

• 药理与临床 •

菊茎叶提取物改善肠功能失调的代谢组学研究

魏丹丹¹, 段金廛^{1*}, 宿树兰¹, 郭盛¹, 严辉¹, 钱大玮¹, 孙晓东², 朱文彬³

1. 南京中医药大学, 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 国家中医药管理局中药资源循环利用重点实验室, 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 江苏 南京 210023
2. 江苏鹤乡菊海现代农业产业园发展有限公司, 江苏 盐城 224335
3. 江苏省射阳县洋马镇农业技术推广服务中心, 江苏 盐城 224335

摘要:目的 整体评价菊茎叶水提取物(JST)和乙醇提取物(JCT)对肠功能失调的改善作用及其机制。方法 应用脂多糖(LPS)制备兔肠功能失调模型, 给予JST和JCT, 应用¹H-NMR技术研究兔粪便内源性代谢物变化规律。结果 相比对照组, 模型组乳酸盐、甲酸盐显著增加, 丙酸盐、谷氨酰胺、谷氨酸盐、天冬氨酸等显著下降; JST和JCT均能够增加天冬氨酸、腺嘌呤、苯丙氨酸、酪氨酸水平, 同时降低甲酸盐水平。结论 代谢通路分析表明JST和JCT通过调节LPS所致紊乱的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸盐代谢, 以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 发挥改善肠道功能紊乱的作用。

关键词: 菊; 茎叶; 代谢组学; 肠功能失调; 资源利用

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)13-3084-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.014

Extracts from stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* ameliorate gut dysfunction by a fecal metabolomic approach

WEI Dan-dan¹, DUAN Jin-ao¹, SU Shu-lan¹, GUO Sheng¹, YAN Hui¹, QIAN Da-wei¹, SUN Xiao-dong², ZHU Wen-bin³

1. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Key Laboratory of Chinese Medicinal Resources Recycling Utilization of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of TCM Formulae, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China
2. Jiangsu Hexiang Juhai Modern Agricultural Industrialization Co., Ltd., Yancheng 224335, China
3. Agricultural Technology Extension Service Center of Yangma Town, Sheyang County, Jiangsu Province, Yancheng 224335, China

Abstract: Objective To holistically evaluate the protective effects of water and ethanol extracts of stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* and its underlying mechanism. **Methods** Gut dysfunction model was established by injection of liposaccharide in rabbits, and administrated with water and ethanol extracts of stems and leaves of *C. morifolium* to investigate the treatment. Feces of rabbits in each group were collected and analyzed by ¹H-NMR complemented with multivariate statistical methods to evaluate the metabolic alteration. **Results** Compared with the control group, the levels of lactate and formate in liposaccharide intoxicated model group were significantly increased, and the concentrations of propionate, glutamine, glutamate, aspartate were notably decreased. Both the water and ethanol extracts of stems and leaves of *C. morifolium* ameliorated gut dysfunction of rabbits in a similar manner, increased the decreased levels of aspartate, adenine, phenylalanine, tyrosine induced by liposaccharide, and reduced the elevated content of formate. **Conclusion** Pathway analysis revealed that both the water and ethanol extracts of stems and leaves of *C. morifolium* could regulate the disturbed phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; disordered alanine, aspartate and

收稿日期: 2018-12-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81603273); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心资助项目(ZDXM-3-17); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(CARS-21)

作者简介: 魏丹丹(1986—), 女, 河南人, 助理研究员, 博士, 研究方向为中药资源化学与功效物质基础研究。E-mail: dandan19860502@163.com

*通信作者 段金廛, 博士生导师, 主要从事中药资源价值发现与循环利用研究。Tel: (025)85811116 E-mail: dja@njutcm.edu.cn

glutamate metabolism and imbalanced glycine, serine and threonine amino acid metabolism, exerting a holistic protective effect on gut disorder. Thus, this study lays a scientific foundation for the resource utilization of stems and leaves of *C. morifolium* after the harvest of the inflorescence.

