

肠道菌群对汉黄芩苷的代谢研究

崔 祥, 陶金华, 魏晓燕, 江 曙*, 徐 君, 钱大玮, 段金廛

南京中医药大学 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 江苏 南京 210023

摘 要: 目的 研究人肠道菌群对汉黄芩苷的代谢作用。方法 采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术分析肠道菌群对汉黄芩苷的代谢物; 此外, 采用 16 S rDNA 分子生物学方法进行肠道细菌的鉴定与组成分析。结果 汉黄芩苷主要被代谢为汉黄芩素和少量的脱甲基代谢物, 且肠道混合菌群的代谢能力较强。多数 *Enterococcus* 属和 *Escherichia* 属的肠道细菌具有代谢功能, 其中具有较强代谢活性的一种单菌为 *Escherichia* sp. 41。结论 汉黄芩苷主要被代谢为汉黄芩素和少量的脱甲基代谢物, 鉴定出一种单菌为 *Escherichia* sp. 41。

关键词: 肠道细菌; 汉黄芩苷; UPLC-Q-TOF/MS; 代谢物; 16 S rDNA

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)19-4024-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.19.019

UPLC-Q-TOF/MS-based metabolic profiles of wogonoside by intestinal bacteria

CUI Xiang, TAO Jin-hua, WEI Xiao-yan, JIANG Shu, XU Jun, QIAN Da-wei, DUAN Jin-ao

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the metabolic effects of wogonoside by human gut microbiota. **Methods** UPLC-Q-TOF/MS was used to analyze the metabolites of wogonoside. Additionally, 16 S rDNA molecular biology method was applied to the identification and composition analysis of intestinal bacteria. **Results** Wogonoside was mainly metabolized to wogonin and small quantities of demethylated metabolites. Most of *Enterococcus* and *Escherichia* had the metabolic abilities, among which a single bacterium *Escherichia* sp. 41 possessed the stronger metabolic activity. **Conclusion** This study has a good guiding significance for *in vivo* process and efficacy of wogonoside.

Key words: gut microbiota; wogonoside; UPLC-Q-TOF/MS; metabolites; 16 S rDNA

人体肠道共生着数以万亿计的微生物, 组成极其复杂的微生态系统, 并保持相对稳定的平衡状态, 调控宿主的多种代谢路径, 影响免疫-抗炎轴, 在维持宿主正常生理功能中发挥重要作用^[1-2]。肠道菌群对不同的药物有着不同的代谢过程, 比如将原活性物质代谢成无活性物质; 将无活性的物质代谢成有活性的物质; 将原活性物质转化成其他活性物质; 产生新的有毒物质或将原有毒物质的活性降低。由此可见, 肠道菌群对药物药效的发挥具有重要影响, 且代谢产物药理活性的改变会影响疾病的治疗效果, 因此人体肠道菌群的代谢作用目前受到广泛的关注, 已成为国内外的研究热点^[3-6]。

汉黄芩苷是黄芩的主要有效成分之一, 具有抗

肿瘤^[7]、抗炎、抗氧化等药理活性^[8]。目前关于人体肠道菌群对汉黄芩苷的代谢研究鲜有报道。本研究通过采集健康志愿者的新鲜粪便, 从中分离人体肠道细菌, 应用 UPLC-Q-TOF/MS 与 MetaboLynxTM 分析软件筛选汉黄芩苷的人体肠道菌群代谢产物, 并采用 16 S rDNA 分子生物学方法对肠道细菌进行鉴定, 从而为汉黄芩苷体内代谢、吸收及药效的深入研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

超高效液相质谱仪: Acquity UPLC 系统(Waters 公司)、AcquityTM synapt Q-TOF 质谱仪(Waters 公司)、Lock-spray 接口、电喷雾离子源(ESI)、Masslynx

收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673831)

作者简介: 崔 祥(1993—), 男, 硕士在读。E-mail: 1457573005@qq.com

*通信作者 江 曙, 教授, 硕士生导师。Tel: (025)85811516 E-mail: jiangshu2020@126.com

4.1 质谱工作站软件(Waters公司)、MetaboLynxTM 分析软件(Waters公司);厌氧罐(Mitsubishi公司);厌氧袋(Mitsubishi公司);TGL-16B高速离心机(上海安亭科学仪器厂);BT-125电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);MLS-3750高压蒸汽灭菌锅(日本Sanyo公司);EPED超纯水系统(南京易普达易科技有限公司);PCR仪(德国Eppendorf公司);电泳槽、电泳仪(Tanon公司);凝胶成像仪(Biorad公司)。

