6400型全自动氧弹量热仪(美国PARR公司); Veriti™型聚合酶链式反应(PCR)仪、Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪、Varioskan Flash型全波长多功能酶标仪、Easy-nLC 1200型高效液相色谱仪、Orbitrap Fusion Lumos型质谱仪(美国Thermo公司); QL-901 Vortex型漩涡振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); G:BOX F3 SYNGENE型凝胶成像系统(英国Syngene公司); 5810R型台式高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司); SCIENTZ08-II型超声破碎仪(宁波新芝生物科技有限公司); CEBO-24型高通量组织研磨仪(上海测博生物科技发展有限公司)。

1.3 试剂

胃蛋白酶(批号: BCCC1803, 无锡雪梅酶制剂厂); 胰蛋白酶(批号: SLCF4576, 国药集团化学试剂有限公司); Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System试剂盒(批号: 0000432787)、二硫苏糖醇(DTT)均购自普洛麦格北京生物技术有限公司; Taq聚合酶(批号: AJ12287A, 北京聚合美生物科技有限公司); 磷酸二氢钠(批号: 20210612)、磷酸二氢钾(批号: 20211004)均购自天津市鼎盛鑫化工有限公司; 磷酸氢二钠(批号: 20210112)、麦芽糖(批号: 20210125)均购自天津市津科精细化工研究所; 支链淀粉(批号: MC0720)、考马斯亮蓝(批号: 415E031)均购自北京索莱宝科技有限公司; 牛血红蛋白(批号: T11M11Q112656, 上海源叶生物科技有限公司); 酪氨酸(批号: 0T30192440, 北京库莱博科技有限公司); 三氯乙酸(批号: 20180807, 天津福晨化学试剂有限公司); 乙腈(批号: A955-4)、甲酸(批号: A117-50)均购自美国Thermo Fisher公司; 碳酸氢铵(批号: 09830-500G)、脱氧胆酸钠(批号: D6750)均购自上海Sigma公司; 10-kDa filter柱(美国Pall Corporation公司)。

2 方法

2.1 鸡内金性状测定

2.1.1 雌雄鉴别 称取鸡内金粉末20 mg, 参照Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System试剂盒说明书提取DNA。使用微量核酸蛋白分析仪测定DNA浓度、吸光度(A), 计算 $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 及

$A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$, 检测合格的DNA进行PCR扩增, 扩增所用引物分别为F: 5'-AGTGCATTGCAGAAGCAA TATT-3'; R: 5'-GCCTCCTGTTTATTATAGAATTCAT-3'。PCR扩增体系(总体积为25 μL): 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μL 、DNA模版1 μL 、dNTP Mixture 1.5 μL 、上下游引物各0.25 μL 、Taq DNA聚合酶0.2 μL 、双蒸水19.3 μL 。PCR扩增程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性20 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸5 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。550 bp处有单一DNA条带为雄性, 在550、450 bp处各有1条DNA带为雌性。

2.1.2 外观性状测定 利用游标卡尺测量鸡内金边缘厚度, 取3点测量, 取平均值。记录每份样品颜色, 分为黄色、黄绿色、绿色、黄褐色、棕褐色5种。

2.2 底物体外模拟消化率测定

按照《中国药典》2010年版(二部)附录方法配制人工胃液和人工肠液^[11]。以玉米、豆粕等组成的混合物作为底物。准确称取底物1.000 0 g与鸡内金0.050 0 g置于50 mL三角瓶中, 加入人工胃液16 mL, 混合均匀后密封, 放于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴摇床中消化2 h (180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$), 模拟胃期消化。胃期消化后, 加入人工肠液6 mL, 密封后于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴摇床中消化2 h (180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)。肠期模拟消化后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置30 min。干燥滤纸并称质量, 并利用干燥滤纸对三角瓶中的消化残渣真空抽滤, 将抽滤后的残渣和滤纸置于105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干至恒重, 记录质量(即消化残渣质量)。于全自动氧弹量热仪中分别测定已称质量的滤纸、底物1.000 0 g、鸡内金0.050 0 g、滤纸与残渣的能量。分别按公式(1)、公式(2)计算未加鸡内金和添加鸡内金后的干物质消化率(D), 按公式(3)计算能量消化率(E)。

