

黄连提取物与肠道菌群的相互作用研究

崔 祥, 陶金华, 江 曙*, 魏晓燕, 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, 南京 江苏 210023

摘要: **目的** 研究人体肠道菌群对黄连提取物主要活性成分的代谢及黄连提取物对人体肠道菌群生长的影响。**方法** 采用UPLC-Q-TOF/MS技术分析肠道菌群对黄连提取物转化后的代谢物;并应用浊度法测定不同质量浓度黄连提取物对4类肠道细菌(乳酸菌、双歧杆菌、肠杆菌和肠球菌)生长的影响。**结果** 肠道菌群对黄连提取物生物碱类成分主要进行氢化和去甲基作用,其中小檗碱和黄连碱被代谢为氢化产物,巴马汀被转化为去甲基产物;黄连提取物显著抑制病原菌(肠杆菌、肠球菌)的生长,显著促进益生菌(乳酸菌、双歧杆菌)的生长。**结论** 肠道菌群对黄连提取物生物碱类成分具有多种代谢作用,且黄连提取物具有改善肠道微生态的功能。

关键词: 黄连;肠道菌群;UPLC-Q-TOF/MS;小檗碱;黄连碱;巴马汀;乳酸菌;双歧杆菌;肠杆菌;肠球菌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)09-2103-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.09.019

Research on interaction between *Coptidis Rhizoma* extracts and intestinal bacteria

CUI Xiang, TAO Jin-hua, JIANG Shu, WEI Xiao-yan, 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 interaction between *Coptidis Rhizoma* extracts and intestinal bacteria. **Methods** The metabolites of *Coptidis Rhizoma* extracts by human gut microbiota were identified by UPLC-Q-TOF/MS. Furthermore, the effects of *Coptidis Rhizoma* extracts on the growth of *Bifidobacteria*, *Lactobacilli*, *Enterobacter*, and *Enterococcus* were evaluated by the colorimetric method. **Results** Alkaloids in *Coptidis Rhizoma* were mainly degraded by reduction and demethoxy, among which berberine and coptisine were converted to reductive products and palmatine was metabolized to a demethoxyl product. Additionally, pathogens such as *Enterobacter* and *Enterococcus* were obviously inhibited and probiotics such as *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* were notably promoted by *Coptidis Rhizoma* extracts. **Conclusion** Gut microflora can metabolize alkaloids from *Coptidis Rhizoma* by multiple ways, and *Coptidis Rhizoma* extracts can improve the intestinal microecology.

Key words: *Coptidis Rhizoma*; gut microbiota; UPLC-Q-TOF/MS; berberine; coptisine; palmatine; *Bifidobacteria*; *Lactobacilli*; *Enterobacter*; *Enterococcus*

人体胃肠道中栖息着大量微生物,组成极其复杂的微生态系统,维持肠道稳态,在人体健康中发挥重要作用^[1-2]。肠道菌群参与多数口服药物的体内代谢,中药及其复方传统应用多为口服给药,不可避免地与肠道菌群相互接触,导致化学成分在肝脏首关效应之前发生代谢转化,药物的活性或毒性发生明显改变,影响药效的发挥^[3-4]。此外,近年来大量研究证实肠道菌群紊乱会导致肠道致病菌急剧增

殖,促进结肠炎、肥胖症、糖尿病及其并发症、心血管疾病等多种疾病的发生发展^[5-7]。由此可见,以肠道菌群为靶点的药物干预将为疾病的预防及临床治疗提供新的策略^[8-9]。

黄连为毛茛科多年生草本植物,临床上以其干燥根茎入药,具有清热燥湿、泻火解毒的功效,常用于腹泻、糖尿病及其并发症等疾病的治疗,临床疗效显著^[10]。现代研究表明,黄连主要含有小檗碱、

收稿日期: 2017-12-08

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,博士,教授,主要从事肠道菌群与中药的相互作用研究。Tel: (025)85811516 E-mail: jiangshu2020@126.com