1.2 药品与试剂

汉黄芩苷(质量分数>98%,批号120123)购自上海融禾医药科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒、胶回收试剂盒(Karrotten公司);Tris、Na₂EDTA·2H₂O、EDTA、Bromophenol Blue和Xylene Cyanol FF[宝生物工程(大连)有限公司];去离子水采用EPED超纯水机(南京易普达易科技有限公司)制备。

2 方法

2.1 肠道细菌混悬液的制备

取健康成年女性志愿者的新鲜粪便4.0 g,加入20 mL无菌生理盐水,涡旋混匀后,2 000 r/min离心10 min,取上清液,即为肠道细菌混悬液。

2.2 普通厌氧培养基(GAM)的配制

取10.0 g蛋白胨、10.0 g 胰蛋白胨、3.0 g大豆胨、5.0 g酵母浸粉、13.5 g消化血清、1.2 g牛肝浸出粉、2.2 g牛肉膏、3.0 g葡萄糖、3.0 g氯化钠、2.5 g磷酸二氢钾、5.0 g可溶性淀粉、0.3 g硫代乙酸钠、0.3 g L-半胱氨酸盐酸盐、16.0 g琼脂粉(1.6%),加1 000 mL蒸馏水。按照上述组成配制培养基,调pH值至7.0左右,分装后在15 MPa、121 °C灭菌20 min,备用。

2.3 肠道细菌的分离、培养与鉴定

取1.0 mL混悬菌液至装有9.0 mL无菌生理盐水的试管中,振荡混匀,按10倍依次稀释,即可得到10~1×10⁸倍肠道细菌混悬液的系列稀释液。吸取0.1 mL适当浓度的稀释液接种至固体GAM培养皿中,涂布均匀,37 °C厌氧培养48 h后,分离肠道细菌。

将单菌株接种至1.0 mL GAM液体培养基中,37 °C厌氧培养24 h后,12 000 r/min离心2 min,弃上清液,采用Karrotten细菌基因组DNA提取试剂盒提取肠道细菌总DNA,进行16 S rDNA PCR扩增,反应体系30 μL: ddH₂O 20.8 μL、10×pfu

buffer 3 μL、dNTPs 2.4 μL、上下游引物各1.5 μL、pfuDNA聚合酶0.5 μL、DNA模版0.3 μL。其中,上下游引物分别为16 S-F: 3'-CATGCA-AGTCGARGC-5'和16 S-R: 3'-GGTGTGACGGG-CGGT-5'。PCR反应条件:94 °C预变性1 min;94 °C变性30 s;55 °C退火30 s;72 °C延伸2 min;循环30次,最后以72 °C延伸10 min结束。PCR产物经纯化后,由上海美吉测序公司测序。将测序结果与EzBioCloud数据库中的16 S rDNA序列进行同源性比较,使用Mega 5.0软件进行基因进化树分析。

2.4 肠道细菌的转化及转化液的处理

取0.1 mL适当浓度的肠道菌悬液,加入到0.9 mL GAM培养液中(含有0.1 mmol/L汉黄芩苷),以不加汉黄芩苷的处理作为对照组,37 °C厌氧培养48 h。取厌氧培养后的含药菌液样品1.0 mL,加入浓氨水100 μL和醋酸乙酯2.2 mL萃取,充分摇匀后,静置10 min,取有机层,重复萃取2次,合并有机相,低温烘干,残渣用0.5 mL甲醇(色谱级)溶解,13 000 r/min离心5 min,取上清液用于UPLC-Q-TOF/MS分析。

2.5 色谱-质谱条件

2.5.1 UPLC 色谱条件 色谱柱为Acquity UPLC Synchronis C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相为乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B),梯度洗脱条件为0~1.6 min, 76%~20% A;1.6~4.6 min, 20%~76% A;4.6~12 min, 76% A;体积流量0.4 mL/min;柱温25 °C;进样器温度4 °C;进样量10 μL;检测时间12 min。

2.5.2 MS 检测条件 ESI源;扫描方式:同时进行正、负离子一级质谱全扫描和选择离子进行二级质谱分析;数据采集模式和方式:MSE和Centroid;离子源温度120 °C,脱溶剂温度400 °C,毛细管电压4.0 kV,锥孔电压40 V,脱溶剂气体积流量600 L/h,锥孔气体积流量50 L/h;质量扫描范围m/z 100~1 000。

