

人体肠道菌群体外生物转化大黄过程优化及成分变化研究

高子凡, 初璇, 高 昂, 张亚婷, 谢赫然, 王泓午, 邢竹青*

天津中医药大学 健康科学与工程学院, 天津 301617

摘要: 目的 探究人体肠道菌群体外生物转化大黄过程条件及成分变化。方法 采集3名健康儿童(1~3岁)新鲜粪便制备菌群悬液;以活菌数保持最多为依据进行初始培养基的选择;按照初始培养基中原有的0.5%碳源和0.5%氮源的添加量,进行不同碳源/氮源组合,依据活菌计数结果判断最优组合;通过指纹图谱技术筛选菌群体外培养条件,包括大黄添加方式(大黄粉或大黄水浸液)、转化时间(24或48 h)、氧需求(有氧或无氧);基于LC-MS代谢组学进行转化前后成分分析,采用SIMCA软件(V16.0.2)进行主成分分析(PCA),差异代谢物分析采用MetaboAnalyst 5.0。结果 菌落计数和指纹图谱结果显示,蔗糖/大豆胨为改良YCFA培养基最适组合,粉状大黄为添加方式,培养基与粉状大黄最适添加体积质量比为32:1,有氧培养24 h为最优生物转化条件。代谢组学结果表明,主要代谢产物共计763种,数目较多的代谢物类别分别为脂质和类脂质分子(244种)、苯丙烷和聚酮化合物(138种)、有机杂环化合物(101种)、有机酸及其衍生物(92种)和苯类(59种);转化前后代谢物PCA图能良好区分,确定18种关键差异代谢物,山柰酚-3-O-刺槐二糖苷和薯蓣皂苷上调最明显。结论 采用指纹图谱技术联合代谢组学方法揭示了大黄在菌群生物转化前后存在的成分差异,通过菌群生物转化可提高大黄活性成分的溶出和转变。

关键词: 大黄; 人体肠道菌群; 生物转化; 代谢组学; 指纹图谱技术; 山柰酚-3-O-刺槐二糖苷; 薯蓣皂苷

中图分类号: R283.1, R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)09-1801-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.09.014

Study on optimization of *Rhei Radix et Rhizoma* biotransformation process and changes of its ingredients *in vitro* by human gut microbiota

GAO Zifan, CHU Xuan, GAO Ang, ZHANG Yating, XIE Heran, WANG Hongwu, XING Zhuqing

College of Health Science and Engineering, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: **Objective** To explore the conditions and composition changes in the process of *Rhei Radix et Rhizoma* biotransformation *in vitro* by human gut microbiota. **Methods** Fresh feces from three healthy children (1—3 years old) were collected to prepare bacterial flora suspension. The initial medium was selected based on the maximum number of viable bacteria. According to the amount of 0.5% carbon source and 0.5% nitrogen source added in the initial medium, different carbon source/nitrogen source combinations were performed, and the optimal combination was determined according to the viable count results. The out-of-population culture conditions of bacteria were screened by fingerprint technology, including *Rhei Radix et Rhizoma* addition method (*Rhei Radix et Rhizoma* powder or *Rhei Radix et Rhizoma* water immersion), transformation time (24 or 48 h), oxygen requirement (aerobic or anaerobic). Component analysis before and after transformation was performed based on LC-MS metabolomics, principal component analysis (PCA) was performed using SIMCA software (V16.0.2), and MetaboAnalyst 5.0 was used for differential metabolite analysis. **Results** The results of colony count and fingerprinting technology showed that the optimal combination of sucrose/soy peptone as the modified YCFA medium, and powdered *Rhei Radix et Rhizoma* as the addition method, the optimal addition ratio (v/w) of the medium and *Rhei Radix et Rhizoma* powder was 32:1. Culturing in oxygen for 24 h was the optimal conditions for biotransformation. The results of metabolomics showed that there were 763 main metabolites in total, the most abundant metabolite groups were lipids and lipid-like molecules (244 species), phenylpropanes and polyketides (138 species), organic heterocyclic compounds (101 species), organic acids and their derivatives (92 species), and benzenes (59 species). The PCA

收稿日期: 2022-03-15

基金项目: 天津市教委科研计划任务(2018KJ032)

第一作者: 高子凡(2001—),女,在读本科生,研究方向为食品营养。Tel: 18339904236 E-mail: gaozf0612@163.com

*通信作者: 邢竹青(1989—),女,博士,讲师,研究方向为食品营养。Tel: 15102278269 E-mail: xzqinside@163.com

diagrams of metabolites before and after biotransformation were well distinguished, also, 18 key different metabolites were identified. Biorobin and dioscin were up-regulated most obviously. **Conclusion** The compositional differences of *Rhei Radix et Rhizoma* before and after biotransformation were revealed by fingerprint technology and metabolomics. The dissolution and transformation of *Rhei Radix et Rhizoma* active components could be improved by biotransformation of the flora.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma*; human gut microbiota; biotransformation; metabolomics; fingerprint technology; biorobin; dioscin

大黄 *Rhei Radix et Rhizoma* 是一种被广泛应用于传统方剂的中药材,具有多种生理调节活性,如泻下、消炎、抗菌、抗病毒、止血、调血脂、降压等^[1-3]。此外,大黄提取物还被开发用于制备新型食品防腐剂^[4]。临床中大黄的使用往往取其炮制品,其中一些方法利用微生物的代谢作用对大黄进行发酵处理^[5]。经过炮制的大黄药效成分发生复杂变化,炮制可增加其有效成分的利用率,降低毒副作用,促进组分溶出或转化成新成分,进而影响疗效^[6]。