$$D_{\text{未加鸡内金}} = [\text{底物质量} - (\text{消化残渣质量} - \text{滤纸质量})] / \text{底物质量} \times 100\% \quad (1)$$

$$D_{\text{添加鸡内金}} = [\text{底物质量} + \text{鸡内金质量} - (\text{消化残渣质量} - \text{滤纸质量} - \text{鸡内金质量})] / (\text{底物质量} + \text{鸡内金质量}) \times 100\% \quad (2)$$

$$E = (\text{反应前能量} - \text{反应后能量}) / \text{反应前能量} \times 100\% \quad (3)$$

2.3 不同厚度鸡内金淀粉酶及胃蛋白酶活力测定

参照文献[12]测定淀粉酶活力, 文献[13]测定胃蛋白酶活力。

2.4 鸡内金蛋白组学测定

2.4.1 蛋白质提取定量 分别取不同批次鸡内金混样于1.5 mL离心管,加入2×脱氧胆酸钠(Doc Lysis)缓冲液600 μ L进行匀浆,匀浆过程使用高通量组织研磨仪,研磨条件为频率60 Hz,运行时间40 s,中断时间20 s,运行16次。取匀浆液150 μ L加入2×Doc Lysis缓冲液500 μ L稀释,超声为功率270 W(15%),超声2 s,停3 s循环,冰上超声10 min,即得蛋白质裂解液。取蛋白裂解液20 μ L用聚丙烯酰胺凝胶电泳法(SDS-PAGE)对蛋白进行定量。

2.4.2 蛋白质酶切 根据电泳图定量结果,取蛋白裂解液100 μ L(约300 μ g)进行酶切。酶切方法:加入1 mol·L⁻¹ DTT(终浓度10 mmol·L⁻¹),移液枪混匀,在100℃加热5 min后短暂离心使附着在管壁的溶液聚在底部,冷却至室温;将蛋白裂解液转移至10-kDa filter柱,在4℃、14 000×g条件下离心10 min;再加入碳酸氢铵溶液100 μ L吹打混匀,4℃、14 000×g离心5 min,倒掉滤液,用质谱级的水300 μ L(水的体积>滤液的体积)清洗2次管底;加入0.05 mol·L⁻¹碳酸氢铵溶液50 μ L和胰酶1.5 μ g,混匀,封口膜封好管盖,在37℃放置4 h;补加胰酶2 μ g混匀,用封口膜封好管盖,37℃酶切过夜;第2天,14 000×g离心10 min收集酶切后的肽段,再用0.05 mol·L⁻¹碳酸氢铵溶液清洗2遍(第1次100 μ L,第2次50 μ L);加10%甲酸20 μ L到肽段中,在14 000×g室温离心10 min,取上清液脱盐。

2.4.3 液相质谱联用法(LC-MS)检测 将2.4.2项下脱盐后的样品溶解于0.1%甲酸(A)中,装瓶上样,用Easy-nLC 1200液相色谱系统进行分离。质谱采用Orbitrap Fusion Lumos系统,结合纳流电喷雾离子源,质谱扫描方式为数据依赖型质谱采集模式(data-dependent acquisition mode, DDA),一级使用Orbitrap进行全扫描,扫描范围 m/z 为350~1550,扫描分辨率为120 000;二级质谱采集通过32%的高能碰撞解离(HCD)对母离子进行碎裂,碎片离子在Orbitrap中进行检测,起始质量数(First Mass)为100 m/z ,分辨率为15 000。

2.5 数据分析

利用Microsoft Excel 2010对实验数据进行简单处理。利用SPSS 25.0软件与SPSSAU(<https://spssau.com/index.html>)对2.1和2.3项下所得数据

进行统计学分析。将质谱数据输入到Proteome Discoverer(PD,美国Thermo Fisher Scientific)2.2软件中对质谱谱图进行筛选;采用PD 2.2内嵌的Sequest进行搜索,根据Sequest搜索结果和第一步筛选后的谱图进行定性分析,采用Unique peptide和Razor peptide定量值的累加和作为蛋白定量值。

