

火麻仁与人源肠道菌相互作用的初步研究

吴宿慧^{1,2}, 李寒冰^{1,2}, 吕 宁¹, 齐月娟¹, 李根林^{2*}, 刘世举^{3*}

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学 健康衰老研究实验室, 河南 郑州 450046

3. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450006

摘要: **目的** 探索传统润下药火麻仁 *Fructus Cannabis* 与人源肠道菌相互作用的特点。**方法** 运用高效液相色谱 (HPLC) 法对火麻仁水煎液中主要的不饱和脂肪酸亚油酸和亚麻酸进行含量测定, 采用固体与液体的体外厌氧培养方式, 结合 16 S rRNA 技术分析火麻仁水煎液对人源肠道菌生长情况的影响, 并采用 HPLC 法测定人源肠道菌对火麻仁水煎液中亚油酸与亚麻酸代谢的影响, 同时对可能出现的新产物共轭亚麻酸及共轭亚油酸进行测定。**结果** 火麻仁水煎液显著促进了变形菌门 *Proteobacteria* 的生长, 表现为大肠志贺杆菌 *Escherichia-shigella* 显著增多 ($P < 0.01$)、脆弱拟杆菌 *Bacteroides* 显著减少 ($P < 0.01$), 故拟杆菌门 *Bacteroidetes* 的生长受到了抑制, 而火麻仁水煎液中含有的不饱和脂肪酸亚油酸和亚麻酸经人源肠道菌代谢后含量均降低, 且有代谢产物共轭亚油酸和共轭亚麻酸的生成。**结论** 火麻仁水煎液与人源肠道菌相互作用明显, 药物能改变菌群结构, 菌群能代谢药物成分, 这种分析方法在一定程度上部分还原了药物口服途经肠道部位的物质代谢反应, 为阐明火麻仁在临床治疗中的物质基础提供了依据。

关键词: 火麻仁; 肠道菌群; 亚麻酸; 亚油酸; 共轭亚油酸; 共轭亚麻酸

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2019)05-1189-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.05.024

Interactions between *Cannabis Fructus* and human gut microflora

WU Su-hui^{1,2}, LI Han-bing^{1,2}, LV Ning¹, QI Yue-juan¹, LI Gen-lin², LIU Shi-ju³

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. The Key Laboratory of Healthy-Aging of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

3. Third Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450006, China

Abstract: Objective To explore the characteristics of the interactions between traditional laxative medicine *Cannabis Fructus* and human gut microflora. **Methods** HPLC method was used to determine the content of the main unsaturated fatty acids linoleic acid and linolenic acid in *Cannabis Fructus* Decoction. At the same time, solid culture and liquid culture *in vitro* anaerobic culture method were combined with 16 S rRNA technology to analyze the interactions between *Cannabis Fructus* Decoction and human gut microflora. Moreover, the metabolites of linoleic acid and linolenic acid in *Cannabis Fructus* Decoction by human intestinal microflora were determined using HPLC method. At the same time, the possible conjugated linolenic acid and linoleic acid were determined. **Results** *Cannabis Fructus* Decoction promoted the growth of *Proteobacteria* significantly, which showed that *Escherichia-shigella* was significantly increased ($P < 0.01$), but the growth of *Bacteroidetes* was decreased ($P < 0.01$), and the content of unsaturated fatty acids linoleic acid and linolenic acid in *Cannabis Fructus* Decoction were reduced after being incubated with human intestinal bacteria, and the metabolites were conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid. **Conclusion** The interactions between *Cannabis Fructus* Decoction and human intestinal microflora are obvious. The Chinese medicine can change the structure of the gut microflora, and the gut microflora can metabolize the drug components. This analysis method partially restores the pharmacokinetics process of the oral administration drug in the human intestinal tract. It could provide a new insight of the mechanism research of *Cannabis Fructus*.

Key words: *Cannabis Fructus*; gut microflora; linoleic acid; linolenic acid; conjugated linoleic acid; conjugated linolenic acid

收稿日期: 2018-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503363); 河南中医学院省属高校基本科研业务费专项计划 (2014KYYWF-QN06); 河南中医学院科技创新人才 (2015XCXRC02)

作者简介: 吴宿慧, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理学。Tel: (0371)65962746 E-mail: wusuhui@hactcm.edu.cn

*通信作者 李根林, 男, 硕士, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0371)65962746 E-mail: ligenlin@hactcm.edu.cn

刘世举, 男, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中医肛肠科。Tel: (0371)65962746 E-mail: liusj120@126.com

火麻仁 *Cannabis Fructus* 为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实,《神农本草经》中记载其“补中益气,肥健不老”,为传统的润下药,是临床中治疗虚性便秘的最常用中药。现代药理学研究表明其具有抗炎、抗衰老^[1-2]、降压、增强记忆力等作用,临床常用于便秘、高血压、慢性咽炎、肥胖等症的治疗^[3]。课题组前期研究发现火麻仁水煎液对便秘模型大鼠^[4]肠道菌群结构、短链脂肪酸(SCFAs)水平及结肠炎症均有一定的改善作用^[5],推测火麻仁与肠道菌群相互作用后,一方面促使体内毒素排出,改善肠道菌群失衡状态;另一方面某些成分被肠道菌代谢转化进而吸收后发挥药效。但火麻仁如何影响肠道菌群结构,肠道菌群又是如何对火麻仁中的有效成分进行代谢尚不明确。

本实验采用肠道菌群的体外厌氧培养方式,开展火麻仁水煎液与肠道菌群相互作用的体外研究,为阐明火麻仁的作用机制提供参考,也为进一步提高火麻仁的临床疗效提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂

肉汤培养基(批号 HB0384-1)、琼脂粉(批号 01-023),青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;对照品亚油酸(批号 116A023,质量分数≥98%,北京索莱宝科技有限公司);亚麻酸(批号 wkq16072204,质量分数≥98%,四川省维克奇生物科技有限公司);共轭亚油酸(批号 LAR-10-1823-90,质量分数≥98%,上海甄准生物科技有限公司);甲酸(色谱纯,Dikma 公司);甲醇(天津市四友精细化学品有限公司);乙腈(天津市科密欧化学试剂有限公司);超纯水(实验室自制)。

1.2 仪器

YQX-II 厌氧工作站(上海龙跃仪器设备有限公司,混合气体、氮气);D2012 微量台式高速离心机(北京莱博联泰科技有限公司);BS 1500 电子天平(上海友声衡器有限公司);150T 多功能粉碎机(铂欧五金厂);Easy Well ESM-I-30 自动双重纯水器(上海茸研生化仪器厂);质谱仪 [Xevo G2-XS Q-TOF/UPLC Acquity™ 系统,美国 Waters 公司,配有 Lock-spray 接口、ESI 离子源、MassLynx v4.1 质谱工作站和 Progenesis QI v2.1(内嵌 Ezinfo v3.0)软件];7890A 气相色谱仪、HP-5(30 m×0.32 mm,0.25 mm),Agilent 公司;Waters Acquity H-Class 超高效液相色谱仪(QSM 四元溶剂管理器,SM-FTN

样品管理器,PDA 检测器,Empower 色谱工作站)、Waters 2489 高效液相色谱仪,美国 Waters 公司;KJ.45-WZT-3 光电浊度计(北京卓川电子科技有限公司);GHG-9071A 电热鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司)。

1.3 药材

火麻仁药材购自安徽亳州中药材市场,原产地为甘肃,批号 20151201,经河南中医药大学陈随清教授鉴定为桑科植物大麻 *Cannabis sativa* L. 的干燥成熟果实,系《中国药典》2015 年版一部收载的正品。

2 方法

2.1 火麻仁水煎液的制备

称取 60.0 g 火麻仁(粉碎,过 4 号筛),加入 10 倍量的纯水浸泡 30 min,加热煮沸,沸腾后计时 30 min,滤过得滤液 1 和滤渣 1。取滤渣 1 加入 6 倍量的纯水煮 20 min,滤过得滤液 2 和滤渣 2。合并 2 次滤液(1、2),浓缩至 60 mL,得 1.0 g/mL 火麻仁水煎液。置于 70 °C 水浴锅中 30 min,瞬间转移至 4 °C 冰箱冷却(巴氏灭菌法),待用。

2.2 人源肠道菌悬液的制备^[6-8]

2.2.1 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)的制备 2.00 g NaCl、0.05 g KCl、0.36 g Na₂HPO₄、0.06 g KH₂PO₄,加入 200 mL 纯水,用盐酸调 pH=7.4,加水定容至 250 mL,121 °C 灭菌 20 min,保存于室温或 4 °C。

2.2.2 人源肠道菌悬液的制备 取 3 名健康男性(21~22 岁,无抽烟、喝酒经历,3 个月内无使用抗生素及药物经历)清晨第 1 次排出的新鲜粪便,无菌、厌氧环境下混合均匀后称量 0.1 g,加入 10 mL 的 0.1 mol/L PBS 中,混合均匀后得人源肠道菌悬液。

2.3 火麻仁含药固体培养基的制备及菌液处理

取 5.4 g 肉汤培养基,加入 5.4 g 琼脂,加入 300 mL 纯水溶解并灭菌制成肉汤培养基。取 15 mL 1.0 g/mL 火麻仁水煎液与 35 mL 的肉汤培养基混匀制得 0.300 g/mL 含药培养基;取 20 mL 0.300 g/mL 含药培养基与 20 mL 肉汤培养基混匀制得 0.150 g/mL 的含药培养基;取 20 mL 的 0.150 g/mL 含药培养基与 20 mL 肉汤培养基混匀制得 0.075 g/mL 含药培养基,摇匀待用。

实验设置对照组和 3 个给药组,每组 2 个平行。将已灭菌的培养皿放置于超净工作台内,倒入已灭菌的含药培养基,待培养基凝固后加入 100 μL 菌液,涂布器涂抹均匀即可。在无菌、厌氧条件下培

养 48 h, 观察结果, 判断菌群的生长情况。

2.4 火麻仁含药液体培养基的制备

称取 1.8 g 肉汤培养基, 加 100 mL 纯水, 在 121 °C 条件下灭菌 15 min 后, 按照表 1 进行分组及溶液配制。

2.5 宏基因测序分析火麻仁水煎液对菌群结构的影响

将各组溶液放置于无菌厌氧培养箱里培养 48 h 后, 取对照组与共孵育样品 1 各 3 个平行管在 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 保存沉淀进

行 16 S rRNA 宏基因测序分析菌群结构的变化, 此部分结果由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

2.6 HPLC-UV 测定火麻仁水煎液对肠道菌代谢轮廓的影响

2.6.1 色谱条件 Hypersil GOLD aQ C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸水溶液 (B); 体积流量 1 mg/mL; 进样体积 10 μL; 柱温 30 °C; 检测波长 203 nm; 亚油酸、亚麻酸测定流动相比比例为 75% (A)-25% (B), 共轭亚油酸的流动相比比例为 80% (A)-20% (B)。