目前,关于大黄生物转化研究中的菌株选择主要集中于单一特定菌株,如酵母^[7]、霉菌^[8]、双歧杆菌^[9]、蕈菌^[10]或一些分离自大黄地上叶片部分的内源性菌株^[11]等,且检测到的变化成分较少,对于全面了解大黄转化过程存在局限性。在其他中药材转化报道中,已有利用菌群进行生物转化取得良好效果的先例,例如使用多种菌株组合发酵王不留行和益母草,表现出可溶性黄酮、生物碱、皂苷和粗多糖水平升高^[12]。另外,2021年Nature杂志刊发了肠道菌群可以通过对药物活性成分进行生物转化,从而改变对机体的作用效果^[13],所以采用人体肠道菌群作为转化微生物进行大黄的生物转化研究,将为大黄应用开发提供新的途径。

指纹图谱技术常被应用于分析中药组分的整体特征规律,其中基于高效液相色谱(HPLC)进行识别分析已成为使用最广的一种^[14-16]。另一方面,代谢组学可进一步定性定量地检测成分变化,有助于揭示中药成分改变的深层机制^[17-19]。以往中药材生物转化研究的重点为单体成分改变过程^[20],缺乏对药物影响下的菌群自身代谢产物变化的了解。利用指纹图谱技术结合代谢组学分析,将有助于了解药物和菌体的所有代谢物信息。

本研究利用来源于人体的肠道菌群优化生物转化大黄的过程,采用指纹图谱技术结合代谢组学,旨在考察不同生物转化条件下菌群对于成分变化的影响,揭示了菌群体外生物转化的大黄成分变化特点,为今后生物转化大黄的过程条件控制提供理论基础。

1 材料

1.1 药材与主要试剂

大黄,购于安徽药知源中药饮片有限公司,经天津中医药大学王泓午教授鉴定为掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.;牛肝浸粉(生物纯),北京索莱宝科技有限公司;蛋白胨(生物纯)和大豆胨(生物纯),北京奥博星生物技术有限责任公司;消化血清粉(生物纯),大连美仑生物技术有限公司;葡萄糖(分析纯)、乳糖(分析纯)和蔗糖(分析纯),天津江天化工技术有限公司;高效液相色谱中所用试剂均为色谱纯。

1.2 主要仪器

5804 R型离心机,德国 Eppendorf 公司;JDX-200 型培养箱,上海世平实验设备有限公司;SQ810C型高压灭菌器,日本 Yamato 公司;SQP 分析天平,德国赛多利斯公司;D06型厌氧袋,日本MGC三菱公司;QE-200高速粉碎机,浙江屹立工贸有限公司;1200型高效液相色谱仪,美国安捷伦公司;Vanquish型超高效液相色谱仪,美国赛默飞公司;Orbitrap Exploris 120型高分辨质谱,美国赛默飞公司;PS-60AL型超声仪,深圳市雷德邦电子有限公司。

2 方法与结果

2.1 菌群制备

因儿童肠道菌群中益生菌丰度较高,故采集3名健康儿童(1~3岁)新鲜粪便,混合均匀后4℃存放,在48 h内进行实验。称取3 g新鲜粪便放入无菌离心管中,加入30 mL无菌PBS均匀重悬,500×g离心8 min重复2次后,PBS重悬,得到600 nm处吸光度(A_{600})值为0.8的菌群悬液。

2.2 大黄底物制备

2.2.1 大黄粉制备 取一定量生大黄,高速粉碎机研磨,过40目筛,粉末储于密封罐中备用。

2.2.2 大黄水浸液制备 取100 g大黄粉溶于400 mL蒸馏水中,100℃水浴煎煮30 min后,搅拌均匀,4 000 r·min⁻¹离心10 min后取上清液,即为大黄水浸液。

2.3 菌群体外培养条件的确定

2.3.1 培养基 分别选取 M2GSC 培养基^[21]、YCFA 培养基^[22]和 GAM 培养基^[23]作为待选转化培养基。为了最大程度地保留菌群中的乳酸菌,采用 MRS 培养基作为活菌计数培养基。

乳酸菌是肠道菌群中主要发挥益生功能的群落,为使后续实验中最大限度地保留乳酸菌进行大黄生物转化,以其活菌数保持最多作为初始培养基的选择依据。取菌群悬液按 8% 的比例分别接种于 100 mL 的待选培养基中,30 ℃、厌氧培养 24 h 后,将培养物稀释涂布至 MRS 平板培养 24 h(30 ℃、厌氧),记录菌落数,每组 3 个平行。结果如表 1 所示, YCFA 培养基中活菌数最高,选择 YCFA 培养基作为初始培养基。

表 1 菌群在不同初始培养基中活菌计数情况(30 ℃、厌氧培养 24 h)

Table 1 Viable count of flora in different initial media (30 ℃, anaerobic culture for 24 h)

培养基	活菌数/(cfu·mL ⁻¹)
M2GSC	(2.0±0.3)×10 ⁵
YCFA	(3.0±0.1)×10 ⁷
GAM	(6.7±2.2)×10 ⁵

2.3.2 活菌计数时间 参考体外菌群培养的报道^[24-25],活菌计数时间多为 24 h 或 48 h,因此,分别对这 2 个时间点开展乳酸菌活菌计数,选择活菌数较多的时间点作为计数时间。将样品(取菌群悬液按 8% 的比例接种于 100 mL 的 YCFA 培养基中, 30 ℃、厌氧培养 24 h) 10 倍梯度稀释至 1×10⁻⁴,