3 结果

3.1 鸡内金性状测定结果

所测100份鸡内金中,48份样品为雄性来源,52份样品为雌性来源。

鸡内金样品平均厚度为0.55 mm,53%样品的厚度未达到0.55 mm,39%样品的厚度为0.55~0.68 mm,8%样品厚度超过0.68 mm,均未达到《中国药典》2020年版要求的2 mm。颜色多为黄褐色(43%)、黄色(26%)、棕褐色(19%)、黄绿色(10%),绿色鸡内金仅占2%。其中黄绿色者平均厚度最大,为0.60 mm;黄褐色次之,为0.56 mm;绿色者平均厚度最小,为0.48 mm。雄性来源鸡内金平均厚度0.55 mm,雌性来源0.56 mm(表2)。

3.2 不同性状鸡内金对底物体外模拟消化率的影响

底物D为38.56%,底物E为85.74%。添加鸡内金后,底物D为40.81%,底物E为92.79%,底物D与E分别增加了5.8%和8.2%。

经Mann-Whitney U检验结果知(表3),不同性别来源鸡内金底物D的差异无统计学意义;底物E的差异也无统计学意义。鸡内金性别对底物干物质消化率与能量消化率的影响不显著。

由Kruskal-Wallis检验可知(表4),不同颜色鸡内金的底物D间差异无统计学意义;底物E间差异也无统计学意义。综上分析,颜色对于鸡内金干物质与E影响不显著。

相关性分析表明,鸡内金厚度与底物D相关性显著($P=0.044<0.05$),与底物E相关性不显著。故对其进行线性回归分析,结果显示, $F=0.086$, $P=0.769>0.05$,即鸡内金厚度与D不呈线性关系。

3.3 不同厚度鸡内金淀粉酶活力及胃蛋白酶活力

为探究鸡内金厚度促体外消化能力的主因是否为淀粉酶及胃蛋白酶,选取不同厚度鸡内金,对其淀粉酶活力及胃蛋白酶活力进行测定,并进行相关性分析。不同厚度鸡内金与淀粉酶活力之间的相关系数为

表 2 鸡内金性状测定结果

编号	颜色	性别	厚度/mm	编号	颜色	性别	厚度/mm	编号	颜色	性别	厚度/mm
1	黄绿色	雌	0.70	35	黄褐色	雄	0.56	69	黄褐色	雄	0.66
2	黄绿色	雌	0.74	36	黄褐色	雌	0.57	70	黄色	雌	0.56
3	黄绿色	雌	0.58	37	黄色	雄	0.50	71	棕褐色	雄	0.43
4	棕褐色	雄	0.53	38	黄褐色	雄	0.56	72	黄色	雌	0.49
5	棕褐色	雌	0.48	39	黄褐色	雄	0.58	73	黄褐色	雄	0.48
6	黄色	雄	0.53	40	黄色	雌	0.51	74	黄褐色	雌	0.45
7	黄色	雌	0.57	41	黄色	雌	0.56	75	棕褐色	雄	0.46
8	黄色	雌	0.62	42	黄绿色	雄	0.69	76	棕褐色	雌	0.59
9	黄色	雄	0.55	43	黄褐色	雄	0.56	77	棕褐色	雌	0.57
10	黄色	雌	0.49	44	黄褐色	雌	0.53	78	棕褐色	雄	0.54
11	黄褐色	雌	0.44	45	黄色	雌	0.64	79	黄褐色	雄	0.56
12	棕褐色	雌	0.60	46	黄色	雌	0.48	80	棕褐色	雄	0.53
13	棕褐色	雌	0.56	47	黄褐色	雌	0.49	81	棕褐色	雄	0.50
14	棕褐色	雄	0.64	48	黄色	雌	0.44	82	黄色	雌	0.52
15	黄色	雌	0.60	49	绿色	雄	0.49	83	黄褐色	雌	0.72
16	棕褐色	雌	0.51	50	黄绿色	雄	0.63	84	黄色	雄	0.55
17	黄色	雄	0.54	51	黄色	雌	0.63	85	黄褐色	雄	0.58
18	黄色	雄	0.55	52	黄色	雌	0.45	86	黄褐色	雄	0.46
19	棕褐色	雌	0.53	53	黄褐色	雌	0.45	87	黄褐色	雌	0.55
20	棕褐色	雌	0.55	54	黄褐色	雄	0.54	88	黄褐色	雌	0.66
21	黄绿色	雄	0.59	55	黄褐色	雌	0.68	89	黄褐色	雄	0.51
22	黄色	雌	0.51	56	黄绿色	雄	0.51	90	黄褐色	雌	0.77
23	黄色	雌	0.75	57	黄绿色	雄	0.44	91	黄色	雌	0.44
24	棕褐色	雄	0.57	58	黄褐色	雌	0.47	92	黄褐色	雌	0.50
25	黄色	雌	0.51	59	绿色	雌	0.47	93	黄褐色	雄	0.66
26	黄褐色	雄	0.57	60	黄褐色	雌	0.49	94	黄绿色	雄	0.52
27	黄褐色	雄	0.48	61	黄褐色	雄	0.51	95	黄褐色	雄	0.49
28	黄绿色	雌	0.60	62	黄褐色	雌	0.49	96	棕褐色	雄	0.65
29	黄色	雌	0.47	63	黄褐色	雄	0.49	97	黄褐色	雌	0.47
30	黄色	雄	0.62	64	黄褐色	雄	0.51	98	黄褐色	雄	0.66
31	黄褐色	雄	0.76	65	黄褐色	雄	0.62	99	黄褐色	雌	0.67
32	黄褐色	雌	0.62	66	黄褐色	雄	0.59	100	棕褐色	雌	0.69
33	棕褐色	雌	0.46	67	黄褐色	雄	0.50				
34	黄褐色	雄	0.61	68	黄褐色	雄	0.51				