表 1 火麻仁含药液体培养基的制备

Table 1 Preparation of liquid medium containing *Cannabis Fructus*

组别	火麻仁水煎液/mL	培养液/mL	人源菌悬液/mL	火麻仁质量浓度/(g·mL ⁻¹)
对照	0	2.80	0.20	0
火麻仁水煎液 1	0.50	2.50	0	0.17
火麻仁水煎液 2	0.25	2.75	0	0.08
火麻仁水煎液 3	0.10	2.90	0	0.03
共孵育样品 1	0.50	2.30	0.20	0.17
共孵育样品 2	0.25	2.55	0.20	0.08
共孵育样品 3	0.10	2.70	0.20	0.03

2.6.2 供试品溶液制备 取火麻仁水煎液 1~3 与共孵育样品 1~3 (表 1), 每组 2 个平行, 置于 5 mL 的蒸发皿内, -80 °C 冻存 24 h, 冷冻干燥机干燥。分别用少量甲醇溶解并定容至 2 mL, 1 300 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过后, HPLC 色谱法测定火麻仁水煎液与肠道菌共孵育前后成分的变化及可能的代谢产物。

2.6.3 对照品溶液的制备 精确称取对照品亚油酸、亚麻酸适量, 甲醇溶解定容后, 得到含亚油酸 2.855 mg/mL 和亚麻酸 3.045 mg/mL 的混合对照品溶液, 依次 2 倍稀释, 制得 8 个不同质量浓度的混合对照品溶液; 精确称取共轭亚油酸对照品适量, 少量甲醇溶解定容, 得到 8.077 5 mg/mL 的共轭亚油酸对照品溶液, 2 倍稀释, 制得 8 个不同质量浓度的对照品溶液。

2.6.4 方法学考察

(1) 精密度试验: 分别适量称取亚油酸、亚麻酸, 加甲醇溶解得亚油酸 44.6 μg/mL、亚麻酸 47.7 μg/mL 的混合对照品溶液, 同时精密称取共轭亚麻酸适量, 加甲醇溶解得 2.019 4 mg/mL 的共轭亚油酸对照品溶液, 上述对照品连续进样 6 次。测定其峰面积, 计算 RSD 值。

(2) 重复性试验: 采用共温孵法制备人源肠道

菌与火麻仁水煎液的代谢样本 6 份, 相同条件下测定其峰面积, 计算其亚油酸、亚麻酸、共轭亚油酸的含量并计算 RSD 值。

(3) 稳定性试验: 取人源肠道菌与火麻仁水煎液的代谢产物样品 1 分别在 0、2、4、8、12、24 h 下测定, 计算其亚油酸、亚麻酸、共轭亚油酸的含量及 RSD 值。

(4) 加样回收率试验: 取已测定的人源肠道菌与火麻仁水煎液的代谢产物样品 1 (166.7 mg/mL) 6 份, 精密称定后, 分别精密加入一定量 (相对于样品中含量) 的亚油酸、亚麻酸、共轭亚油酸对照品, 按照“2.6.1”项下色谱条件测定加样回收率, 并计算 RSD 值。

2.7 数据分析及统计方法

菌落结构多样性的宏基因测序及分析由上海美吉生物医药科技有限公司 I-Sanger 云平台 (www.i-sanger.com) 完成。两组间分析的统计方法采用独立样本 *t* 检验。

3 结果

3.1 火麻仁与肠道菌固体培养状态

从固体培养结果可以得出火麻仁水煎液 0.075~0.300 g/mL 可明显促进肠道菌生长, 菌落清晰可见, 无密集成堆 (图 1)。

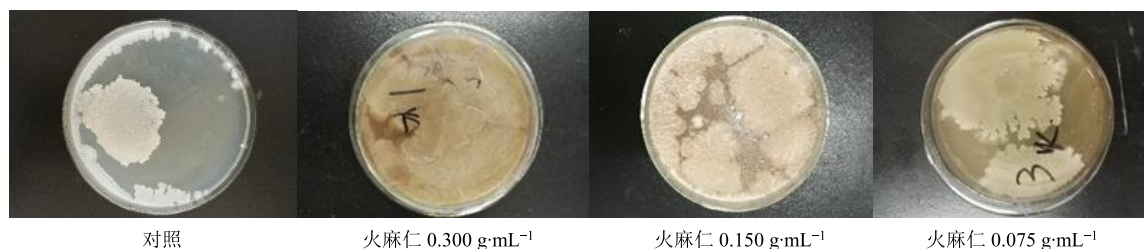


图 1 固体培养基中火麻仁水煎液对肠道菌生长状态的影响

Fig. 1 Effect of *Cannabis Fructus* Decoction on growth of gut microflora in solid medium

3.2 火麻仁对人源肠道菌菌群结构调整的宏基因组

操作分类单元 (operational taxonomic units, OTU) 是为了便于分析微生物群落而设定, 其中同一个分类单元设置为同一标志^[9]。火麻仁水煎液与人肠道菌共同孵育后, 对样本进行抽平后进行 OTU 表物种筛选和样本筛选。分析时选用相似水平为 97% 的 OUT, 结果表明全部数据共分为 6 个 OTU, 在 OTU 水平上, 肠道菌群的分类在种水平上的 α 多样性丰度指数如表 2 所示, 对捐赠者肠道菌群的多样性 (对照组: K_H_1~3) 与火麻仁水煎液共孵育 (共孵育样品 1 组: H_H_1~3) 后的多样性进行

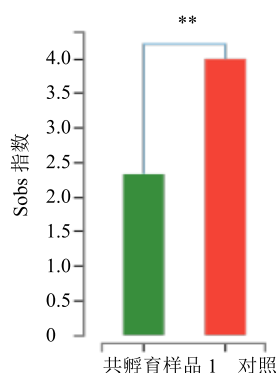
t 检验统计学分析, 结果表明两组之间有极显著性差异 ($P < 0.01$, 图 2)。