取 100 μL 稀释样品均匀涂布至 MRS 平板,置于 30 ℃培养箱,厌氧倒置培养 24 h 或 48 h 后,记录菌落数。

结果如表 2 所示,在 24 h 体外培养后菌群活菌计数结果远高于 48 h,说明从 24 h 到 48 h 之间大部分乳酸菌菌体衰亡,所以采用 24 h 作为活菌计数时间点。

表 2 不同培养时间活菌计数情况

Table 2 Count of viable bacteria in after different fermentation times

发酵时间/h	活菌计数/(cfu·mL ⁻¹)
0	(1.3±0.8)×10 ⁶
24	(5.7±1.5)×10 ⁷
48	(1.0±0.5)×10 ⁶

2.3.3 碳源、氮源种类的优化 碳源是微生物生长重要的能量来源,考虑实验菌群主要来自幼儿,其饮食结构中乳品占有较大的比例,故选择葡萄糖、蔗糖、乳糖作为碳源优化的 3 种糖类。另外,选择了 4 种肠道菌群培养常用氮源进行比较,分别为牛肝浸粉、蛋白胨、消化血清粉和大豆胨。

按照 YCFA 培养基中原有的 0.5% 碳源和 0.5% 氮源的添加量,进行不同碳源/氮源组合配制改良 YCFA 培养基,依据活菌计数结果判断最优的碳/氮源种类组合,结果见表 3。24 h 增菌倍数最高的前 3 种碳/氮源种类组合分别为蔗糖/大豆胨、葡萄糖/消化血清粉、葡萄糖/大豆胨,再根据经济性原则,选择蔗糖/大豆胨为最佳组合。

改良 YCFA 培养基:胰蛋白胨 10 g·L⁻¹、大豆

表 3 不同碳源/氮源改良 YCFA 培养基中活菌计数情况

Table 3 Counts of viable bacteria in modified YCFA medium with different carbon/nitrogen sources

碳源	氮源	初始活菌计数/(cfu·mL ⁻¹)	24 h 活菌计数/(cfu·mL ⁻¹)	24 h 增菌倍数
葡萄糖	牛肝浸粉	(7.4±3.4)×10 ⁶	(1.0±0.4)×10 ⁷	1.4
	蛋白胨	(2.7±0.6)×10 ⁷	(3.0±2.3)×10 ⁷	1.1
	消化血清粉	(6.8±4.4)×10 ⁵	(2.2±1.2)×10 ⁷	32.4
	大豆胨	(1.5±0.2)×10 ⁶	(2.5±1.2)×10 ⁷	16.7
乳糖	牛肝浸粉	(1.4±0.2)×10 ⁶	(1.9±0.8)×10 ⁷	13.6
	蛋白胨	(8.9±2.5)×10 ⁶	(7.1±1.0)×10 ⁶	0.8
	消化血清粉	(9.1±2.8)×10 ⁶	(1.0±0.4)×10 ⁷	1.1
	大豆胨	(1.7±1.2)×10 ⁶	(6.3±2.6)×10 ⁶	3.7
蔗糖	牛肝浸粉	(5.1±2.5)×10 ⁷	(5.6±2.1)×10 ⁷	1.1
	蛋白胨	(3.9±0.7)×10 ⁷	(4.9±0.9)×10 ⁷	1.3
	消化血清粉	(4.3±1.8)×10 ⁶	(3.2±0.9)×10 ⁷	7.4
	大豆胨	(1.9±1.0)×10 ⁶	(6.2±1.2)×10 ⁷	32.6

脲 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母提取物 $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、*L*-半胱氨酸盐酸盐 $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 FeSO_4 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、血红素 $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 NaCl $4.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $0.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 KH_2PO_4 $0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $0.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.09 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、聚山梨酯 80 1.0 g ，溶解充分后定容至 1 L ，pH 值为 6.8， 121°C 灭菌 20 min。

2.3.4 大黄添加量确定 当在改良 YCFA 培养基与 大黄粉添加比为 32:1 时能够保证灭菌后培养基的正常状态，经过所含大黄等质量换算得到改良 YCFA 培养基与 大黄水浸液添加比为 8:1。

2.4 菌群生物转化大黄成分变化指纹图谱

2.4.1 菌群接种与培养 取菌群悬液按 8% 的比例接种于 100 mL 大黄粉液体培养基或 大黄水浸液液体培养基，分别在 有氧或无氧条件下培养 24 h 或 48 h。

2.4.2 高效液相色谱检测

(1) 菌群生物转化：大黄样品在不同条件下菌群生物转化，信息见表 4。

(2) 样品前处理：将待测培养液 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min，过 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜，冷冻干燥，加 5 mL 甲醇完全溶解，过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜后上机检测。

(3) 液相检测条件及方法学考察：采用 C_{18} 色谱柱 ($250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$) 进行分离，流动相及洗脱条件参考董瑞珍等^[26]的方法。测试验证方法精密度良好，重复性良好，样品在 48 h 内稳定，符合指纹图谱技术要求。

HPLC 数据结果采用国家药典委员会中药色谱指纹图谱相似度评价系统 (2012.130723 版) 进行样品间峰匹配及近似度计算分析，利用 Excel 软件统计分析成分个数，差异成分数目占相应样品成分总

表 4 菌群生物转化大黄样品信息

Table 4 Microbial flora biotransformation *Rhei Radix et Rhizoma* sample information