黄连碱、巴马汀等生物碱类活性成分,目前仅有少量关于单体小檗碱的肠道菌群代谢研究^[1],黄连与肠道菌群的相互作用尚未见相关报道。而中药及其复方往往通过多组分、多环节、多靶点而实现对疾病的整体调节作用,因而开展黄连提取物与肠道菌群的相互作用探讨,为黄连体内代谢吸收及作用机制的深入研究提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器与试剂

UPLC(Waters 公司);Q-TOF-MS(Waters 公司);高速离心机(上海安亭科学仪器厂);4 种选择性培养基:乳酸菌 LBS 琼脂培养基(编号 HB0385)、双歧杆菌 BS 琼脂培养基(编号 HB0394)、肠球菌培养基(编号 HB0133)、伊红美兰培养基(编号 HB0107)均购于青岛海博生物技术有限公司。

1.2 药材

黄连饮片(批号 17010)购自安徽慧隆中药饮片有限公司,经南京中医药大学段金廛教授鉴定为 *Coptis chinensis* Franch.

1.3 普通厌氧培养基(GAM)

0.15 g 巯基乙酸钠、0.15 g L-无水巯基丙氨酸盐酸盐、0.6 g 牛肉浸出粉、1.1 g 牛肉膏、1.25 g 磷酸二氢钾、1.5 g 大豆胨、1.5 g 葡萄糖、1.5 g 氯化钠、2.5 g 可溶性淀粉、2.5 g 酵母淀粉、5.0 g 蛋白胨、5.0 g 胰蛋白胨、6.15 g 消化血清、500 mL 纯水。

2 方法

2.1 黄连提取物的制备

称取黄连适量,加入 8 倍量水,浸泡 1 h,煎煮 30 min,滤过,滤渣继续用 6 倍量水煎煮 30 min,滤过,合并 2 次滤液,滤液减压浓缩至生药质量浓度 1.0 g/mL,备用。经检测黄连提取物中小檗碱、黄连碱、巴马汀的质量分数分别为 (123.92 ± 0.65) 、 (16.74 ± 2.58) 、 (16.09 ± 0.39) mg/g。

2.2 肠道菌群的培养

收集正常人新鲜粪便 5.0 g,与生理盐水按比例 1:4 比例混合,涡旋 2 min,制成混悬液,1 000 r/min 离心 10 min 后,得上清液,即为肠道菌液。将肠道菌液用无菌生理盐水连续稀释,吸取 0.1 mL 适当的稀释液分别接种在相应的选择性培养基平板上,均匀涂布,并在 37 °C 厌氧培养。分别进行肠球菌、肠杆菌、双歧杆菌和乳酸杆菌的选择性培养。将以上分离得到的各种细菌冷冻保存在 4 °C 冰箱,备用。取 0.1 mL 冷冻保存的健康人肠道菌液至 0.9 mL

GAM 中,37 °C 厌氧培养 24 h,将活化后的菌液涡旋混匀,采用无菌生理盐水稀释,调整菌液浓度为 1×10^7 个/mL,备用。

2.3 肠道细菌对黄连提取物的转化及转化液的处理

取 0.1 mL 肠道菌群稀释液,加入到 0.9 mL GAM 中,再加入 0.1 mL 适当质量浓度的黄连提取物,以 GAM 培养液为对照组,37 °C 厌氧培养 24 h 后,用 1.5 倍量的醋酸乙酯萃取,萃取液离心浓缩后,供 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.4 黄连提取物对 4 种细菌生长的影响

取 100 μ L(浓度为 1×10^7 个/mL)4 种肠道菌液(乳酸菌、双歧杆菌、肠杆菌、肠球菌)分别加入到 1.0 mL 含不同质量浓度(0.5、1.0、2.0 g/mL)黄连提取物的 GAM 培养液中,以不含药的菌悬液作为对照组,每组处理重复 3 份,37 °C 厌氧培养,600 nm 波长下测定其吸光度(A)值,直到细菌生长到达稳定期。