对肠道菌菌群结构的菌落组成分析中发现捐赠者粪便菌群结构中含有大量变形菌门 *Proteobacteria*, 约占 65%, 其次是拟杆菌门 *Bacteroidetes*, 约占 33%, 含量最少的是厚壁菌门 *Firmicutes*, 仅占 2%。火麻仁水煎液与肠道菌共孵育后, 变形菌门所占比例显著升高, 达到 99.28%, 而厚壁菌门和放线菌门 *Acitinobacteria* 仅占 0.72%。由此可知, 火麻仁水煎液显著促进了变形菌门的生长, 抑制了拟杆菌门的生长 (图 3)。

Beta 多样性表示的是微生物群落构成的比较,

表 2 火麻仁水煎液对人源肠道菌调节作用的 α 多样性指数Table 2 Diversity index of regulation effect of *Cannabis Fructus* Decoction on human gut microflora

组别	平行管号	Sobs 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	ace 指数	chao 指数	coverage 指数
对照	K_H_1	4	0.973 251	0.479 987	0	4	1
	K_H_2	4	0.985 278	0.472 352	0	4	1
	K_H_3	4	0.718 700	0.525 698	0	4	1
共孵育样品 1	H_H_3	2	0.042 606	0.985 740	0	2	1
	H_H_2	2	0.035 501	0.988 525	0	2	1
	H_H_1	3	0.138 157	0.940 696	4	4	1

图 2 火麻仁水煎液对人源肠道菌调节作用的 t 检验分析Fig. 2 T test analysis of regulatory effect of *Cannabis Fructus* Decoction on human gut microflora

评估微生物群落间的差异。比较的基本输出为一个距离矩阵, 表示群落中每 2 个样本间的差异。在 OTU 水平上, 火麻仁水煎液与肠道菌共孵育后菌群结构变化显著, 与对照组明显分为 2 类, 见图 4。当用一定颜色梯度表示物种所占比例的大小, 对样品进行 heatmap 聚类分析时可知, 对照组与共孵育样品 1 之间的差异很明显, 被聚为 2 类, 菌落组成与 Alpha 多样性分析一致, 见图 5。

根据得到的群落丰度数据, 运用严格的统计学方法对 2 组样本微生物群落中表现出的丰富度差异的物种进行组间差异显著性检验发现, 在门水平上, 与对照组比较, 火麻仁水煎液可使肠道菌群中变形菌门、拟杆菌门有极显著地变化 ($P < 0.01$); 而厚

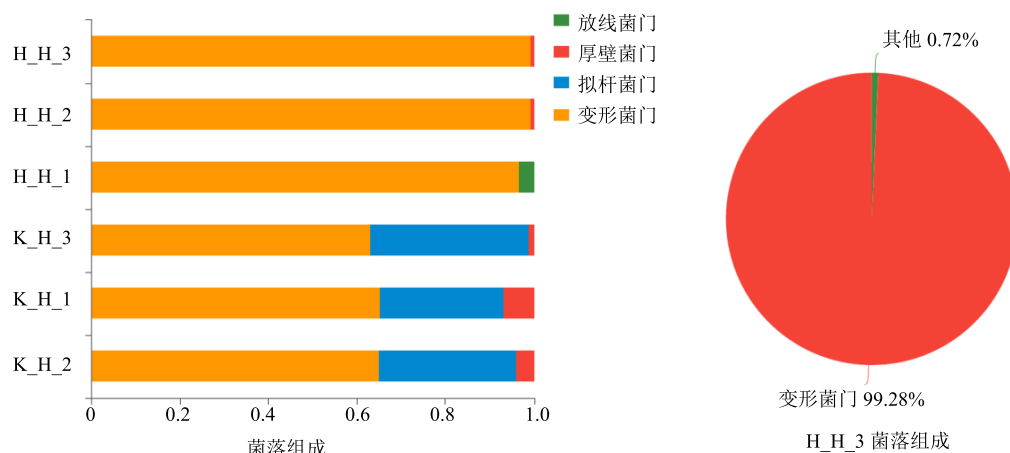


图 3 火麻仁水煎液对人源肠道菌调节作用的群落结构分析

Fig. 3 Community structure analysis of regulatory effect of *Cannabis Fructus* Decoction on human gut microflora

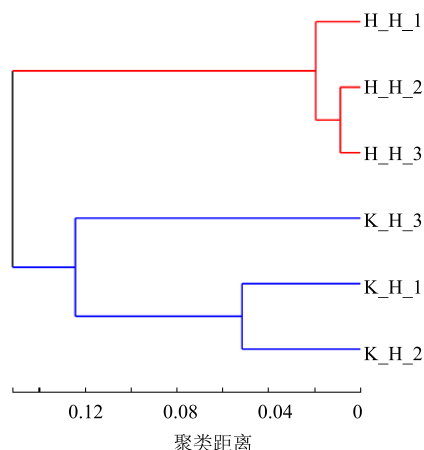


图 4 火麻仁水煎液对人源肠道菌调节作用的菌群结构聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of flora structure of *Cannabis Fructus* Decoction on regulation of human gut microflora

壁菌门和放线菌门无明显差异。在属水平上，与对照组比较，火麻仁水煎液可使肠道菌群中大肠志贺杆菌 *Escherichia shigella* 极显著增多 ($P < 0.01$)、脆弱拟杆菌 *Bacteroides* 极显著减少 ($P < 0.01$)，而芽孢杆菌 *Bacillus*、双歧杆菌 *Bifidobacterium* 无明显差异，见图 6。