样品代号	菌群生物转化大黄样品条件
S1	培养基-大黄粉为 32:1, 0 h 样品
S2	培养基-大黄水浸液为 8:1, 0 h 样品
S3	培养基-大黄粉为 32:1, 厌氧培养 24 h 样品
S4	培养基-大黄水浸液为 8:1, 厌氧培养 24 h 样品
S5	培养基-大黄粉为 32:1, 有氧培养 24 h 样品
S6	培养基-大黄水浸液为 8:1, 有氧培养 24 h 样品
S7	培养基-大黄粉为 32:1, 厌氧培养 48 h 样品
S8	培养基-大黄水浸液为 8:1, 厌氧培养 48 h 样品
S9	培养基-大黄粉为 32:1, 有氧培养 48 h 样品
S10	培养基-大黄水浸液为 8:1, 有氧培养 48 h 样品
S11	大黄水浸液

数百分比 (K) 计算如下：

$$K = [S_i \text{ 成分总数} - (S_i \cap S_w) \text{ 成分数目}] / S_i \text{ 成分总数}$$

K 为 S_w 无 S_i 有成分数目占 S_i 成分数目的百分比； S_w 为某转化条件下菌群转化大黄样品成分合集； S_i 为某单一转化条件与 S_w 样品不同的菌群转化大黄样品成分合集

考察了不同大黄添加形式和有氧、厌氧条件下生物转化大黄的情况，指纹图谱见图 1。

图 1 中点状部分代表出峰位置，可以看出各样品指纹图谱相似性极高，但在保留时间 35~50 min 及 55~85 min 频繁出现样品间的出峰位置和出峰个数不同。各样品成分数目及变化情况如表 5 所示，关于成分数目变化的确定以 S3 成分改变为例进行说明，由于 S1 和 S3 成分中包含培养基成分，需结合 S11 组分分析排除干扰，转化后出现新成分数目为 S3 中独有而 S1 和 S11 中未有的组分个数；转化后

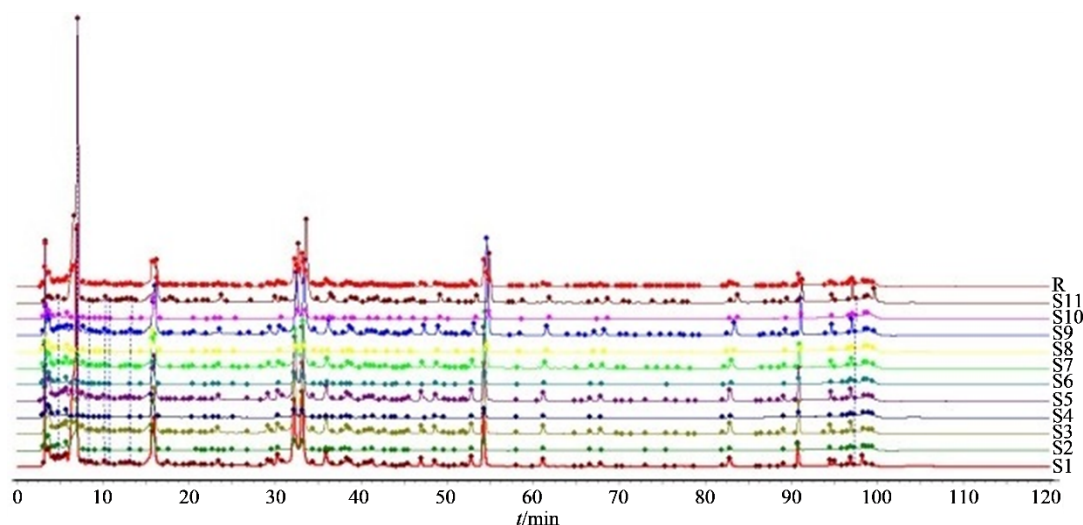


图 1 不同条件下菌群生物转化大黄指纹图谱对比

Fig. 1 Comparison of fingerprints of biotransformation *Rhei Radix et Rhizoma* under different conditions

表5 各样品中成分数目及变化情况

Table 5 Number and changes of ingredients in each sample

样品名称	成分总数	转化后出现 新成分数目	转化后消失 成分数目
S1	111	—	—
S2	78	—	—
S3	112	6	2
S4	69	2	4
S5	113	6	1
S6	73	5	4
S7	105	10	5
S8	64	10	11
S9	118	19	11
S10	66	27	6
S11	103	—	—

消失成分数目为S3中无而S1和S11中共有的组分个数。以粉状作为大黄添加方式样品(单数编号样品)所含成分总数均在100个以上,在所有取样时间点均多于水浸液形式样品(双数编号样品)。除S4和S8样品外,其余样品消失成分数目均低于新成分产生的数量。无论是转化后产生新成分数目还是消失成分数目,48 h样品成分改变数目均高于24 h样品。结合活菌计数规律显示的24 h后乳酸菌活菌数下降,48 h成分数目的变化可能源于菌体裂解释放的胞内组分。后续实验选择24 h。

为了充分发挥不同肠道微生物转化大黄的多样性特点,并为今后开发新型活性成分做准备,将从整体获得最多转化成分的数目来决定最佳条件。根据指纹图谱所显示的特征,同一发酵时间和相同氧环境下,对不同大黄添加形式生物转化样品比较成分变化(表6)。在所有时间点,以粉状作为添加方式时(单数编号样品)的差异成分数目和K值均比水浸液形式(双数编号样品)更高。在有氧条件下转化48 h时,与水浸液样品(S10)相比,粉状样品(S9)K值最高,可达71.2%。在有氧条件下转化24 h时,粉状样品(S5)对比水浸液样品(S6)的独有成分共计53个,远高于S6中所具有的差异成分数目(12个,与S5相比)。结果显示粉状大黄作为添加方式更具优势,这可能与微生物产生的纤维素酶、果胶酶等胞外酶催化降解植物细胞壁,有利于增加药物成分的溶出相关^[27],除了微生物对于药物成分的转化,还促进了大黄胞内组分的溶出,所以表现为更多差异成分。