2.5 黄连提取物转化前后的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

2.5.1 UPLC 条件 色谱柱为 Acquity UPLC Synchronis C₁₈(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相 A 为乙腈, B 为 0.1%甲酸水溶液,梯度洗脱:0~3 min, 80%~75% A;3~4 min, 75%~70% A;4~6 min, 70%~55% A;6~10 min, 55%~20% A;10~11 min, 20% A;11~12 min, 20%~80% A。体积流量 0.4 mL/min;柱温 35 °C;进样器温度 4 °C;进样量 10 μ L;检测时间 12 min。

2.5.2 质谱条件 ESI 源;数据采集模式和方式: MSE 和 Centroid, 正离子模式;MS 参数: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, 脱溶剂气体流量 600 L/h, 锥孔气体流量 50 L/h;质量扫描范围 100~1 000 m/z ;采用 MetabolynxTM 软件进行数据分析。

3 结果

3.1 黄连提取物经肠道细菌代谢的 UPLC-MS 图谱分析

采用 UPLC-Q-TOF/MS 测定黄连提取物经肠道细菌的转化液,未转化及转化后黄连提取物的总离子流图见图 1,数据经 MetabolynxTM 软件分析后,肠道细菌对黄连提取物的代谢产物见表 1。通过比较孵育组和对照组总离子流图的保留时间(t_R)、相对分子质量及质谱断裂规律,结果表明,孵育组含有未完全代谢的原型小檗碱、黄连碱和经过肠道细菌代谢而形成的氢化小檗碱、氢化黄连碱,尤其是

大量的小檗碱发生了氢化作用；此外，去甲氧基作用有助于提高化合物的稳定性，如姜黄素去甲氧基、去二甲氧基后，稳定性依次增强，且 t_R 值依次是去二甲氧基姜黄素 < 去甲氧基姜黄素 < 姜黄素^[12-13]，故初步推测巴马汀经肠道细菌代谢为去甲氧基巴马汀（图 2）。

3.2 黄连提取物对肠道菌群生长的影响

采用浊度测定法观察不同质量浓度黄连提取物对 4 类肠道细菌（肠杆菌、肠球菌、乳酸菌、双歧

杆菌）生长的影响，结果显示，黄连提取物对病原菌如肠球菌和肠杆菌具有显著的抑制作用，且抑制作用随质量浓度升高而增强；对益生菌如双歧杆菌和乳酸菌具有显著的促进作用，且促进作用随质量浓度升高而增强（图 3）。

4 讨论

4.1 肠道菌群代谢作用影响中药药效

肠道细菌在生长过程中会产生水解酶、氧化还原酶、裂解酶、转移酶等多种多样的酶类，可进行

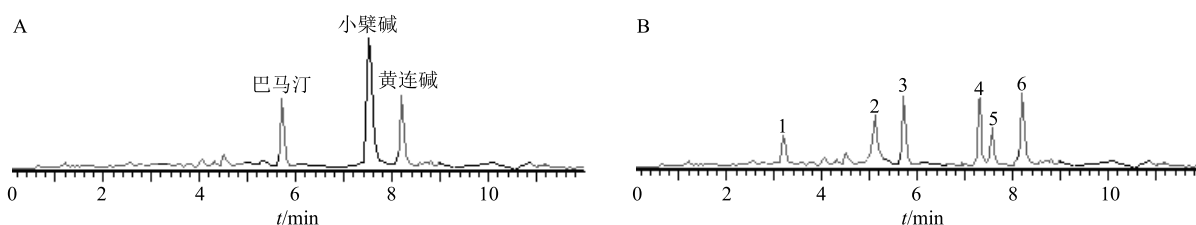


图 1 黄连提取物 (A) 及肠道菌群孵育后黄连提取物 (B) 的总离子流图

Fig. 1 UPLC/MS chromatograms of *Coptidis Rhizoma* extract sample (A) and *Coptidis Rhizoma* extract incubated with intestinal bacterial (B)