2.5.3 数据分析 在MetabolynxTM软件的Metabolite List窗口中输入可能的代谢途径,例如:去糖基化、甲基化、脱糖基化再甲基化、乙酰化、脱羟基、羟化甲基化、脱羰基、硫酸化、氢化、羟化、氧化、葡萄糖醛酸化、脱糖基化再乙酰化、脱糖基化再羟化等。软件自动根据设置的处理方法进行数据分析,质谱数据检测误差范围<1×10⁻³。

3 结果

3.1 汉黄芩苷经不同肠道细菌代谢的 UPLC-Q-TOF/MS 图谱分析

汉黄芩苷分别经肠道混合菌和 100 株单菌厌氧培养后, 采用 UPLC-Q-TOF/MS 测定转化液, MS 数据经 MetabolynxTM 软件分析后, 肠道细菌对汉黄芩苷的代谢产物见表 1。从 UPLC 图谱代谢产物的

峰面积分析来看, 单一菌株去糖基化作用比混合菌群弱, 在分离得到的所有单菌中, 41 号菌的代谢作用较强 (图 1)。

3.2 代谢产物的鉴定

肠道细菌孵育样品经 UPLC 检测出可能的代谢产物后, 再根据产物的离子峰进行 MS/MS 分析, 以进一步确认该产物, 质谱图见图 2。

表 1 肠道菌群孵育样品中汉黄芩苷及其代谢物

Table 1 Wogonoside and its metabolites in incubated samples of intestinal bacteria

代号	t_R/min	m/z (计算值)	$[M-H]^-$	鉴定结果	分子式
M0	6.83	460.084 9	459.009 8	汉黄芩苷	$C_{22}H_{20}O_{11}$
M1	8.21	284.001 6	283.011 2	汉黄芩素	$C_{16}H_{12}O_5$
M2	6.41	460.100 6	459.092 7	脱甲基汉黄芩苷	$C_{21}H_{18}O_{11}$