3.3 肠道菌群对火麻仁水煎液中亚油酸、亚麻酸代谢的影响及代谢产物的测定

3.3.1 标准曲线及线性关系 亚油酸标准曲线为 $Y = 9 \times 10^6 X - 59\ 010$ ($r^2 = 0.999\ 7$)，在 $0.047\ 7 \sim 1.525\ 0$ mg/mL 线性良好；亚麻酸标准曲线为 $Y = 2 \times 10^7 X + 487\ 087$ ($r^2 = 0.998\ 0$)，在 $0.044\ 6 \sim 1.427\ 5$ mg/mL 线性良好；共轭亚油酸标准曲线为 $Y = 7 \times 10^6 X + 62\ 145$ ($r^2 = 0.999\ 6$)，在 $0.063\ 1 \sim 2.019\ 4$

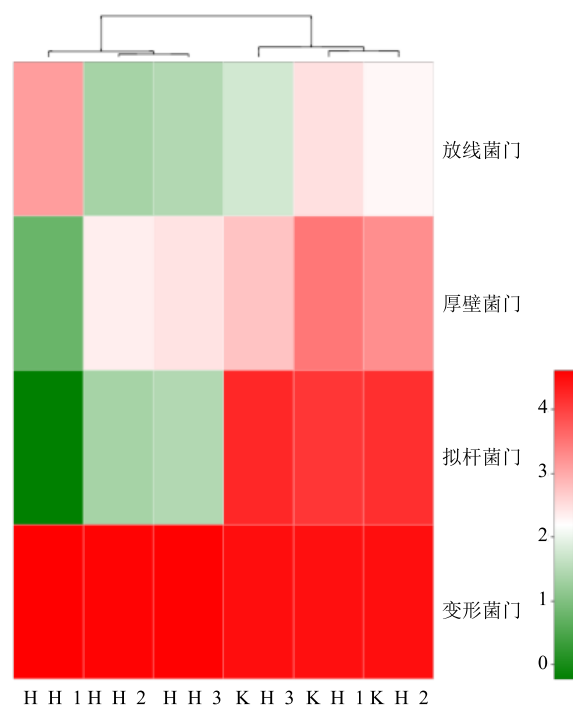


图 5 火麻仁水煎液对人源肠道菌调节作用的菌群结构 heatmap 图

Fig. 5 Heatmap diagram of flora structure of *Cannabis Fructus* Decoction on regulation of human gut microflora

mg/mL 线性良好，对照品的 HPLC 色谱图见图 7。

3.3.2 方法学考察

(1) 精密度试验：6 次进样后计算亚油酸、亚麻酸、共轭亚油酸的含量并计算 RSD 值分别为 3.28%、1.35%、0.87%，表明仪器精密度良好。

(2) 重复性试验：6 份样品中亚油酸、亚麻酸、共轭亚油酸 RSD 值分别为 2.82%、2.39%、0.11%，表明样品重复性良好。

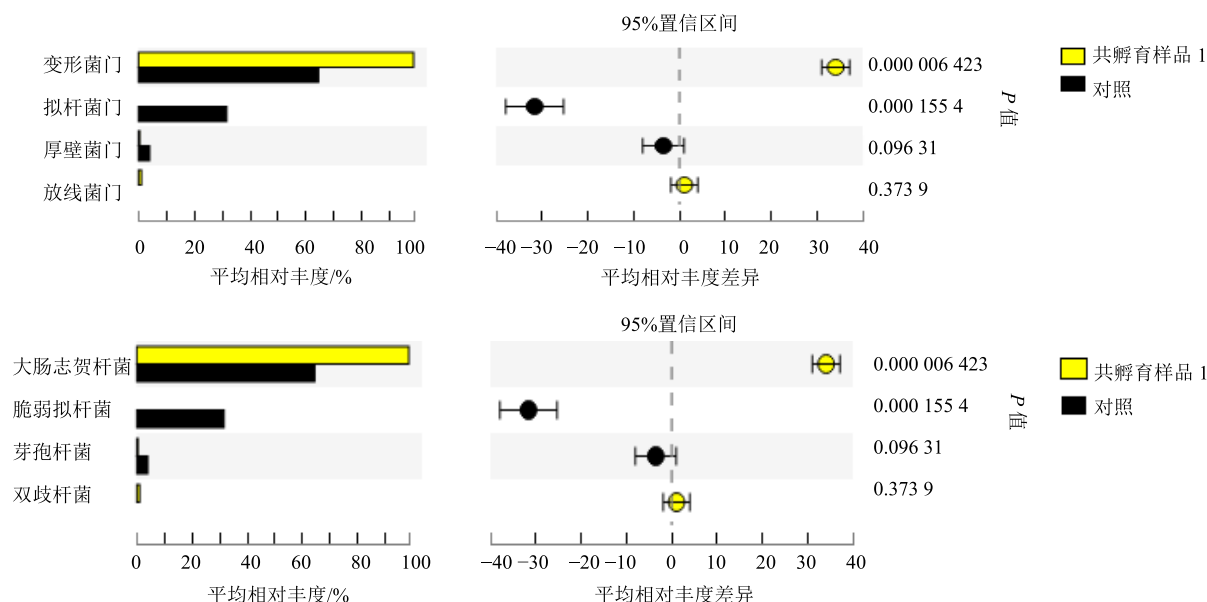


图 6 火麻仁水煎液对人源肠道菌调节作用的多物种差异检验

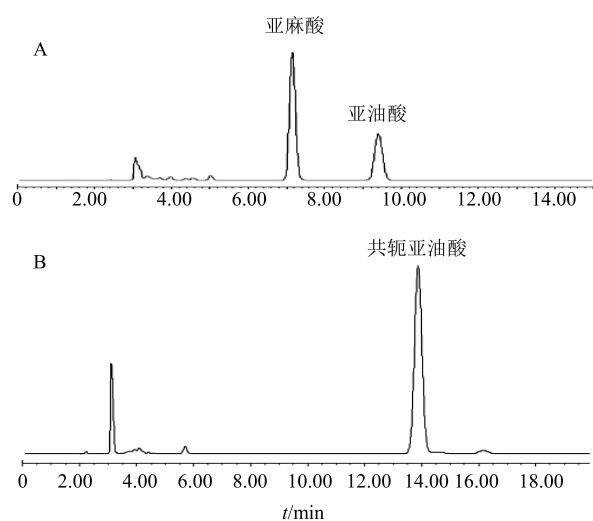
Fig. 6 Multi-species difference test of regulation of *Cannabis Fructus* Decoction on human gut microflora