Key words: *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; stems and leaves of *Chrysanthemum morifolium* Ramat.; metabolomics; gut dysfunction; resources utilization

菊花为菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序, 具有散风清热、平肝明目的功效, 用于治疗风热感冒、头痛眩晕、目赤肿痛、眼目昏花、疮痈肿毒等症。《神农本草经》将菊花列为上品, 现代研究亦证实菊花的低毒性, 适宜长期饮用^[1-2]。除了作为主要药用部位的花序外, 菊茎叶在历代本草中也有大量记载。《本草纲目》称菊“其苗可蔬, 叶可啜, 花可饴, 根实可药”; 《本草正义》称其“作枕明目, 叶亦明目”; 《本草乘雅半偈》称其“久服利血气, 轻身耐老延年。茎叶根实并同”。《食疗本草》称菊叶“主头风, 目眩, 泪出, 去烦热, 利五脏”; 《日华子本草》称其“明目。生熟并可食”。此外, 《中药大辞典》和《中华本草》记载菊叶味辛、甘, 性平, 具有清肝明目、解毒消肿的功效, 治疗疮、痈疽、头风、目眩。由此可见, 菊根、茎、叶等非药用部位和菊花序药用部位有类似的功效。

药用菊花在我国分布广泛, 类型多样, 根据产地的不同, 主要分为杭菊、贡菊、亳菊、滁菊、怀菊、济菊和祁菊等, 加上长期的相互引种栽培, 共形成 20 余种栽培类型^[3]。其中, 《中国药典》2015 年版收录了杭菊、贡菊、亳菊和滁菊。菊花的产量及市场需求量巨大: 其中江苏亭湖地区菊年产量为 14 850 t; 安徽亳州亳菊、黄山贡菊和滁菊年产量分别为 9 000、8 000、5 000 t^[4]。虽然菊茎叶产量巨大、蕴藏量丰富, 但由于化学成分及生物活性研究较少, 菊茎叶在菊种植过程中被当作生产垃圾处理, 造成巨大的浪费。而菊茎叶产量巨大, 远高于花序, 是一类蕴藏量十分丰富、亟待开发利用的资源, 本课题组对菊花及菊茎叶进行了大量前期研究, 表明菊茎叶和花具有共性物质基础, 即都含有大量黄酮类和酚酸类成分, 且菊叶中黄酮类和酚酸类成分含量略高于花^[5], 并得到新加坡国立大学相关研究的证实^[6]。如对菊的茎叶加以利用, 可能带来良好的经济、社会和生态效益, 尤其在当今资源逐渐短缺的前提下, 更应加强对药用菊花的非药用部位的资源化利用^[7-8]。

据本草记载, 菊“疗腰痛来去陶陶, 除肠中烦

热, 安肠胃, 利五脏, 调四肢”, 据此推测菊茎叶可用于调节肠功能紊乱。前期研究表明菊茎叶多糖能够改善 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS)/乙醇导致的大鼠结肠炎和硫酸葡聚糖 (DSS) 所致小鼠急性溃疡性结肠炎, 主要表现为菊茎叶多糖通过降低病原微生物如埃希氏杆菌属 *Escherichia*、肠球菌属 *Enterococcus* 细菌的相对丰度, 同时增加有益微生物如丁酸梭菌属 *Butyricicoccus*、梭菌属 *Clostridium* 和双歧杆菌属 *Bifidobacteriu* 等细菌等的相对丰度^[9]; 同时, 菊茎叶多糖能够增加结肠炎大鼠肠道内短链脂肪酸 (SCFAs) 的含量, 改善结肠炎动物肠道菌群的失衡, 恢复肠道菌群的代谢功能, 从而缓解和改善结肠炎的症状^[10]。此外, 菊茎叶含有丰富的叶绿素、纤维素、氨基酸和核苷酸类等营养成分, 可以作为动物的青储, 本课题组已经研究菊茎叶多糖对啮齿类动物肠道炎症的影响, 本研究在前期研究基础上选择非啮齿目草食性模式动物新西兰兔为研究对象, 拟从粪便代谢组角度揭示菊茎叶乙醇提取物和水提取物对非啮齿目草食性动物肠道功能的影响, 使得相关研究更为全面。据此, 采用核磁代谢组学技术研究菊茎叶提取物对脂多糖 (LPS) 所致兔肠道功能紊乱的改善作用, 为菊茎叶的资源化利用提供参考和依据。

1 材料

1.1 仪器

LABCONCO FreeZone 冷冻干燥机, 美国 LABCONCO 公司; 超纯水系统, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 核磁共振仪, 德国 Bruker 公司。

1.2 药材

菊茎叶样品产自白菊花主产区江苏射阳马镇, 由江苏鹤乡菊海现代农业产业园发展有限公司提供, 经南京中医药大学段金廛教授鉴定为菊属杭白菊栽培类型中的红心菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. hongxinju。