表 1 黄连提取物经人肠道菌群孵育的代谢产物

Table 1 Metabolites of *Rhizoma Coptidis* extracts by human gut microbiota

峰号	t_R/min	m/z ($[M+H]^+$)	代谢产物	MS/MS	分子式	离子化模式	离子峰相对值/%
1	3.18	232.131 5	去甲氧基巴马汀	232、229	$C_{19}H_{16}NO_2$	ESI ⁺	8.36
2	5.07	338.090 7	氢化小檗碱	338、336、306	$C_{20}H_{20}NO_4$	ESI ⁺	12.51
3	5.66	352.000 3	巴马汀	352、278、229	$C_{21}H_{22}NO_4$	ESI ⁺	21.62
4	7.40	324.001 2	氢化黄连碱	324、320、292	$C_{19}H_{18}NO_4$	ESI ⁺	23.19
5	7.57	336.032 5	小檗碱	336、306	$C_{20}H_{18}NO_4$	ESI ⁺	9.11
6	8.06	320.132 5	黄连碱	320、318、292	$C_{19}H_{14}NO_4$	ESI ⁺	25.21

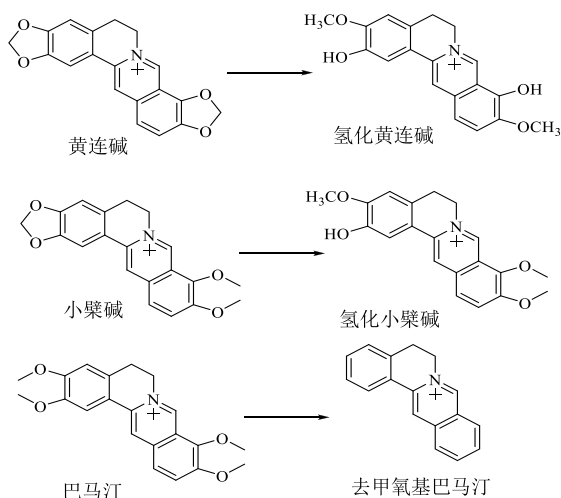


图 2 黄连提取物主要活性成分的肠道菌群代谢途径

Fig. 2 Metabolic pathways of major components in *Coptidis Rhizoma* by human gut microbiota

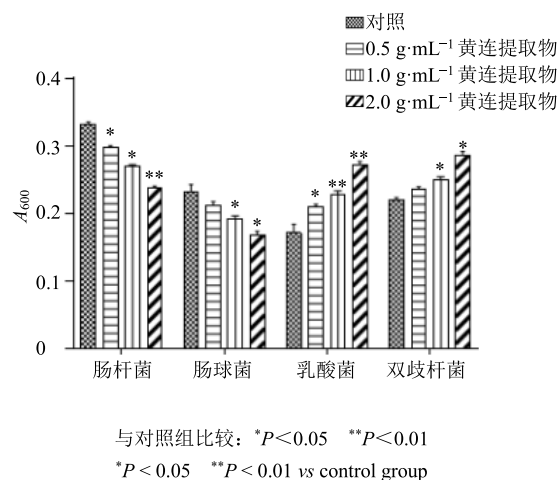


图 3 黄连提取物对 4 种肠道细菌生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effects of *Coptidis Rhizoma* extracts on growth of four intestinal bacteria ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

水解、还原、甲基化、乙酰化、脱糖基等一系列生化反应,从而显著影响中药各类成分的体内吸收及生物活性^[14]。如一些中药成分经肠道菌群代谢后形成前药而发挥效应,麦冬皂苷 D 被大鼠肠道菌群代谢为薯蓣皂苷元,从而易于吸收入血^[15];人参皂苷 Rg₃ 和 Rh₂ 通过肠道菌群的脱糖基作用,形成具有较强抗肿瘤活性的原人参二醇^[16-17]。目前胃肠道的首关效应已引起广泛重视,开展肠道菌群对中药成分的代谢研究,阐释其在体内的代谢过程,有助于揭示中药药效物质基础。