表 3 不同性别来源鸡内金对底物体外模拟消化率差异性分析

性别	$D_{\text{中位数}}$	$E_{\text{中位数}}$
雄性	40.1	93.5
雌性	40.0	92.6
Z	- 0.048	- 1.521
P	0.961	0.128

注：Z 值代表统计方法对应的统计量。

0.308 ($P<0.01$)，与胃蛋白酶活力间的相关系数为 0.228 ($P>0.01$)。故对不同厚度鸡内金及淀粉酶活力进行线性回归分析，结果显示， $F=4.406$ ， $P=0.042<0.05$ ，即鸡内金厚度与淀粉酶活力有线性回归关系，线性回归方程为 $Y=0.998X+1.549$ ($r=0.308$)，见表 5。

表 4 不同颜色鸡内金对底物体外模拟消化率差异性分析

颜色	$D_{\text{中位数}}$	$E_{\text{中位数}}$
黄褐色	39.2	92.5
黄绿色	39.3	93.3
黄色	40.3	92.8
绿色	38.9	95.5
棕色	40.6	94.1
Z	4.380	3.493
P	0.357	0.479

注：H 值代表统计方法对应的统计量。

3.4 鸡内金蛋白质组学分析

分析质谱数据共得到谱图 109 699 张，通过采用

表5 鸡内金厚度、淀粉酶活力及胃蛋白酶活力

编号	厚度/mm	淀粉酶活力/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$	胃蛋白酶活力/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}$
1	0.44	2.021 1	85.190 0
2	0.46	2.136 8	85.179 6
3	0.46	1.893 1	85.319 8
4	0.49	1.970 7	108.489 2
5	0.48	1.934 0	73.929 0
6	0.45	2.710 2	38.240 4
7	0.47	1.923 5	72.920 1
8	0.50	1.977 4	75.020 7
9	0.51	1.870 0	71.182 8
10	0.50	1.939 3	70.682 7
11	0.51	1.906 1	78.650 4
12	0.50	2.048 0	69.160 2
13	0.50	2.064 1	86.809 5
14	0.50	2.044 6	73.114 8
15	0.52	2.191 9	66.509 8
16	0.56	2.002 8	34.062 0
17	0.53	1.912 3	52.291 4
18	0.53	2.396 0	66.686 1
19	0.52	1.886 9	125.830 6
20	0.55	1.891 1	50.100 2
21	0.54	1.813 5	35.413 0
22	0.54	1.901 7	45.359 3
23	0.56	3.047 9	75.902 3
24	0.52	1.988 7	145.653 4
25	0.63	1.887 2	43.536 1
26	0.62	1.999 3	97.142 7
27	0.58	1.851 4	57.818 5
28	0.60	2.051 8	73.824 3
29	0.59	2.074 8	88.143 7
30	0.58	2.034 4	88.586 4
31	0.58	1.910 4	84.401 1
32	0.62	2.173 6	79.257 3
33	0.59	2.428 6	73.893 7
34	0.53	2.156 4	85.924 4
35	0.74	2.073 0	60.619 0
36	0.69	2.231 5	62.411 4
37	0.66	2.153 3	86.678 3
38	0.65	2.221 9	96.406 8
39	0.75	2.391 1	84.130 7
40	0.65	2.448 0	103.582 7
41	0.67	2.052 9	67.236 8
42	0.73	2.310 7	212.215 6
43	0.66	2.269 5	96.512 4
44	0.68	2.841 1	87.487 9