1.3 动物

清洁级雄性新西兰兔, 体质量 1.8~2.0 kg, 购于南京青龙山实验动物繁育场, 合格证号 SCXK

(苏) 2012-0004。饲养于人为控制的环境中[湿度(50±5)%, 温度(23±1)℃和亮/暗交替(12 h/12 h)]。本实验与美国国立卫生研究院以及南京中医药大学动物伦理委员会对实验动物照料和使用要求的指导方针一致。

1.4 试剂

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠, 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; LPS、三甲硅基丙酸盐(TSP)购自 Sigma 化学试剂有限公司; 重水(D₂O)购自北京海天生物医药科技公司。

2 方法

2.1 样品制备

菊茎叶适当粉碎, 投入提取罐中, 注入干药材质量 8 倍的 95% 工业乙醇回流提取 3 次, 每次 3 h, 合并提取液, 滤过, 减压回收乙醇, 浓缩至含生药量 10 g/mL, 即得菊茎叶乙醇提取物浸膏(JCT)。向醇提物后药渣中注入干药材质量 8 倍的水, 控制加热温度 98~102℃, 提取 3 h, 停止加热, 放出提取液, 滤过, 减压浓缩至含生药量 10 g/mL, 即得菊茎叶水提取物浸膏(JST)。

前期研究可知, 菊茎叶中脂溶性成分主要为黄酮类和酚酸类成分^[5], 水溶性成分主要为多糖类成分。分别以芦丁和绿原酸为对照品, 采用硝酸铝-亚硝酸钠比色法和福林-酚法测定 JCT 中总黄酮和总酚酸的含量, 可知 JCT 中总黄酮和总酚酸的质量分数分别为 34.52% 和 29.38%。分别以葡萄糖和葡萄糖醛酸为标准品, 采用苯酚-硫酸法和咔唑-硫酸法测定 JST 中中性多糖和酸性多糖的含量, 可知 JST 中中性多糖和酸性多糖的质量分数分别为 41.90% 和 36.26%。

2.2 动物分组及给药

取清洁级兔 40 只, 适应性饲养 1 周后随机分为 4 组: 对照组、模型组、JCT 组、JST 组, 每组 10 只。其中 JCT 和 JST 组分别 ig 给药, 生药剂量均为 20 mg/kg (参考菊花的临床剂量 5 g/d); 对照组和模型组 ig 空白溶剂(0.5%的 CMC-Na 溶液), 体积与给药组相同。每天 1 次, 连续给药 7 d。末次给药后 1 h, 除对照组外, 其余各组每只兔后脚掌肉垫下 sc 400 μg/mL 的 LPS 生理盐水悬液 0.5 mL^[11]。注射 LPS 后 24 h, 耳缘静脉 iv 2%利多卡因进行麻醉, 待其麻醉后剪去腹腔中线附近的毛, 酒精棉擦拭, 沿腹腔中线切开表面皮肤并逐层打开腹腔, 寻找兔大肠, 无菌条件下收集于无菌 EP 管中, 迅速保存

于-80℃冰箱中备用。

2.3 样品前处理

取各组动物粪便 1 g, 加入 5 mL 预冷的乙腈-水溶液(1:1), 研磨匀浆, 于 4℃以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 利用氮吹仪浓缩, 冷冻干燥仪冻干, 储存于-80℃以备分析。冻干的粪便提取物用 550 μL D₂O 配制的磷酸缓冲液(0.2 mol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.0)复溶。样品涡旋, 然后 4℃下 12 000 r/min 离心 10 min, 以除去不溶物。取上清液加入 50 μL D₂O 配制的 TSP 溶液(1 mg/mL), 涡旋混匀, 并转移至 5 mm 的核磁管内进行氢谱数据采集^[12-13]。

2.4 代谢组数据采集

所有图谱均由 Bruker AV 500 核磁共振仪进行采集, 采用 NOESYPR 脉冲序列进行图谱采集: 弛豫延迟-90°-t₁-90°-tm-90°-收集信号-自由感应衰减信号, 在循环延迟和 NOESY 混合时间采用噪声照射方式压制水峰。128 次的自由感应衰减信号生成 32 K 的数据点, 图谱的宽度是 10 kHz, 每次扫描的采集时间是 2.54 s, 循环延迟和混合时间(t_m)分别为 2 s 和 100 ms。应用 Topspin 3.0 软件对所有图谱进行自动的相位校正和基线校正, 并将 TSP 的信号校正至 0.00^[14-15]。