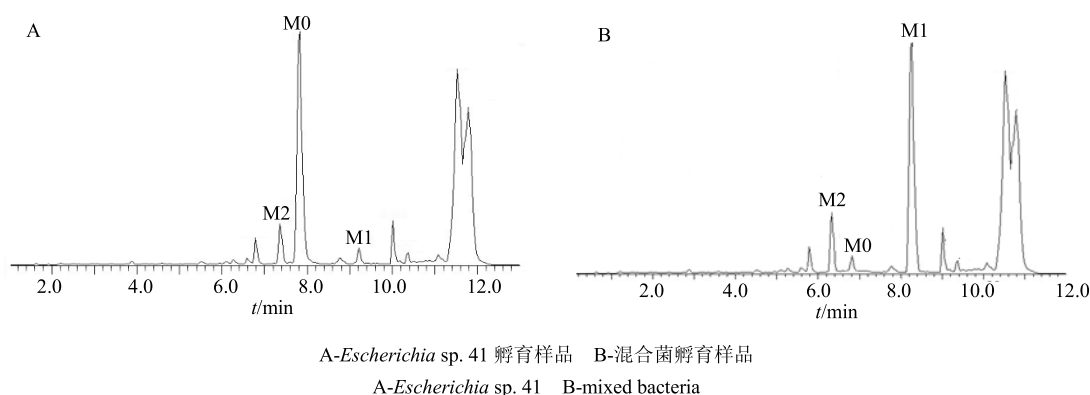


图 1 肠道孵育样品的总离子流图

Fig. 1 UPLC/MS chromatograms of intestinal bacterial samples

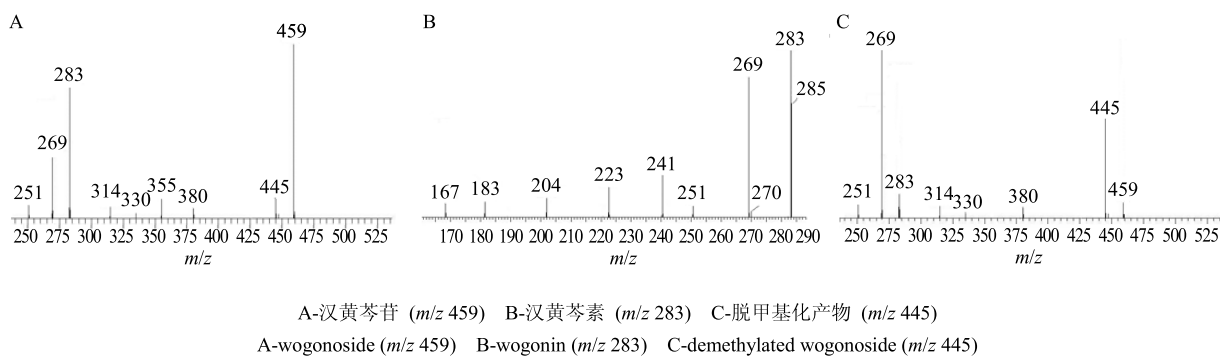


图 2 汉黄芩苷及其代谢产物的 MS/MS 图

Fig. 2 MS/MS spectra of wogonoside and its metabolites

3.2.1 原型成分 M0 在 41 号菌转化液的 ESI⁺图中存在 M0 m/z 459 $[M-H]^-$ 峰的化合物, 保留时间为 6.83 min, m/z 459 $[M-H]^-$ 为其分子离子峰。对 m/z 459 进行 MS/MS 分析, M0 存在 m/z 445、283、269、251 等主要碎片离子峰 (图 2-A)。 m/z 445 是由 m/z 459 失去 1 分子 CH_2 而形成, m/z 283 来源于 m/z 459

失去 1 分子葡萄糖醛酸, m/z 269 是 m/z 283 失去 1 分子 CH_2 形成的, m/z 269 再失去 1 分子水则形成了 m/z 251 (图 3)。M0 的保留时间及其碎片离子峰与汉黄芩苷对照品的相同, 由此确定 M0 为汉黄芩苷。

3.2.2 脱糖基产物 M1 肠道混合菌群和 41 号菌的

转化液中均检测到 M1 的分子离子峰 m/z 283 $[M-H]^-$, 其相对分子质量比原型成分 M0 m/z 459 $[M-H]^-$ 少了 176, 推测是由于肠道细菌的脱糖基作用而形成。在 MS/MS 图谱中, M1 存在 m/z 269、251 等主要碎片离子峰 (图 2-B), 这些离子峰也存在于原型成分的 MS/MS 图谱中。 m/z 459 失去 1 分子葡萄糖醛酸后, 进一步 RDA 裂解可形成 m/z 167 (图 3)。此外, M1 的保留时间及其碎片离子峰均与汉

黄芩素对照品相同, 故鉴定 M1 为汉黄芩素。

3.2.3 脱甲基产物 M2 在混合菌群和 41 号菌的转化液中均存在 1 个较明显的峰 M2 m/z 445, 保留时间为 6.41 min, m/z 445 $[M-H]^-$ 为其分子离子峰, 且相对分子质量比原型成分 m/z 459 少了 14, 推测可能是失去 1 分子甲基。根据 MS/MS 图谱, M2 存在 m/z 445、283、269 等碎片离子, 故推测 M2 为原型成分的脱甲基化合物 (图 3)。