PD 2.2内嵌的Sequest进行搜索,共匹配到20 840张谱图,共鉴定到12 397个肽段,对应1541种蛋白

质。相对丰度最高的前20种蛋白质分别为胃动蛋白2 (gastrokine 2), 富含半胱氨酸的分泌蛋白 (cysteine rich secretory protein 2)、肌动蛋白 (actin)、肽酶A1结构域蛋白 (peptidase A1 domain-containing protein)、角蛋白 (keratin)、肌红蛋白 (myoglobin)、角蛋白18 (keratin 18)、Tgc域含硒蛋白 (tgc domain-containing protein)、埃兹蛋白 (ezrin)、膜联蛋白A2 (annexin A2)、含胱抑素结构域的蛋白质 (cystatin domain-containing protein)、转胶蛋白 (transgelin)、肌球蛋白9 (myosin-9)、纤维连接蛋白 (fibronectin)、组蛋白H4 (histone H4)、组蛋白H2B (histone H2B)、绒毛样蛋白 (villin like)、核纤维层蛋白a抗体 (lamin-A)及2种未表征蛋白。通过京都基因与基因组百科全书 (KEGG)富集分析,相对丰度较高的前20种蛋白质主要富集在沙门菌感染、糖尿病并发症中的晚期糖基化产物-晚期糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)信号通路、细胞外基质受体作用。

所鉴定到的1541种蛋白质参与232个生物过程、167个细胞组分、132个分子功能、151条KEGG通路。对鉴定到的1541种蛋白质进行功能分析 (GO)、KEGG富集分析并按照P值从小到大排列,统计了前10条富集到的GO条目对应的蛋白数目与KEGG富集条目的蛋白质数目 (图1)。在生物过程方面,参与胞内蛋白质运输的蛋白占绝大多数 (66/1542), 翻译 (42/1541)、碳水化合物代谢 (31/1541)次之,但是参与三羧酸循环的蛋白质最为富集;在细胞组成方面,参与胞液的蛋白质占绝大多数 (391/1541),也最为富集;在分子功能方面,有154种蛋白质具有腺苷三磷酸 (ATP)结合活性,核糖体结构最为富集,肌动蛋白绑定次之。KEGG富集结果显示鸡内金中蛋白质主要参与了代谢通路、核糖体、碳代谢、蛋白酶体、三羧酸循环等。

4 讨论

杨松林^[4]对鸡内金厚度进行抽样检测,其厚度为0.5~1.0 mm;本研究对100份鸡内金厚度进行测定,发现其厚度为0.4~0.8 mm,未见2 mm者,与杨松林抽样检测结果基本一致,故根据2 mm作为鉴别指标是否科学,还需进一步探讨。另外,鸡内金一般呈不规则卷片状,又有条状皱纹,各处厚度不一,