图 7 对照品亚油酸、亚麻酸 (A) 和共轭亚油酸 (B) HPLC 色谱图

Fig. 7 HPLC chromatogram of reference product linoleic acid, linolenic acid (A), and conjugated linoleic acid (B)

(3) 稳定性试验: 亚油酸、亚麻酸、共轭亚麻酸 RSD 值分别为 1.78%、1.04%、1.07%, 表明样品在 0~24 h 内稳定性良好。

(4) 加样回收率试验: 亚油酸、亚麻酸、共轭亚麻酸 RSD 值分别为 3.08%、2.38%、3.24%。

3.3.3 火麻仁中亚油酸、亚麻酸的含量测定及与肠道菌群共温孵后共轭亚油酸的测定 检测结果表明, 火麻仁水煎液 1 中含亚麻酸 1.093 7 mg/mL、亚油酸 3.604 3 mg/mL; 火麻仁水煎液 2 中含亚麻酸

0.611 3 mg/mL、亚油酸 2.226 9 mg/mL; 火麻仁水煎液 3 中含亚麻酸 0.191 1 mg/mL、亚油酸 0.741 2 mg/mL; 火麻仁水煎液中均未检测出共轭亚油酸, 见图 8 和表 3。

与人源肠道菌共孵育后, 检测得共孵育样品 1 (0.166 7 g/mL) 中含亚麻酸 0.003 8 mg/mL, 亚油酸 0.070 5 mg/mL。而共孵育样品 2、3 中亚麻酸及亚油酸含量显著降低, 低于检测限而未能计算含量, 见表 3 和图 9。在共孵育样品 1 中检测到共轭亚油酸的质量浓度为 0.092 1 mg/mL, 共孵育样品 2、3 中未检出, 见表 3 和图 10。

3.3.4 火麻仁与肠道菌群共温孵后共轭亚麻酸的推测 由于共轭亚麻酸结构中大量的共轭键, 因此氧化稳定性非常差, 常温下数小时内很容易被氧化变质而难以测定, 本研究经 200~400 nm 全波长扫描发现, 火麻仁水煎液与人源肠道菌共温孵的培养液在 220 nm 附近有特征吸收峰 (图 11), 与文献报道^[10]共轭亚麻酸在 220~230 nm 处有特征吸收峰表述一致, 故推测火麻仁与人源肠道菌共温孵后有代谢物共轭亚麻酸的产生, 有待进一步确认。

4 讨论

本实验采用 HPLC 法检测发现火麻仁水煎液中含有亚油酸和亚麻酸, 其中亚油酸为 ω -6 多不饱和脂肪酸, 亚麻酸为 ω -3 多不饱和脂肪酸, 对人体有重要的生理功能, 如促进生长、抗心血管疾病等^[10]。研究表明亚油酸具有降低胆固醇、软化血管、预防

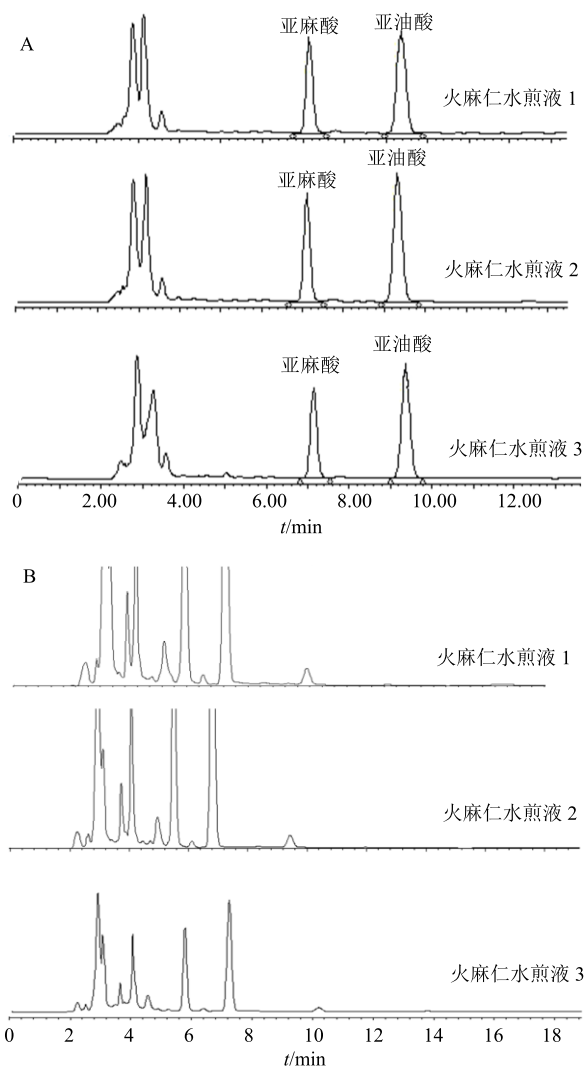


图 8 火麻仁水煎液中亚油酸、亚麻酸 (A) 和共轭亚油酸 (B) 的 HPLC 色谱图

Fig. 8 HPLC chromatogram of linoleic acid, linolenic acid (A), and conjugated linoleic acid (B) in *Cannabis Fructus* Decoction