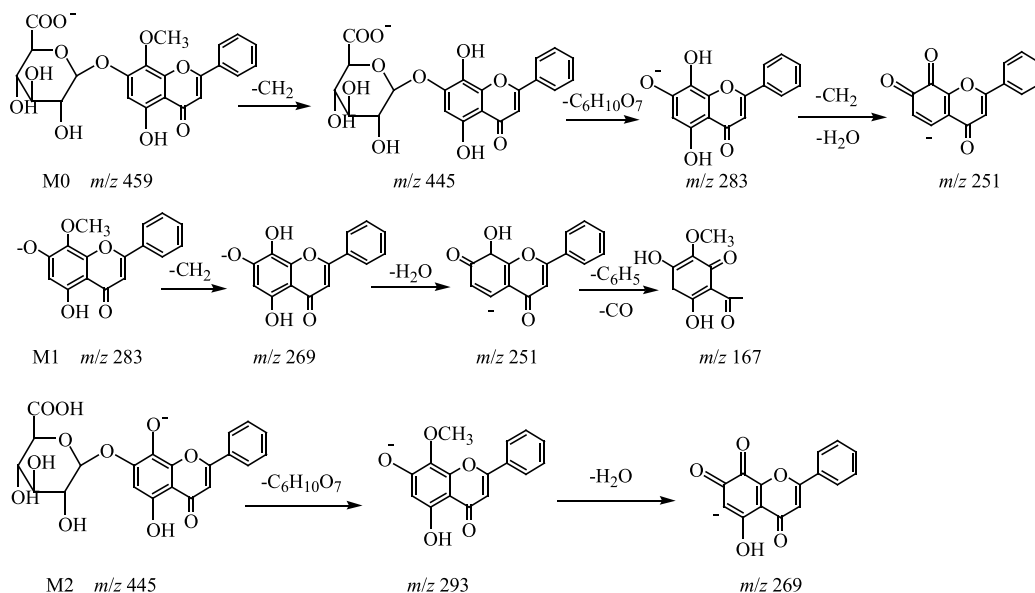


图3 汉黄芩苷及其代谢产物的质谱断裂规律图

Fig. 3 Proposed fragmentation pathways of wogonoside and its metabolites

3.3 汉黄芩苷的肠道细菌代谢途径

采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术, 并结合 Metabolyx 软件的分析, 结果表明, 混合菌与 *Escherichia* sp. 41 均具有脱糖基和脱甲基功能。从代谢产物的峰面积来看, 混合菌群与 *Escherichia* sp. 41 的脱甲基能力相似, 但是混合菌群脱糖基功能显著高于 *Escherichia* sp. 41。因此, 推测汉黄芩苷的肠道细菌代谢途径: 汉黄芩苷一方面产生脱甲基代谢物, 另一方面, 汉黄芩苷经过肠道细菌的去葡萄糖醛酸作用转化为主要产物汉黄芩素 (图 4)。

3.4 具有代谢汉黄芩苷的肠道细菌鉴定与组成分析

本实验共分离得到 100 种肠道细菌, 采用 16 S rDNA 分子生物学技术鉴定为 *Escherichia* 属 68 株, *Enterococcus* 属 16 种及 *Bacillus* 属 16 种。通过对汉黄芩苷的代谢, 结果表明, 混合菌群及 3 个属的多数肠道细菌均具有脱糖基和脱甲基作用, 产生汉黄芩苷的苷元汉黄芩素及脱甲基代谢物; 具有脱糖基

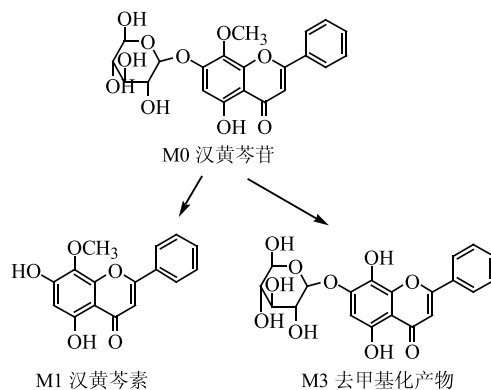


图4 汉黄芩苷的肠道细菌代谢途径

Fig. 4 Metabolic pathways of wogonoside by intestinal bacteria

功能的细菌在这 3 个属中所占的比例大于脱甲基功能细菌, 其中 *Enterococcus* 属中脱糖基功能细菌占 42%; *Escherichia* 属中脱糖基和脱甲基功能细菌各占 32% 和 28%; *Bacillus* 属中具有代谢功能的肠道细菌相对较少 (图 5)。此外, 具有较强代谢能力的

41号菌经16S rDNA分析,发现其与*Escherichia*同源率高达95%以上,从系统发育树上可以看出其与*Escherichia albertii* TW07627聚为一支,鉴定为*Escherichias* sp. 41,其在GenBank中基因登录号为KC694116(图6)。