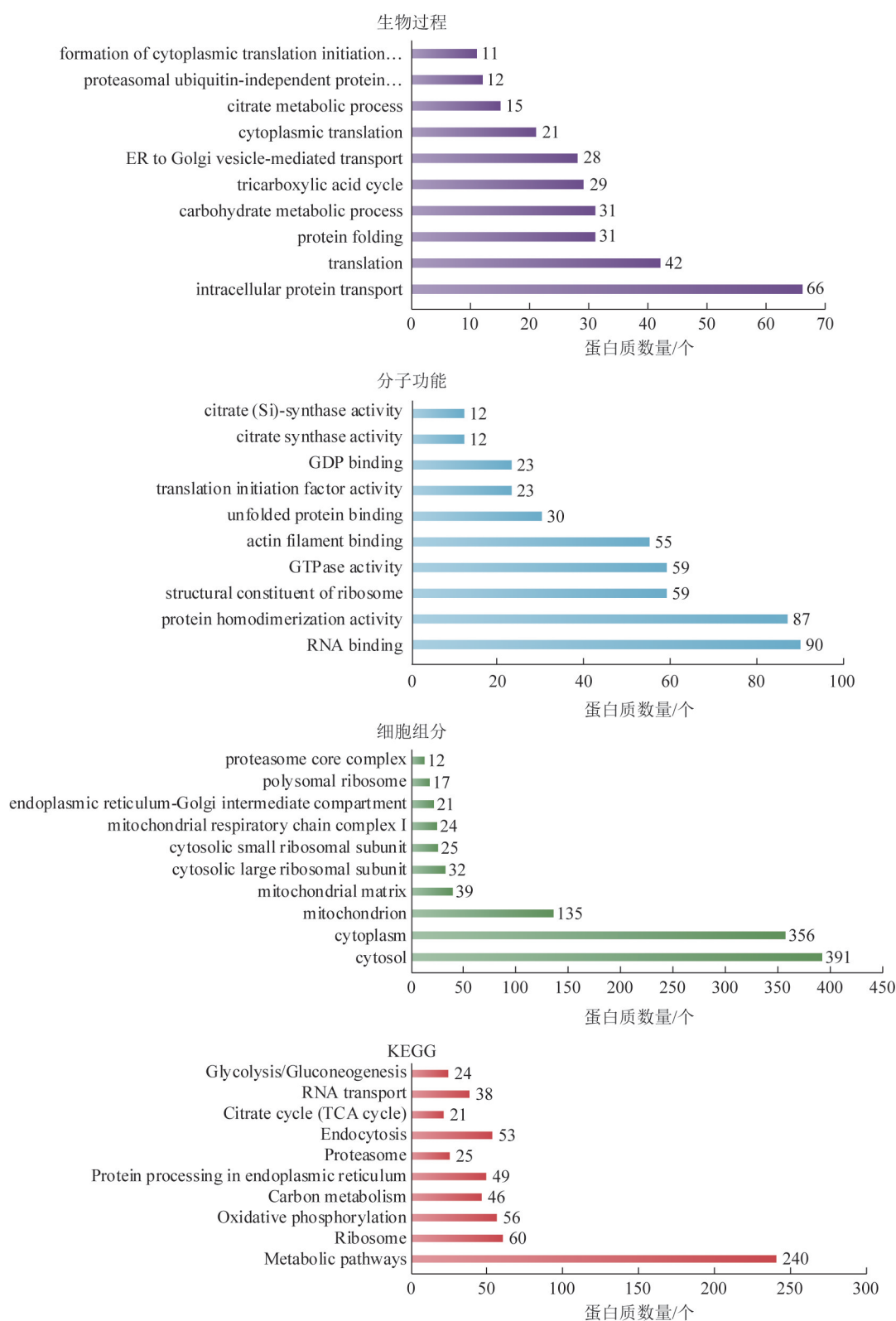


图1 鸡内金蛋白质GO与KEGG富集Top10条形图

亟须制定科学的鸡内金厚度测定方法。

历代本草、文献资料对于优质鸡内金看法不一，争议主要在性别、颜色、厚度3个方面。例如，《集

验方》《本草通玄》《本草备要》《本草述》《本草从新》《本草原始》《本草撮要》《本草害利》等本草著作皆有载：“男用雌，女用雄”^[3,15-18]。《神农本草经》^[19]