表 3 火麻仁水煎液与人源肠道菌共孵育后亚油酸、亚麻酸及代谢产物共轭亚油酸含量

Table 3 Content of linoleic acid, linolenic acid, conjugated linoleic acid in *Cannabis Fructus* Decoction after metabolism by human gut microflora

样品	质量浓度/(mg·mL ⁻¹)		
	亚油酸	亚麻酸	共轭亚油酸
火麻仁水煎液 1	3.604 3	1.093 7	—
火麻仁水煎液 2	2.226 9	0.611 3	—
火麻仁水煎液 3	0.741 2	0.191 1	—
共孵育样品 1	0.070 5	0.003 8	0.092 1
共孵育样品 2	—	—	—
共孵育样品 3	—	—	—

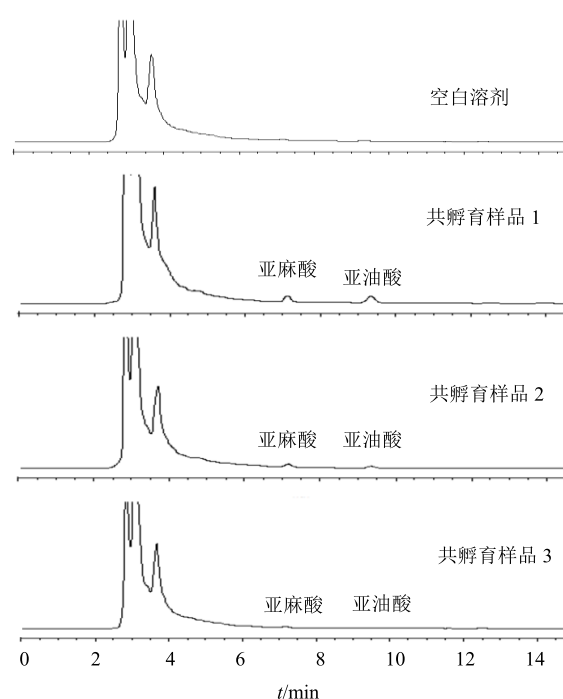


图 9 空白溶剂峰及共孵育样品 1~3 中亚油酸、亚麻酸的 HPLC 图

Fig. 9 HPLC chromatogram of blank solvent peak and linoleic acid and linolenic acid in samples 1—3

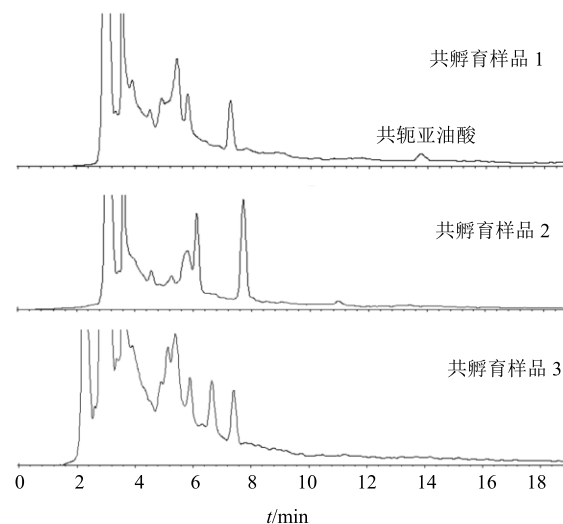


图 10 样品 1~3 中共轭亚油酸 HPLC 图

Fig. 10 HPLC chromatogram of conjugated linoleic acid in samples 1—3

癌症的产生、调节机体免疫、调节肠道菌群等作用，赵敏^[11]研究发现亚油酸可以降低血清中白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子的水平，改善大鼠关节炎症状，与本课题组前期研究结果一致^[12]。 α -亚麻酸具有调血脂、抗动脉粥样硬化、预防糖尿病、抗乳腺

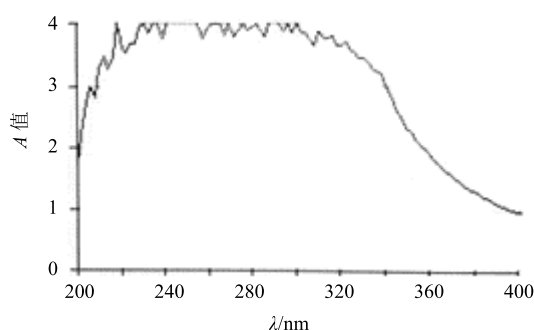


图 11 火麻仁与人源肠道菌共温孵后共轭亚麻酸的全波长扫描结果

Fig. 11 Full-wavelength scanning of conjugated linolenic acid after incubation of *Cannabis Fructus* Decoction with human gut microflora

癌[13]，张金铭等[14]研究发现 α -亚麻酸能使 I 相代谢酶 CYP7A1 mRNA 和蛋白的表达水平显著升高。亚油酸和亚麻酸在肠道菌群的作用下生成共轭亚麻酸和共轭亚油酸，更容易被机体吸收，从而发挥较强的药理作用。Druart 等[15]对 C57BL/6J 小鼠 iv 脂蛋白酶抑制剂，控制血液中脂肪酸的水平，然后 ig 给予亚油酸含量较高的红花籽油和亚麻酸含量较高的亚麻籽油，以研究肠道菌群对脂肪酸的作用，结果表明在肠道代谢产物中有大量的共轭亚油酸和共轭亚麻酸。