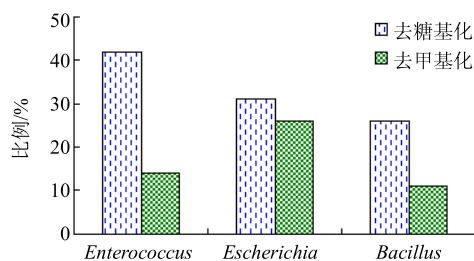


图5 代谢汉黄芩苷的肠道细菌分布

Fig. 5 Distribution of intestinal bacteria with wogonoside metabolic capability

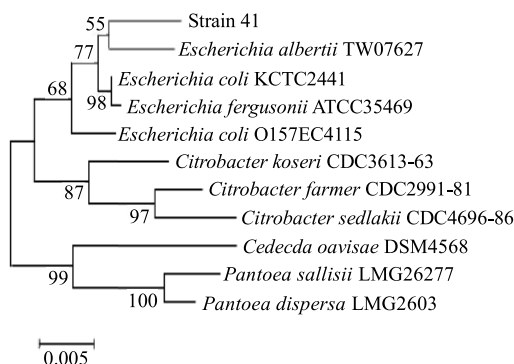


图6 41号菌的基因进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of strain No. 41

4 讨论

肠道微生态对人体健康发挥极其重要的作用,肠道菌群与宿主共代谢影响人类多种疾病的发生发展,肠道菌群能够发酵可溶性膳食纤维生成短链脂肪酸,降解肠道中蛋白质和多肽形成各种支链氨基酸,还可以将初级结合性胆汁酸代谢成游离的次级胆汁酸,从而进一步影响宿主的代谢和各种生理机能^[9-11]。此外,多数中药及其复方均以口服给药的方式进入体内,不可避免地接触肠道内大量细菌与细菌分泌的酶,进而中药成分被高效转化,有利于提高其生物利用度,如糖苷类成分因为含有糖基,极性大,难以吸收入血,但经过肠道细菌分泌的糖苷酶水解转化为苷元后,易于入血,进而发挥药理活性;柚皮苷口服生物利用度极低,但经过肠道细菌作用后,生成3种极性较低的代谢物,利于其在肠道中的跨膜转运^[12];芦丁经过肠道细菌代

谢,脱掉1分子芸香糖形成槲皮素后,发挥抗氧化活性^[13];大黄中的番泻苷A经肠道细菌代谢为大黄酸蒽酮,从而具有泻下的作用。本实验发现汉黄芩苷体外经过肠道菌群代谢可形成大量的苷元汉黄芩素,极性减小,更容易透过膜磷脂双分子层,利于吸收入血;此外,研究报道体内广泛存在葡萄糖醛酸转移酶,汉黄芩素入血后,又被转化成汉黄芩苷^[14]。由此可见,由于肠道菌群的代谢作用,更有利于汉黄芩苷药效的发挥。

参考文献

- [1] Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [2] Holmes E, Li J V, Marchesi J R, *et al.* Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk [J]. *Cell Metabol*, 2012, 16(5): 559-564.
- [3] 杨 静, 钱大玮, 段金彪, 等. 肠道细菌对中药成分代谢的研究进展 [J]. *中草药*, 2011, 42(11): 2335-2344.
- [4] 廖博雅, 王莎莎, 张军东, 等. 肠道微生物在人类疾病中的作用 [J]. *胃肠病学*, 2015, 20(2): 126-128.
- [5] 石汉平. 重视肠道细菌的代谢作用研究 [J]. *中华普通外科学文献*, 2010, 4(2): 89-90.
- [6] 陈秀琴, 黄小洁, 石达友, 等. 中药与肠道菌群相互作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(7): 1031-1036.
- [7] 向元梯, 刘卫红, 吴 娟, 等. 汉黄芩苷对鼻咽癌裸鼠移植瘤模型的放疗增敏作用及其机制研究 [J]. *中国耳鼻喉咽喉底外科杂志*, 2016, 22(5): 383-387.
- [8] 申云富, 范小青. 汉黄芩苷的药理活性研究进展 [J]. *上海中医药大学学报*, 2016, 30(4): 98-101.
- [9] Pedersen H K, Gudmundsdottir V, Nielsen H B, *et al.* Human gut microbes impact host serum metabolome and insulin sensitivity [J]. *Nature*, 2016, 535: 376-381.
- [10] Valentina T, Fredrik B. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism [J]. *Nature*, 2012, 489: 242-249.
- [11] Hansen T H, Gobel R J, Hansen T, *et al.* The gut microbiome in cardio-metabolic health [J]. *Genome Med*, 2015, 7(1): 1-16.
- [12] 马 燕. 柚皮素口服吸收机制及改善其生物利用度的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [13] Keppler K, Hein E M, Humpf H U. Metabolism of quercetin and rutin by the pig caecal microflora prepared by freeze-preservation [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50(8): 686-695.
- [14] 夏笔军. 汉黄芩苷和汉黄芩素肠局部循环新处置机制 [D]. 广州: 南方医科大学, 2010.