黄连的主要活性成分为小檗碱、黄连碱、巴马汀等生物碱类成分,但该类成分吸收差,血药浓度低,生物利用度低^[18-19]。本研究发现,黄连生物碱类成分可被肠道菌群代谢为氢化小檗碱、氢化黄连碱和去甲氧基巴马汀。小檗碱水溶性差,而其代谢产物氢化小檗碱的极性变大,脂水分配系数得以改善,易于吸收入血。朱志勇^[20]在大鼠 ig 小檗碱后的尿液中发现小檗碱氢化产物的硫酸结合型和葡萄糖醛酸结合型代谢产物,且另有研究表明小檗碱的氢化产物与小檗碱共同发挥药效^[21];黄连碱极难溶于水,大鼠 ig 黄连碱后的血液中发现氢化黄连碱,且在尿液中发现葡萄糖醛酸结合产物和硫酸酯化产物^[22-23],而氢化黄连碱具有调血脂、降血糖等作用^[24];巴马汀去甲氧基反应后,其代谢物可与巴马汀共同发挥药效^[25]。由此可见,肠道菌群的代谢作用对于黄连生物碱类成分的体内吸收及药效的发挥起着重要作用,但参与黄连代谢的特定细菌种类及其产生的酶系仍不清楚,因此后续研究将加强黄连生物碱类成分代谢过程中肠道细菌种群结构与功能的研究,阐明其代谢过程中何种细菌分泌何种酶参与哪些具体的代谢环节,从而有助于揭示肠道细菌转化黄连化学成分的机制。

4.2 肠道菌群可能成为中药发挥效应的作用靶点

肠道为肠道菌群提供了优越的栖息与繁殖的环境,满足其所需的各种生理条件,正常的肠道菌群对宿主的消化、吸收、营养、代谢、免疫调节、抗衰老、生物拮抗等方面具有积极的生理作用^[26]。近年来,越来越多的研究显示,人体肠道菌群紊乱与肥胖、2 型糖尿病等代谢性疾病密切相关^[27-29]。研究发现糖尿病患者体内产丁酸盐细菌丰度显著下降,而各种条件致病菌明显增加^[30]。益生菌的水平大幅降低,有害菌水平大幅提高,进而引发全身慢性低度炎症,巨噬细胞浸润进一步干预胰岛素信号

的正常转导,最终导致 2 型糖尿病及其并发症的发生发展。因此,基于肠道微生态研究将有助于揭示黄连干预糖尿病及其并发症的作用机制。本研究发现,黄连提取物可明显促进益生菌(乳酸菌、双歧杆菌)的生长,显著抑制病原菌的生长,且调控作用与剂量呈正相关性。已有研究表明,乳酸菌具有明显改善糖尿病模型大鼠的病理症状^[31-32]。而肠道病原菌过度繁殖,产生大量内毒素,使肠道通透性增加,导致肠源性内毒素血症,最终引起多脏器功能衰竭^[33-34]。由此可见,黄连具有调控肠道菌群结构^[35]、改善肠道微生态、促进肠道健康的功能,有望实现有效干预糖尿病及其并发症等慢性疾病的发生发展。

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 Metab*, 2012, 16(5): 559-564.
- [3] Sousa T, Paterson R, Moore V, *et al.* The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs [J]. *Int J Pharm*, 2008, 363(1/2): 1-25.
- [4] Possemiers S, Bolca S, Verstraete W, *et al.* The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals [J]. *Fitoterapia*, 2011, 82(1): 53-66.
- [5] Von Klitzing, Ekmekciu L, Kuhl A A, *et al.* Intestinal, extra-intestinal and systemic sequelae of *Toxoplasma gondii* induced acute ileitis in mice harboring a human gut microbiota [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0176144.
- [6] Hansen T H, Gobel R J, Hansen T, *et al.* The gut microbiome in cardio-metabolic health [J]. *Genom Med*, 2015, 7(1): 1-16.
- [7] Hartstra A V, Bouter K E, Backhed F, *et al.* Insights into the role of the microbiome in obesity and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2015, 38(1): 159-165.
- [8] Guo P, Wu C M. Gut microbiota brings a novel way to illuminate mechanisms of natural products *in vivo* [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(4): 300-306.
- [9] 郑礼胜, 邵文, 兰新新, 等. 基于肠道菌群新靶点的中药防治糖尿病研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(8): 1173-1181.
- [10] 张倩, 梁晓春. 黄连抗氧化作用与糖尿病的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(12): 2285-2288.