在转化时间和大黄添加方式均相同的条件下,

表6 不同大黄添加形式下所含成分比较

Table 6 Comparison of ingredients in different forms of *Rhei Radix et Rhizoma*

对比项目	差异成分数目	K/%
S1无S2有	10	12.8
S2无S1有	42	37.8
S3无S4有	9	13.0
S4无S3有	52	46.4
S5无S6有	12	16.4
S6无S5有	53	46.9
S7无S8有	32	50.0
S8无S7有	72	68.6
S9无S10有	33	50.0
S10无S9有	84	71.2

比较不同氧环境生物转化样品的成分变化(表7),其中S3、S4、S7、S8样品为厌氧环境转化;S5、S6、S9、S10样品为有氧环境转化。在转化24 h大黄添加方式相同时(S3 vs S5, S4 vs S6),从K值来看,不同氧环境对于生物转化样品成分影响的差异性不大。在转化48 h以粉状添加方式时(S7 vs S9),有氧和无氧状态下差异成分数目分别为14和11,数目较为接近。因此,在所得差异代谢产物的数目相差不大的前提下,根据生物转化的便利性和经济性优先原则,选择有氧条件转化。

表7 不同氧环境下生物转化大黄所含成分比较

Table 7 Comparison of components in biotransformation *Rhei Radix et Rhizoma* under different oxygen environments

对比项目	差异成分数目	K/%
S3无S5有	2	1.8
S5无S3有	2	1.8
S4无S6有	5	6.9
S6无S4有	4	5.8
S7无S9有	14	11.9
S9无S7有	11	10.5
S8无S10有	26	39.4
S10无S8有	4	6.3

2.5 基于代谢组学分析菌群生物转化大黄成分变化

2.5.1 基于液相色谱质谱联用(LC-MS)代谢组学检测

(1)样品前处理:分别准备未接菌发酵大黄培养基(样品S1, $n=6$)和最佳条件下接菌发酵后大黄培养物(样品S5, $n=6$)作为代谢组学实验对

象。分别移取 100 μL 样品至离心管中,加入 300 μL 甲醇提取液,涡旋混匀 30 s,冰水浴超声 10 min, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h,将样品 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清进样检测,所有样品另取等量上清混合成 QC 样品上机检测,证明样品质量、方法、稳定性均良好。

(2) LC-MS/MS 色谱分离和质谱采集:使用 Vanquish 超高效液相色谱仪,通过 Waters ACQUITY UPLCHSS T3(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱对目标化合物进行分离;流动相为 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵和 5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸(A)-乙腈(B);体积流量 0.5 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,洗脱梯度如下:0~7 min, 95%~65% B; 7~9 min, 65%~40% B; 9~12 min, 40%~95% B。样品盘温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$,进样体积 2 μL ,通过 Orbitrap Exploris 120 质谱仪进行一级、二级质谱数据采集,鞘气流速 50 Arb,辅助气流速 15 Arb,毛细管温度 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$,全谱分辨率 60 000,MS/MS 分辨率 15 000,碰撞能量:10/30/60(NCE 模式),喷雾电压 3.8 kV(正离子)或 -3.4 kV (负离子)。

2.5.2 数据处理 代谢组学原始数据经 ProteoWizard 软件转成 mzXML 格式后,使用 R 程序包(内核为 XCMS)进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理,然后与 BiotreeDB(V2.1)二级质谱数据库匹配进行物质注释,算法打分的 Cutoff 值设为 0.3,采用 SIMCA 软件(V16.0.2)进行主成分分析(PCA)。差异代谢物分析采用 MetaboAnalyst 5.0。

2.5.3 代谢物鉴定 通过 HMDB、KEGG 数据库进行分类匹配所涉及代谢产物,结果见图 2。主要代谢产物共计 763 种,数目较多的代谢物类别分别为脂质和类脂质分子(244)、苯丙烷和聚酮化合物(138)、有机杂环化合物(101)、有机酸及其衍生物(92)和苯类(59)。

2.5.4 PCA 分析 如 PCA 得分图(图 3)所示,无论正离子还是负离子模式下,样本全部处于 95% 置信区间,均表现出生物转化后样品所示散点与未转化样品距离较大,说明二者代谢物组成存在显著性差异。

2.5.5 关键差异代谢物分析 通过 MetaboAnalyst 5.0 筛选 VIP 值大于 1 同时 $P<0.05$ 的代谢物,确定 18 种关键差异代谢物(表 8),其中转化后上调代谢物共 10 种,下调代谢物共 8 种。山柰酚-3-*O*-刺槐二糖苷被认为是具有较强抑制新型冠状病毒作用的活性成分之一^[28],该组分和薯蓣皂苷上调最为明