仅用丹雄鸡,《千金翼方》^[20]仅用乌雄鸡。《中药大辞典》1977年版、《中华药海》《500味常用中药材的经验鉴别》《中国药材学》中均指出鸡内金以色黄者为佳^[21-24]。《中国药典》1963年版首次收载鸡内金:“表面金黄色或黄褐色,有的微显绿色”^[5]。《中国药典》1977年版首次增加黄绿色的描述,但也同时规定色黄者为佳^[25]。此后,历版《中国药典》均规定鸡内金颜色为黄色、黄褐色、黄绿色,《中国药典》1985年版删除了“以色黄、少破碎者为佳”的描述^[26]。《中国药典》2020年版规定鸡内金厚约2 mm^[1],《中华本草》记载鸡内金厚约5 mm^[27],《上海市中药饮片炮制规范》2018年版规定鸡内金厚约1 mm^[28]。

体外模拟消化结果表明,添加鸡内金后,底物干物质与能量消化率分别增加了5.8%和8.2%,说明该体外模拟消化模型可在一定程度上体现鸡内金促消化作用。故利用该模型研究不同性别来源、颜色、厚度鸡内金对底物消化率的影响。结果发现,鸡内金厚度与底物干物质消化率相关性显著,但不呈线性关系。为进一步验证不同厚度鸡内金促体外消化能力的主因是否为淀粉酶及胃蛋白酶,测定不同厚度鸡内金淀粉酶及胃蛋白酶活力,鸡内金厚度与淀粉酶活力相关性极显著,随厚度增加,淀粉酶活力上升;鸡内金淀粉酶活力随厚度变化趋势与底物能量消化率不符,由此推测,鸡内金促消化作用的主因并非已知酶类。

蛋白质组学技术在动物类中药有效成分寻找中取得了一些进展,加之鸡内金中蛋白质含量丰富,多有学者认为其有效成分可能为某种蛋白质,故利用蛋白质组学技术对鸡内金中所含蛋白质进行鉴定,共鉴定到1541种蛋白质。其中胃动蛋白2和埃兹蛋白与消化系统疾病有关。胃动蛋白2是胃黏膜组织产生的一种特异性蛋白,带有BRICHOS结构域,其参与调控消化道上皮细胞的增生从而维持胃黏膜的完整性^[29],当胃黏膜屏障受损黏膜发生改变时,会激活胃动蛋白2的功能^[30]。研究表明,胃动蛋白2在幽门螺杆菌感染的消化不良时下调,在根除幽门螺杆菌和消除胃黏膜炎症后,其显著上调^[31];其还在胃腺癌中频繁表达缺失,在肿瘤系细胞中沉默^[32]。埃兹蛋白又称细胞绒毛蛋白,属埃兹蛋白/根蛋白/膜突蛋白(ezrin/radixin/moesin, ERM)家族最早发现的一员,在机体中分布广泛,尤其小肠、胃、肺、胰腺、肾脏等组织中表达较高^[33]。研究发现,在胃

黏膜病变过程中,埃兹蛋白表达逐渐下调,感染幽门螺杆菌后,埃兹蛋白表达也下调^[34]。综上所述,推测胃动蛋白2和埃兹蛋白可能与鸡内金健脾消食的功效有关。

总之,本研究初步验证了体外模拟消化模型可在一定程度上体现鸡内金的促消化能力,为健脾消食类中药质量评价体系的建立提供了思路。利用蛋白质组学技术鉴定了鸡内金蛋白组成,所鉴定的蛋白质在功能上主要富集在胞内蛋白质运输、翻译、碳水化合物代谢、三羧酸循环、代谢通路、核糖体、碳代谢、蛋白酶体上。发现胃动蛋白2、埃兹蛋白等与消化系统疾病相关蛋白相对丰度较高。这为深入研究鸡内金提供了线索。