2.5 数据处理

去除水峰及其邻近信号(δ 4.30~5.45)后, 通过 R 语言编程的程序对所有的图谱进行位移校正。通过 PROcess 软件包, δ 0.70~9.40 的区域进行 binning 操作, 采用的自适应 binning 方法基于文献中在 Matlab (version 7.3, MathWorks, Natick, MA) 实现的代码。上述 binning 后的数据在进行多变量统计分析之前, 先用 R 软件进行 probabilistic quotient normalized、中心化和 pareto scaling 处理^[16]。

2.6 多变量统计分析

多变量统计分析方法采用 R 语言编程的无监督的主成分分析(PCA)和有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)。PCA 用来获取不同的代谢表型的总体概观以及去除离散度大的异常值, OPLS-DA 则用来减少组别假阳性分离的机率。OPLS-DA 将 X 矩阵(图谱数据)和 Y 矩阵(模型类别)相关的组别区分变量集中于第一主成分, 去除和 Y 矩阵正交的不相关的变量对模型的影响, 从而更有利于模型的解释。通过彩色编码的载荷图筛选显著改变的代谢物, 并进一步通过一个网络版代谢组学工具 Metaboanalyst (www.metaboanalyst.ca)

进行代谢通路分析。

2.7 代谢物识别

通过与参考文献比对,参阅相关数据库 Human Metabolome Database (HMDB, www.hmdb.ca),以及使用核磁数据指认软件 Chenomx NMR Suite, version 4.0 (Chenomx Inc., Edmonton, Canada),小分子代谢物得以归属。

3 结果

3.1 小分子代谢物归属

通过与参考文献比对,以及参阅相关数据库 HMDB、MMCD、KEGG 等,使用核磁数据指认软件 Chenomx NMR Suite,共从兔的粪便中鉴定了 36 个小分子代谢物。各组兔粪便的典型一维氢谱见图 1,鉴定的小分子代谢物见表 1。

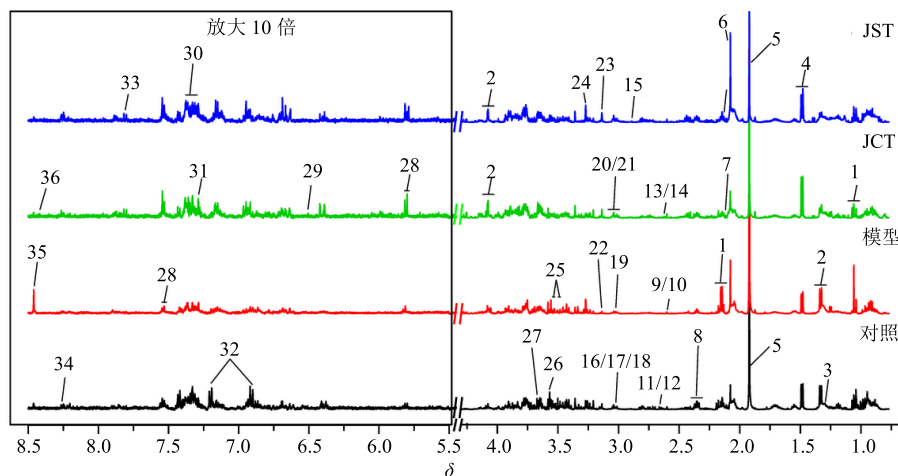


图 1 各组兔粪便的典型一维氢谱

Fig. 1 Typical ^1H -NMR spectra for feces of rabbits in each group

3.2 模型组兔粪便代谢物的变化

首先对粪便的核磁数据进行无监督的 PCA (图 2-A),结果表明所建立的 PCA 模型中第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)能够解释 65.18%的变量,表明该模型良好。同时,PCA 得分图中可以看出对照组与模型组存在部分交叉重叠,这可能是由于无监督的多变量分析方法无法滤除噪音及其他与分组无关的变量的影响。进一步采用有监督的 OPLS-DA 方法观察对照组和模型组是否能够分开,并寻找对组别分离有贡献的代谢物。从 OPLS-DA 得分图(图 2-B)可知,对照组和模型组能够完全分开,提示模型组发生严重的代谢紊乱。

应用彩色编码的载荷图筛选对分组有贡献的差异代谢物(图 2-C、D),其中变量的颜色代表相关系数的绝对值。从图中可以看出相比对照组,模型组兔粪便中增加的代谢物有乳酸盐、甲酸盐;同时伴随下降的有丙酸盐、谷氨酰胺、谷氨酸盐、天冬氨酸、三甲胺、酪氨酸、苯丙氨酸和腺嘌呤。