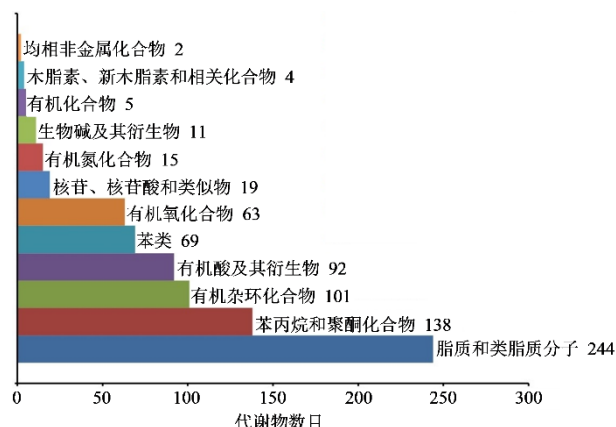
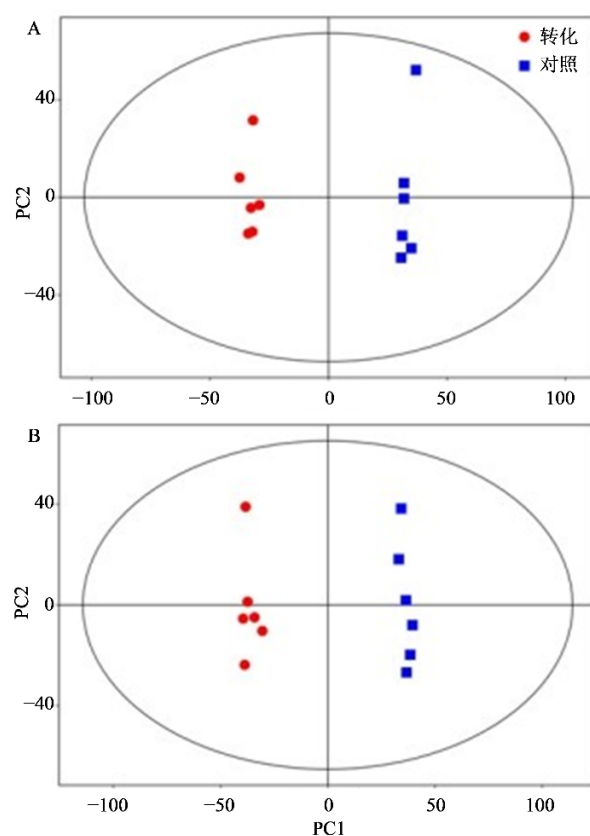


图2 二级图谱分类统计结果

Fig. 2 Classification and statistical results of secondary atlas



A-正离子模式;B-负离子模式

A-positive ion mode; B-negative ion mode

图3 样品关系PCA图

Fig. 3 PCA diagram of sample relationship

显,分别为未接菌发酵大黄培养基的 12.33 倍和 6.08 倍,推测菌群分泌的胞外酶系有助于水解大黄中的大分子成分,帮助其有效成分的释放,这与另一报道中菌株转化盾叶薯蓣产薯蓣皂苷元有提高溶出的效果相似^[29]。马来酸可导致肾小管损伤^[30],微生物可通过酶催化将其转化为较为安全的 *D*-苹果酸^[31]。本实验中马来酸转化后呈现较大幅度的下调,为未发酵时的 0.14 倍。

表8 关键差异代谢产物筛选结果

Table 8 Screening results of key differential metabolites

ID	英文名称	中文名称	变化倍数	P值	表达情况	VIP值
HMDB0030704	taxiphyllin	紫杉甙甘	4.67	6.53×10^{-12}	上调	2.06
HMDB0037574	biorobin	山柰酚-3-O-刺槐二糖苷	12.33	1.13×10^{-6}	上调	2.11
HMDB0002392	maslinic acid	山楂酸	4.08	2.14×10^{-6}	上调	2.03
HMDB0041593	4-glucogallic acid	4-葡萄糖没食子酸	1.76	2.68×10^{-6}	上调	2.06
HMDB0036827	sclareol	香紫苏醇	4.44	8.53×10^{-6}	上调	2.09
HMDB0251433	dioscin	薯蓣皂苷	6.08	1.02×10^{-5}	上调	2.12
HMDB0036548	hericenone B	海色酮B	3.50	1.62×10^{-5}	上调	2.12
HMDB0002385	celastrol	赛斯特	3.98	3.41×10^{-5}	上调	2.07
HMDB0003306	phloretin	根皮素	2.00	9.22×10^{-5}	上调	2.12
HMDB0032923	kojic acid	曲酸	2.07	4.73×10^{-4}	上调	1.96
HMDB0037486	isosakuranetin 7-xyloside	异樱草素 7-木糖苷	0.25	3.00×10^{-5}	下调	1.91
HMDB0001964	caffeic acid	咖啡酸	0.57	1.39×10^{-4}	下调	1.95
HMDB0029344	blepharin	莱帕林	0.03	5.43×10^{-10}	下调	2.14
HMDB0000176	maleic acid	马来酸	0.14	2.96×10^{-8}	下调	2.16
HMDB0000716	L-pipecolic acid	L-哌可酸	0.04	3.79×10^{-8}	下调	2.15
HMDB0004072	4-hydroxystyrene	4-羟基苯乙烯	0.17	1.26×10^{-7}	下调	2.13
HMDB0041186	ilicifolinoside A	芥叶苷 A	0.08	2.77×10^{-7}	下调	2.01
HMDB0033463	subaphylline	N-阿魏酰基-1,4-丁二胺	0.43	3.97×10^{-7}	下调	2.13

本实验中发现蒽醌类物质在转化后含量均有下调但不具有显著性差异,如大黄酚(0.71倍)、大黄素(0.82倍)、大黄酸(0.91倍),这与其他报道结果基本一致^[32-33]。此外,组胺的水平也监测到上升的情况,为原有的1.16倍。