本实验通过固体培养的方式发现火麻仁水煎液 0.075~0.300 g/mL 可明显促进肠道菌生长。以 0.3 g/mL 的火麻仁水煎液与人源肠道菌采用液体共孵育的方式温孵 48 h，以 HPLC 法测定肠道菌代谢前后成分的变化，可以发现代谢产物中的亚麻酸、亚油酸含量均明显降低，代谢后的火麻仁高质量浓度组可以检测到少量共轭亚油酸的存在。另外对代谢产物在 200~400 nm 波长扫描可知，样品 1 中物质在 220~230 nm 处有共轭亚麻酸的特征吸收峰，因此推测其代谢产物中含有共轭亚麻酸[16]。研究表明共轭亚麻酸可以采用保加利亚乳杆菌 *Lactobacillus bulgaricus*（厚壁菌门）或双歧杆菌 *Bifidobacterium*（放线菌门）合成[17-19]，因此推测在体内可能也是这 2 个菌门将亚麻酸代谢生成共轭亚麻酸；而共轭亚油酸的合成主要依靠的是乳酸菌 *Lactobacillus*、双歧杆菌 *Bifidobacterium*、丁酸弧菌 *Butyrivibrio Bryant and Small*（拟杆菌门）、瘤胃菌 *Ruminococcus* sp.（厚壁菌门）、丙酸杆菌 *Propionibacterium*（放线菌门）[20-21]，推测共轭亚油酸的生成主要依靠的肠

道菌是放线菌门、拟杆菌门、厚壁菌门。在实验中发现火麻仁水煎液可以显著促进变形菌门的生长，而直接抑制拟杆菌门的生长，可以显著提高总菌数和杆菌比例。这可能是火麻仁水煎液与肠道菌群相互作用的条件之一。

综上，本实验采用火麻仁水煎液与肠道菌群共温孵的方法，对代谢物的定量分析中首次发现火麻仁水煎液中亚油酸在肠道菌群作用下生成共轭亚油酸及共轭亚麻酸；人肠道菌群对火麻仁的体外代谢及其分析方法在一定程度上部分还原了药物口服途经肠道部位的物质代谢反应，为火麻仁临床应用提供物质基础。肠道菌群是存在于“人-病-药体系”中传递物质及能量的微生态系统，这种整体研究方法与当今中医药精准医疗的观念异曲同工。火麻仁与肠道菌群相互作用后如何影响机体生理功能并发挥治疗作用将进一步研究。

参考文献

- [1] 吴宿慧, 郭媛媛, 张神涛, 等. 火麻仁油在家蚕抗衰老实验中的性别差异的研究 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 100-103.
- [2] 李寒冰, 孙静雅, 马永洁, 等. 火麻仁油及甾醇对家蚕寿命影响的观察 [J]. 中医学报, 2012, 27(9): 1145-1147.
- [3] 魏月媛, 李 理. 火麻仁的功效及食用安全性研究进展 [J]. 食品工业, 2015, 36(7): 256-260.
- [4] 李根林, 张颜语, 李寒冰. 复方地芬诺酯建立大鼠便秘模型及对肠道菌群的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(49): 7404-7410.
- [5] 李寒冰, 吴宿慧, 张颜语, 等. 基于肠道内环境调整的火麻仁润下作用的现代研究 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3334-3342.
- [6] 门 薇, 陈 颖, 杨 庆, 等. 不同配伍戊己丸的黄连生物碱在人源肠道菌群中的代谢研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(3): 417-421.
- [7] 熊万娜, 黄敏琪, 梁健钦, 等. 离体人肠道菌群对柚皮苷的代谢动力学分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(12): 69-71.
- [8] 黄慧学, 谭珍媛, 邓家刚, 等. 人肠道菌群对芒果苷体外代谢转化的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(4): 443-445.
- [9] 杨 展. 衰老肠道微生态的变化及干预措施研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [10] 孙翔宇, 高贵田, 段爱莉, 等. 多不饱和脂肪酸的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 418-423.
- [11] 赵 敏. 亚油酸及亚油酸甲酯的抗炎作用研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2012.

- [12] 李根林, 曹亚蕊, 吴宿慧, 等. 火麻仁油对衰老模型小鼠血脂水平及炎症、抗氧化相关指标的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 109-111.
- [13] Kim K, Nam Y A, Kim H S, *et al.* α -Linolenic acid: Nutraceutical, pharmacological and toxicological evaluation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, doi: 10.1016/j.fct.2014.05.009.
- [14] 张金铭, 张秀英, 郝丽红, 等. α -亚麻酸和花生四烯酸对 Nrf 2 和 I 相代谢酶 CYP7A1 表达的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2016(21): 1-4.
- [15] Druart C, Neyrinck A M, Vlaeminck B, *et al.* Role of the lower and upper intestine in the production and absorption of gut microbiota-derived PUFA metabolites [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87560.
- [16] 郜玉婷. 利用紫苏油生物合成共轭亚麻酸的研究 [D]. 大连: 大连工业大学, 2011.
- [17] 彭永健, 许新德, 张莉华, 等. 共轭亚麻酸的研究进展 [J]. 中国食品添加剂, 2015(1): 165-170.
- [18] Gorissen L, Raes K, Weckx S, *et al.* Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by *Bifidobacterium* species [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(6): 2257-2266.
- [19] Kazunori K, Imamura G, Akashoshi A, *et al.* Genetically modified rapeseed oil containing *cis*-9, *trans*-11, *cis*-13-octadecatrienoic acid affects body fat mass and lipid metabolism in mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(9): 3741-3748.
- [20] 王丽敏, 吕加平, 王 强. 微生物生产共轭亚油酸的研究进展 [J]. 中国乳品工业, 2005, 33(11): 38-41.
- [21] 王中太, 曹 健, 尹艳丽, 等. 共轭亚油酸的生物合成及相关酶基因的克隆与表达 [J]. 化学与生物工程, 2008, 25(4): 7-11.