3.3 JCT 和 JST 组兔粪便代谢物的变化

首先分别对对照组、模型组、JCT 组和 JST 组的粪便的核磁数据分别进行 PCA 分析(图 3-A、

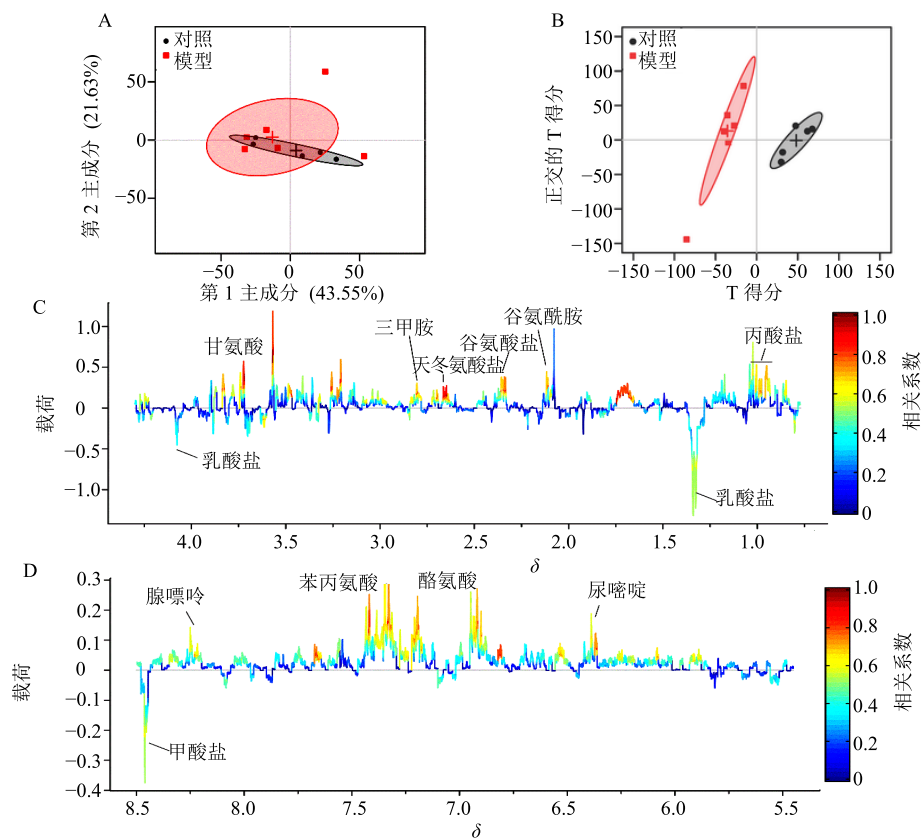
C),结果表明所建立 PCA 模型中 PC1 和 PC2 分别能够解释 52.20%和 54.93%的变量,表明该模型可以接受。同时,PCA 得分图中可以看出对照组、模型组重叠严重,2 个给药组 JCT 组和 JST 组与它们存在部分交叉,初步表明 JCT 组和 JST 组引起的代谢差异较大。进一步的 OPLS-DA 分析可以看出,对照组和模型组能够完全分开(图 3-B、D),而 JCT 组和 JST 组与对照组部分重叠并远离模型组。表明 JCT 组和 JST 组均具有不同程度的治疗作用,能够将 LPS 造成的严重的代谢紊乱向对照组方向转归,但同时由于 JCT 和 JST 自身也能够引起兔粪便内源性代谢物的差异,故在纠正由 LPS 引发的代谢紊乱的同时也可能“矫枉过正”。其中 JCT 组的重心与对照组重心在 T score 上的分量更近,而 JST 的重心则偏离对照组较远,表明 JST “矫枉过正”作用较 JCT 大。综合考虑对异常代谢的转归调节作用和副作用,提示 JCT 对 LPS 引起的代谢紊乱的治疗作用更佳。

为研究 JCT 及 JST 对 LPS 所致兔肠道功能紊乱的修复作用,分别单独对 JCT 组和模型组以及 JST 组和模型组进行分析。JCT 和模型组的 PCA 得分图