3 结论

本研究采用人体肠道菌群进行大黄生物转化条件的摸索和成分变化的探究,通过对菌群培养基组分和大黄添加量的优化,确定了蔗糖/大豆粉为改良YCFA培养基的最佳组合,培养基与大豆粉最适添加比为32:1。利用指纹图谱技术分析大黄添加方式、氧环境随时间改变对于生物转化成分的影响,发现以粉状作为添加方式时所含成分数目较多,发酵24 h时不同氧环境对于成分数目变化影响较小。经代谢组学分析转化后组分共计763种,PCA得分图显示初始时和发酵后样品代谢物组成存在显著性差异,确定上调代谢物10种,下调代谢物8种。结果表明,通过菌群生物转化可提高大黄活性成分的溶出和转变,为今后实现大黄生物转化增效提供了新的可能,同时在生物转化活性物质过程优化方面起到了一定的借鉴作用。但实验中也检测到组胺水平有所上升,对于其安全性还需进一步通过体内外实验进行科学论证。今后可通过宏基因组学结合代谢组学结果确定关键菌群进行菌

群复配,避免有害副产物的积累。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 魏江存,陈勇,谢臻,等. 中药大黄炮制品的化学成分及药效研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(25): 3569-3574.
Wei J C, Chen Y, Xie Z, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacodynamics of rhubarb powder [J]. China Pharm, 2017, 28(25): 3569-3574.
- [2] 张向红,程黎晖. 大黄的药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国药业, 2009, 18(21): 76-78.
Zhang X H, Cheng L H. Research progress on pharmacological action and clinical application of rhubarb [J]. China Pharm, 2009, 18(21): 76-78.
- [3] 杨滢. 大黄药效成分及其药理活性研究进展[J]. 中医临床研究, 2018, 10(5): 142-144.
Yang Y. A review on pharmacodynamic components and pharmacological activities of Dahuang [J]. Clin J Chin Med, 2018, 10(5): 142-144.
- [4] 熊卫东,马庆一. 含蒽醌的中草药: 一类潜在天然抑菌防腐剂初探[J]. 天津中医药, 2004, 21(2): 158-160.
Xiong W D, Ma Q Y. Study of Chinese herbs containing anthraquinone as a kind of potential natural preservatives [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2004, 21(2): 158-160.
- [5] 文雅,于雪荣,王泓午,等. 利用微生物生物转化大黄

- 的研究进展 [J]. 中国酿造, 2020, 39(7): 7-10.
- Wen Y, Yu X R, Wang H W, et al. Research progress in biotransformation of rhubarb by microorganisms [J]. China Brew, 2020, 39(7): 7-10.
- [6] 陈国花. 微生物发酵中草药研究进展 [J]. 现代农业科技, 2013(23): 284, 287.
- Chen G H. Research progress of Chinese herbal medicine by microbial fermentation [J]. Mod Agric Sci Technol, 2013(23): 284, 287.
- [7] 高洁, 董文宾, 王勇, 等. 陕产大黄结合型蒽醌转化游离型蒽醌的发酵条件优化 [J]. 中医药导报, 2017, 23(9): 59-61, 65.
- Gao J, Dong W B, Wang Y, et al. Optimization of fermentation conditions for conversion of conjugated anthraquinone into free anthraquinone in dahuang (*Radix et Rhizoma Rhei*) from Shaanxi [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 23(9): 59-61, 65.
- [8] 吕平. 高产大黄素赭曲霉的离子注入诱变选育及发酵特性分析 [J]. 工业微生物, 2011, 41(3): 32-37.
- Lv P. Breeding of emodin-producing strains by N⁺ implantation and analysis of fermentative conditions and properties [J]. Ind Microbiol, 2011, 41(3): 32-37.
- [9] 王惠芸, 吕雄. 双歧杆菌对12种中药的发酵与抗菌活性检测分析 [J]. 化工管理, 2017(26): 139.
- Wang H Y, Lü X. Analysis of the fermentation and antibacterial activity of *Bifidobacterium* against 12 kinds of traditional Chinese medicine [J]. Chem Enterp Manag, 2017(26): 139.
- [10] 郭吉野. 槐耳大黄双向发酵研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- Wu J Y. Study on bidirectional fermentation of *Rheum pseudoacacia* [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2013.
- [11] 王楠. 叶点霉发酵液中蒽醌类物质的分离提取及其生物活性的初步研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- Wang N. Studies on extraction and bioactivities of anthraquinones from fermentation liquor of *Phyllosticta* [D]. Changchun: Jilin University, 2014.
- [12] 刘洋, 金顺义, 常娟, 等. 复合益生菌发酵中草药前后活性成分变化 [J]. 安徽农业科学, 2017, 45(34): 123-125.
- Liu Y, Jin S Y, Chang J, et al. Changes of active ingredients before and after compound probiotic fermented Chinese herbs [J]. J Anhui Agric Sci, 2017, 45(34): 123-125.
- [13] Klünemann M, Andrejev S, Blasche S, et al. Bioaccumulation of therapeutic drugs by human gut bacteria [J]. Nature, 2021, 597(7877): 533-538.
- [14] 闻崇炜, 黄佳滢, 朱锐灵, 等. 中药材资源质量评价方法的研究进展 [J]. 生物资源, 2020, 42(6): 670-677.
- Wen C W, Huang J Y, Zhu R L, et al. Research progress in quality evaluation methods of Chinese medicinal materials [J]. Biotic Resour, 2020, 42(6): 670-677.
- [15] 王相, 张闯, 范帅帅, 等. 酸枣叶HPLC指纹图谱研究 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(6): 797-800.
- Wang X, Zhang C, Fan S S, et al. HPLC fingerprint study of *Ziziphi Spinosae Folium* [J]. Drug Eval Res, 2017, 40(6): 797-800.
- [16] 刘慧, 肖金超, 张庆捷, 等. 金骨莲胶囊HPLC指纹图谱及化学模式识别研究 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4185-4192.
- Liu H, Xiao J C, Zhang Q J, et al. HPLC fingerprint and chemical pattern recognition of Jingulian Capsules [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(14): 4185-4192.
- [17] Akinfala T O, Houbraken J, Sulyok M, et al. Moulds and their secondary metabolites associated with the fermentation and storage of two cocoa bean hybrids in Nigeria [J]. Int J Food Microbiol, 2020, 316: 108490.
- [18] 向进乐, 赵胜娟, 马丽苹, 等. 可食牡丹鲜花酶法制汁及主成分HPLC-Q-TOF-MS/MS鉴定 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(18): 137-143.
- Xiang J L, Zhao S J, Ma L P, et al. Juice production from fresh tree peony flower by enzyme treatment and its phytochemical identification by HPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(18): 137-143.
- [19] 周文卷, 高德岷, 耿馨悦, 等. 基于拟靶标代谢组学考察不同煎煮方式对大黄功效组分煎出的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(10): 2755-2766.
- Zhou W J, Gao D M, Geng X Y, et al. Effects of different decoction methods on functional components of rhubarb based on pseudo-targeted metabolomics [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(10): 2755-2766.
- [20] Huang Z H, Xu Y, Wang Q, et al. Metabolism and mutual biotransformations of anthraquinones and anthrones in rhubarb by human intestinal flora using UPLC-Q-TOF/MS [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2019, 1104: 59-66.
- [21] Miyazaki K, Martin J C, Marinsek-Logar R, et al. Degradation and utilization of xylans by the rumen anaerobe *Prevotella bryantii* (formerly *P. ruminicola* subsp. *brevis*) B(1)₄ [J]. Anaerobe, 1997, 3(6): 373-381.
- [22] Scott K P, Martin J C, Duncan S H, et al. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, *in vitro* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 2014, 87(1): 30-40.
- [23] 徐海燕, 辛国芹, 曹银生, 等. 低聚木糖对益生菌及人肠道菌群的影响 [J]. 药学研究, 2013, 32(9): 500-503.
- Xu H Y, Xin G Q, Cao Y S, et al. Impact of xylo-