- [11] Wang Y, Shou J W, Li X Y, *et al.* Berberine-induced bioactive metabolites of the gut microbiota improve energy metabolism [J]. *Metabolism*, 2017(70): 72-84.
- [12] 赵欣, 王爱里, 袁园, 等. 姜黄中姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素的光稳定性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1338-1341.
- [13] 韩刚, 毕瑞, 全乐, 等. 去甲氧基姜黄素对姜黄素稳定作用的研究 [J]. 中药材, 2008, 31(4): 592-594.
- [14] 汤齐, 高霞, 耿婷, 等. 肠道菌群与中药相互作用的研究进展 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3629-3635.
- [15] 沈岚, 徐德生, 冯怡, 等. 大鼠肠内菌对麦冬皂苷 D 代谢的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 618-620.
- [16] Bae E A, Han M J, Choo M K, *et al.* Metabolism of 20 (S)- and 20 (R)-ginsenoside Rg₃ by human intestinal bacteria and its relation to *in vitro* biological activities [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25(1): 58-63.
- [17] Lee J, Lee E, Kim D H, *et al.* Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 122(1): 143-148.
- [18] 张文君, 宁浩, 周游, 等. 黄连与干姜配伍对黄连中 5 种生物碱的大鼠体内药动学影响 [J]. 中医药学报, 2015, 43(4): 15-19.
- [19] 李艺, 游雪甫, 蒋建东. 小檗碱的药动学研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(9): 733-738.
- [20] 朱志勇. 小檗碱在人及大鼠体内代谢产物的研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2002.
- [21] 曹阳, 刘雯清, 朴光春, 等. 原小檗碱类化合物的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(6): 1012-1016.
- [22] 赵园园, 苗培培, 苗青, 等. 6 种黄连生物碱对鼠肝微粒体 UGTs 及 UGT1A1 活性影响的体内外研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 309-313.
- [23] 李志慧, 薛宝娟, 张玉杰, 等. 5 种黄连生物碱大鼠体外肝代谢特征比较 [J]. 中草药, 2014, 45(4): 532-535.
- [24] 王冬梅, 魏金钊, 范宝妍, 等. 四氢黄连碱型季铵化化合物的合成及生物活性研究 [J]. 药学报, 2012, 47(12): 1640-1645.
- [25] 李丽. 吴茱萸碱、吴茱萸次碱和左旋四氢巴马亭在微生物和大鼠体内的代谢研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2005.
- [26] Rooks M G, Garrett W S. Gut microbiota, metabolites and host immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16(6): 341-352.
- [27] Negi S, Singh H, Mukhopadhyay A. Gut bacterial peptides with autoimmunity potential as environmental trigger for late onset complex diseases: In-silico study [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): e0180518.
- [28] Delzenne N M, Cani P D, Everard A, *et al.* Gut microorganisms as promising targets for the management of type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(10): 2206-227.
- [29] Korem T, Zeevi D, Suez J, *et al.* Growth dynamics of gut microbiota in health and disease inferred from single metagenomic samples [J]. *Science*, 2015, 349(6252): 1101-1106.
- [30] Qin J, Li Y, Cai Z, *et al.* A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes [J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 55-60.
- [31] Yun S I, Park H O, Kang J H. Effect of *Lactobacillus gasseri* BNR17 on blood glucose levels and body weight in a mouse model of type 2 diabetes [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107(5): 1681-1686.
- [32] Yadav H, Jain S, Sinha P R. Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats [J]. *J Dairy Res*, 2008, 75(2): 189-195.
- [33] Kim K A, Jeong J J, Yoo S Y, *et al.* Gut microbiota lipopolysaccharide accelerates inflamm-aging in mice [J]. *BMC Microbiol*, 2016, 16(1): 1-9.
- [34] Amyot J, Semache M, Ferdaoussi M, *et al.* Lipopolysaccharides impair insulin gene expression in isolated islets of Langerhans via toll-like receptor-4 and NF- κ B signaling [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e36200.
- [35] 顾宁宁, 张兴德, 郁红礼, 等. 基于 16 S rRNA 基因测序的黄连对 2 型糖尿病大鼠肠道微生物多样性影响研究 [J]. 中草药, 2017, 48(19): 3998-4004.