表 1 兔粪便中鉴定的小分子代谢物

Table 1 Small metabolites identified in feces of rabbits

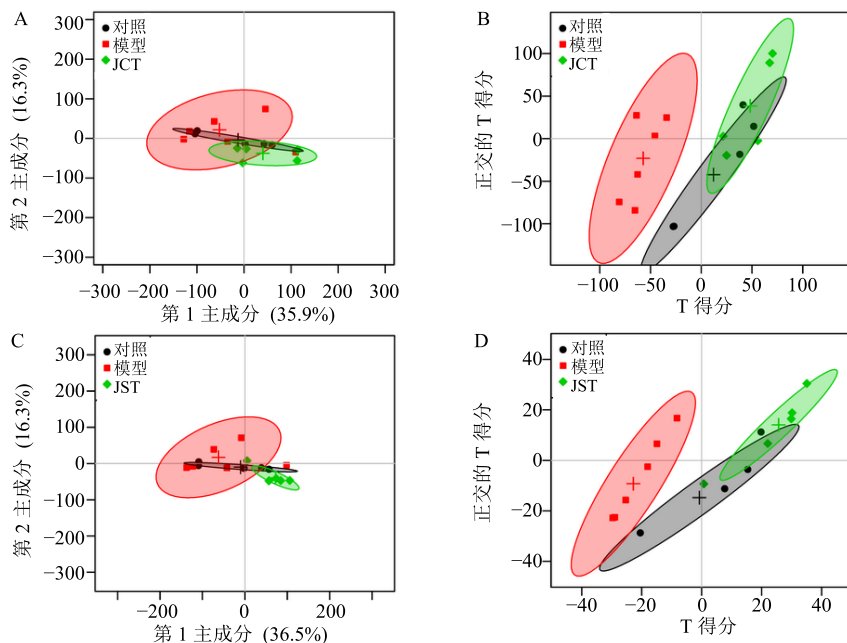
序号	小分子代谢物	归属	化学位移
1	丙酸盐 (propionate)	$\beta\text{CH}_3, \alpha\text{CH}_2$	1.04(t, $J = 7.68$ Hz), 2.17(q, $J = 7.68$ Hz)
2	乳酸盐 (lactate)	$\beta\text{CH}_3, \alpha\text{CH}$	1.34(d, $J = 7.00$ Hz), 4.11(q, $J = 7.00$ Hz)
3	苏氨酸 (threonine)	$\gamma\text{CH}_3, \beta\text{CH}, \alpha\text{CH}$	1.31(d, $J = 6.59$ Hz), 3.57(d, $J = 4.87$ Hz), 4.24(dq, $J = 6.59, 4.87$ Hz)
4	丙氨酸 (alanine)	$\beta\text{CH}_3, \alpha\text{CH}$	1.49(d, $J = 7.14$ Hz), 3.78(q, $J = 7.14$ Hz)
5	乙酸盐 (acetate)	CH_3	1.93(s)
6	<i>N</i> -乙酰半胱氨酸 (<i>N</i> -acetylcysteine, NAC)	$\text{COCH}_3, \text{CHNH}, \text{CH}_2\text{-SH}$	2.07(s), 2.90(m), 4.38(m)
7	谷氨酰胺 (glutamine)	$\beta\text{CH}_2, \gamma\text{CH}_2, \alpha\text{CH}$	2.16(m), 2.46(m), 3.77(t, $J = 6.18$ Hz)
8	谷氨酸盐 (glutamate)	$\beta\text{CH}_2, \gamma\text{CH}_2, \alpha\text{CH}$	2.04(m), 2.12(m), 2.34(m), 3.75(dd, $J = 7.19, 4.72$ Hz)
9	甲胺 (methylamine, MA)	CH_3	2.59(s)
10	3-甲基-2-酮丁酸盐 (3-methyl-2-oxobutanoic acid)	$\gamma\text{CH}_3, \beta\text{CH}$	1.11(s), 3.01(m)
11	肌氨酸 (sarcosine)	$\alpha\text{CH}_2, \text{CH}_3$	2.73(s), 3.60(s)
12	二甲胺 (dimethylamine, DMA)	CH_3	2.50(s)
13	天冬氨酸盐 (aspartate)	$\beta\text{CH}_2, \beta\text{CH}_2, \alpha\text{CH}$	2.66(dd, $J = 17.45, 8.85$ Hz), 2.80(dd, $J = 17.45, 3.72$ Hz), 3.89(dd, $J = 8.82, 3.75$ Hz)
14	甲硫氨酸 (methionine)	$\gamma\text{CH}_2, \text{S-CH}_3, \gamma\text{CH}_2, \delta\text{CH}_2, \text{CH-NH}_2$	2.16(m), 2.63(t, $J = 7.59$ Hz), 3.85(dd, $J = 7.10, 5.38$ Hz)
15	三甲胺 (trimethylamine, TMA)	<i>N</i> - CH_3	2.88(s)
16	肌酸 (creatine)	<i>N</i> - $\text{CH}_3, \alpha\text{CH}_2$	3.02(s), 3.92(s)
17	磷酸肌酸 (phosphocreatine, PC)	<i>N</i> - $\text{CH}_3, \alpha\text{CH}_2$	3.03(s), 3.94(s)