- oligosaccharides on the growth of prebiotics and human intestinal flora [J]. J Pharm Res, 2013, 32(9): 500-503.
- [24] 韩佳慧, 郭云霞, 李 晔, 等. 益生菌发酵对大黄抑制大肠杆菌的影响 [J]. 饲料工业, 2015, 36(15): 38-41.
- Han J H, Guo Y X, Li Y, et al. The antibacterial effect of rhubarb fermented by probiotics on *E. coli* [J]. Feed Ind, 2015, 36(15): 38-41.
- [25] 魏朝治, 辛 雪, 陈蕾蕾, 等. 乳酸菌在黄酮类化合物生物转化中的应用 [J]. 中国酿造, 2016, 35(10): 13-17.
- Wei C Z, Xin X, Chen L L, et al. Application of lactic acid bacteria in the biotransformation of flavonoids compounds [J]. China Brew, 2016, 35(10): 13-17.
- [26] 董瑞珍, 陈 垣, 郭凤霞, 等. 大黄 HPLC 指纹图谱建立 [J]. 中成药, 2020, 42(9): 2505-2510.
- Dong R Z, Chen Y, Guo F X, et al. Establishment of HPLC fingerprint of rhubarb [J]. Chin Tradit Pat Med, 2020, 42(9): 2505-2510.
- [27] 李秋月, 林连兵, 杨雪娇, 等. 微生物发酵中草药的研究现状 [J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 2232-2244.
- Li Q Y, Lin L B, Yang X J, et al. Research status of microbial fermentation of Chinese herbal medicine [J]. Microbiol China, 2021, 48(6): 2232-2244.
- [28] Yousefi H, Mashouri L, Okpechi S C, et al. Repurposing existing drugs for the treatment of COVID-19/SARS-CoV-2 infection: A review describing drug mechanisms of action [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 183: 114296.
- [29] 王祖华, 徐启燃, 周顺丽, 等. 内生 *Bacillus sivelezensis* HBB₅ 菌株发酵盾叶薯蓣产薯蓣皂苷元的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2021, 33(7): 774-778.
- Wang Z H, Xu Q R, Zhou S L, et al. The production of diosgenin by endophytic *Bacillus sivelezensis* HBB₅ through fermenting *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright [J]. Chin J Microecol, 2021, 33(7): 774-778.
- [30] Chien H J, Xue Y T, Chen H C, et al. Proteomic analysis of rat kidney under maleic acid treatment by SWATH-MS technology [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2020, 34 (Suppl 1): e8633.
- [31] van der Werf M J, van den Tweel W J, Hartmans S. Screening for microorganisms producing *D*-malate from maleate [J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(9): 2854-2860.
- [32] 戴万生, 赵荣华. 发酵法对大黄蒽醌类成分含量的影响 [J]. 云南中医中药杂志, 2005, 26(1): 38-39.
- Dai W S, Zhao R H. Effect of fermentation on the content of anthraquinones in *rhubarb* [J]. Yunan J Tradit Chin Med Mater Med, 2005, 26(1): 38-39.
- [33] 于志伟, 杨 欣, 曾宪军, 等. 腐皮镰刀菌 R13 发酵产大黄素的初步研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2015, 52(5): 1135-1140.
- Yu Z W, Yang X, Zeng X J, et al. Preliminary studies on emodin produced by *Fusarium solani* R13 [J]. J Sichuan Univ Nat Sci Ed, 2015, 52(5): 1135-1140.

[责任编辑 兰新新]