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,2020:202.
- [2] 杨洪军,黄璐琦. 中药饮片用量标准研究[M]. 福州:福建科学技术出版社,2011:234.
- [3] 姚僧垣. 集验方[M]. 范行准,辑. 北京:中医古籍出版社,2019:75.
- [4] 陈嘉谟. 本草蒙筌[M]. 陆拯,赵法新,校点. 北京:中国中医药出版社,2013:243.
- [5] 中华人民共和国卫生部国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,1963:134.
- [6] 高理想,陈亮,崔世贵,等. 体外模拟消化法优化生长猪饲料非淀粉多糖酶谱[J]. 动物营养学报,2017,29(4):1205-1217.
- [7] 靳艳,刘晓艳,邹汉法. 基于蛋白质组学、肽组学的中药动物药活性组分的研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2011,13(1):162-166.
- [8] RISCH M, GEORGIEVA D, VON BERGEN M, et al. Snake venom of the Siamese Russell's viper (*Daboia russelli siamensis*) —Relation to pharmacological activities[J]. J Proteom, 2009, 72(2):256-269.
- [9] Bringans S, ERIKSEN S, KENDRICK T, et al. Proteomic analysis of the venom of *Heterometrus longimanus* (Asian black scorpion)[J]. Proteomics, 2008, 8(5):1081-1096.
- [10] XU X Q, YANG H L, MA D Y, et al. Toward an understanding of the molecular mechanism for successful blood feeding by coupling proteomics analysis with pharmacological testing of horsefly salivary glands [J]. Mol Cell Proteom, 2008, 7(3):582-590.

- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录85.
- [12] 陆维承,陆维宏,罗瑞雪. 不同炮制工艺对鸡内金中淀粉酶活力的影响[J]. 海峡药学,2010,22(4):35-36.
- [13] 魏宜琴,赖世宏,薛淑清. 紫外分光光度法测定胃蛋白酶片中蛋白酶活力[J]. 中国生化药物杂志,1994,14(2):127-128.
- [14] 杨松林.《中国药典》1990年版一部鸡内金厚度质疑[J]. 中药材,1991,14(7):49.
- [15] 李中梓. 本草通玄[M]. 北京:中国中医药出版社,2015:98.
- [16] 汪昂. 本草备要[M]. 太原:山西科学技术出版社,2015:197.
- [17] 李时珍. 本草纲目[M]. 刘衡如,刘山永,点校. 沈阳:辽海出版社,2016:1714.
- [18] 陈可冀. 清宫医案集成[M]. 北京:科学出版社,2009:428.
- [19] 佚名. 神农本草经[M]. 戴铭,黄梓健,余知影,等点校. 南宁:广西科学技术出版社,2016:056.
- [20] 孙思邈. 千金翼方[M]. 太原:山西科学技术出版社,2010:85.
- [21] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2006:1684.
- [22] 冉先德. 中华药海[M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社,1993:1016.
- [23] 卢贇鹏. 500味常用中药材的经验鉴别[M]. 北京:中国中医药出版社,1999:659.
- [24] 徐国钧. 中国药材学:上[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:1834.
- [25] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,1977:311.
- [26] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:人民卫生出版社,1985:159.
- [27] 中华本草编委会. 中华本草:第9册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:469.
- [28] 上海市卫生局. 上海市中药饮片炮制规范[M]. 上海:上海科学技术出版社,2018:436.
- [29] SHI L S, WANG H, WANG F, et al. Effects of gastrophilin-2 expression on gastric cancer cell apoptosis by activation of extrinsic apoptotic pathways [J]. Mol Med Rep,2014,10(6):2898-2904.
- [30] BAUS-LONCAR M, LUBKA M, PUSCH C M, et al. Cytokine regulation of the trefoil factor family binding protein GKN₂ (GDDR/TFIZ1/blottin) in human gastrointestinal epithelial cells [J]. Cell Physiol Biochem,2007,20(1/2/3/4):193-204.
- [31] RESNICK M B, SABO E, MEITNER P A, et al. Global analysis of the human gastric epithelial transcriptome altered by Helicobacter pylori eradication *in vivo* [J]. Gut,2006,55(12):1717-1724.
- [32] 杜建军,窦科峰,彭淑牖,等. 胃癌下调全长基因GDDR的克隆及与胃癌关系的研究[J]. 中华医学杂志,2003,83(13):1166-1168.
- [33] 杨晔,褚福浩,杜世豪,等. Ezrin蛋白在肿瘤转移中的作用及机制研究[J]. 现代肿瘤医学,2022,30(3):538-543.
- [34] 王艳景. 胃癌及癌前病变中幽门螺杆菌感染与Ezrin蛋白表达的关系[J]. 山东医药,2009,49(25):14-16.

(收稿日期: 2022-07-14 编辑: 吴美琪)