18	肌酐 (creatinine)	CH_3, CH_2	3.04(s), 4.05(s)
19	鸟氨酸 (ornithine)	$\gamma\text{CH}_2, \beta\text{CH}_2, \delta\text{CH}_2, \alpha\text{CH}$	1.74(m), 1.82(m), 1.93(m), 3.05(t, $J = 7.5$ Hz), 3.78(t, $J = 6.0$ Hz)
20	丙二酸盐 (malonate)	βCH_2	3.12(s)
21	乙醇胺 (ethanolamine)	$\text{CH}_2\text{-NH}_2, \text{CH}_2\text{-OH}$	3.14(t, $J = 5.21$ Hz), 3.81(t, $J = 5.29$ Hz)
22	甘油磷酸胆碱 (glycerophosphocholine, GPC)	<i>N</i> (CH_3) ₃ , <i>N</i> - CH_2 , <i>N</i> - CH_2 , OCH_2	3.20(s), 3.63(m), 3.90(m), 4.30(m)
23	三甲胺氮氧化物 (trimethylamine <i>N</i> -oxide, TMAO)	<i>N</i> - CH_3	3.26(s)
24	甲醇 (methanol)	CH_3	3.36(s)
25	肌醇 (myo-inositol)	CHOH	3.27(t, $J = 9.34$ Hz), 3.53(dd, $J = 9.98, 2.86$ Hz), 3.62(t, $J = 9.70$ Hz), 4.05(t, $J = 2.84$ Hz)
26	甘氨酸 (glycine)	CH_2	3.55(s)
27	二甲基甘氨酸 (dimethylglycine, DMG)	$\text{CH}_3, \alpha\text{CH}_2$	2.91(s), 3.71(s)
28	尿嘧啶 (uracil)	$\text{CH}=\text{CH}$	5.79(d, $J = 7.69$ Hz), 7.52(d, $J = 7.68$ Hz)
29	延胡索酸盐 (fumarate)	$\text{CH}=\text{CH}$	6.51(s)
30	苯丙氨酸 (phenylalanine)	$\text{CH}=\text{CH}, \text{CH}_2, \text{CH-NH}_2$	3.19(m), 3.99(dd, $J = 7.88, 5.31$ Hz), 7.34(d, $J = 6.96$ Hz), 7.38(m), 7.43(m)
31	苯乙酸 (phenylacetate)	$\beta\text{CH}, \text{CH}=\text{CH}$	3.53(s), 7.29(m), 7.36(m)
32	酪氨酸 (tyrosine)	$\text{CH}_2, \text{NH}_2\text{CH}, \text{CH}$	3.04(dd, $J = 15.00, 7.80$ Hz), 3.17(dd, $J = 15.00, 5.40$ Hz), 3.92(dd, $J = 7.80, 5.40$ Hz), 6.89(m), 7.19(m)
33	对氨基马尿酸盐 (aminohippurate)	$\alpha\text{CH}_2, \text{CH}=\text{CH}$	3.92(d, $J = 5.82$ Hz), 6.86(d, $J = 8.65$ Hz), 7.67(d, $J = 8.68$ Hz)
34	腺嘌呤 (adenine)	$\text{NH-CH}=\text{N}, \text{N}=\text{CH-NH}$	8.17(s), 8.21(s)
35	甲酸盐 (formate)	H-COOH	8.44(s)
36	烟酸盐 (nicotinate)	$\text{CH}=\text{CH}$	7.51(dd, $J = 7.94, 4.96$ Hz), 8.24(m), 8.60(dd, $J = 4.98, 1.82$ Hz), 8.93(d, $J = 2.17$ Hz)



A-PCA 得分图 B-OPLS-DA 得分图 C、D-OPLS-DA 得分载荷图
A-score plot of PCA analysis B-score plot of OPLS-DA analysis C, D-loading plot of OPLS-DA analysis

图 2 对照组及模型组兔粪便核磁代谢组多变量统计分析

Fig. 2 Multivariate analysis of ^1H -NMR data in feces for control and model group



A、C-PCA 得分图 B、D-OPLS-DA 得分图

A, C-score plot of PCA analysis B, D-score plot of OPLS-DA analysis

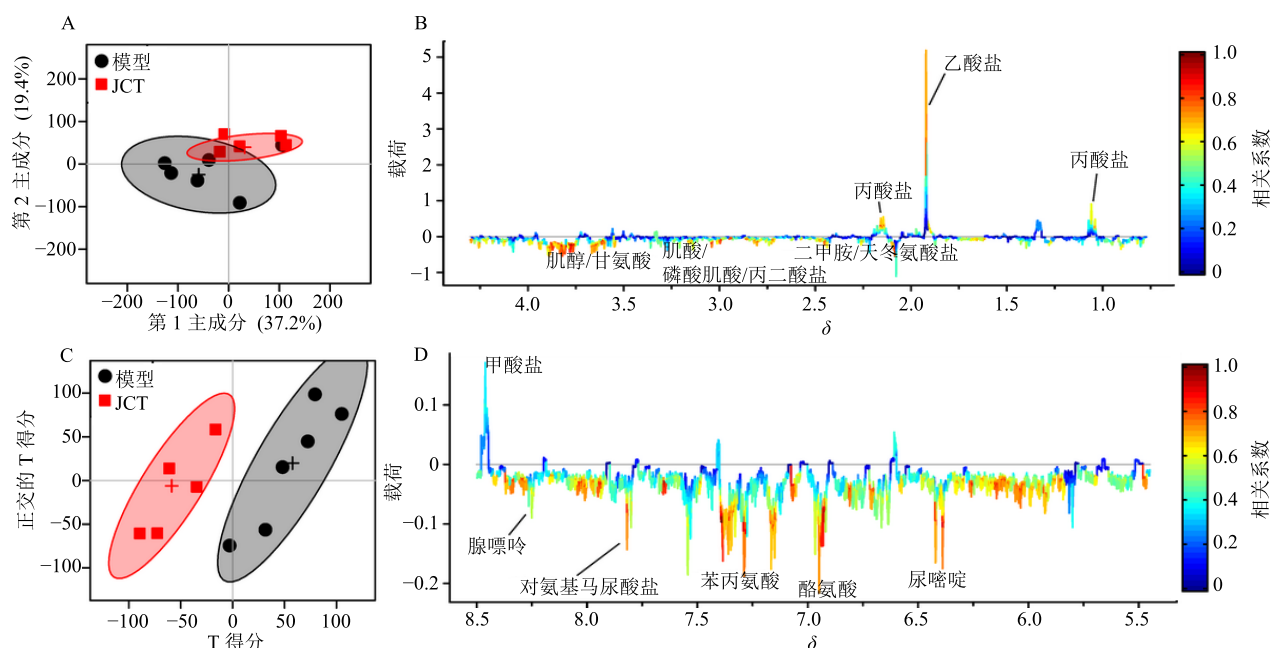
图 3 对照组、模型组及给药组兔粪便核磁代谢组多变量分析

Fig. 3 Multivariate analysis of ^1H -NMR data in feces of rabbits in each group

(图 4-A)可以看出, 2 个组有部分重叠; 而 OPLS-DA 得分图 (图 4-C) 中 2 个组基本可以分开, 其中 JCT 位于负区, 模型组位于正区。结合 OPLS-DA 载荷图 (图 4-B、D) 可知, 相比模型组, JCT 组兔粪便中显著增加了甘氨酸、磷酸肌醇、肌酸、磷酸肌酸 (PC)、

丙二酸盐、二甲胺 (DMA)、天冬氨酸、对氨基马尿酸盐、腺嘌呤、苯丙氨酸、酪氨酸, 同时伴随显著下降的丙酸盐、乙酸盐和甲酸盐。

按照上述思路对 JST 组和模型组进行分析, 从 JST 组和模型组的 PCA 得分图 (图 5-A) 可以看出,



A-PCA 得分图 C-OPLS-DA 得分图 B、D-OPLS-DA 得分载荷图, 图 5 同

A-score plot of PCA analysis C-score plot of OPLS-DA analysis B, D-loading plots of OPLS-DA analysis, same as figure 5

图 4 模型组及 JCT 组兔粪便核磁代谢组多变量分析

Fig. 4 Multivariate analysis of ^1H NMR data in feces of rabbits in model group and JCT group

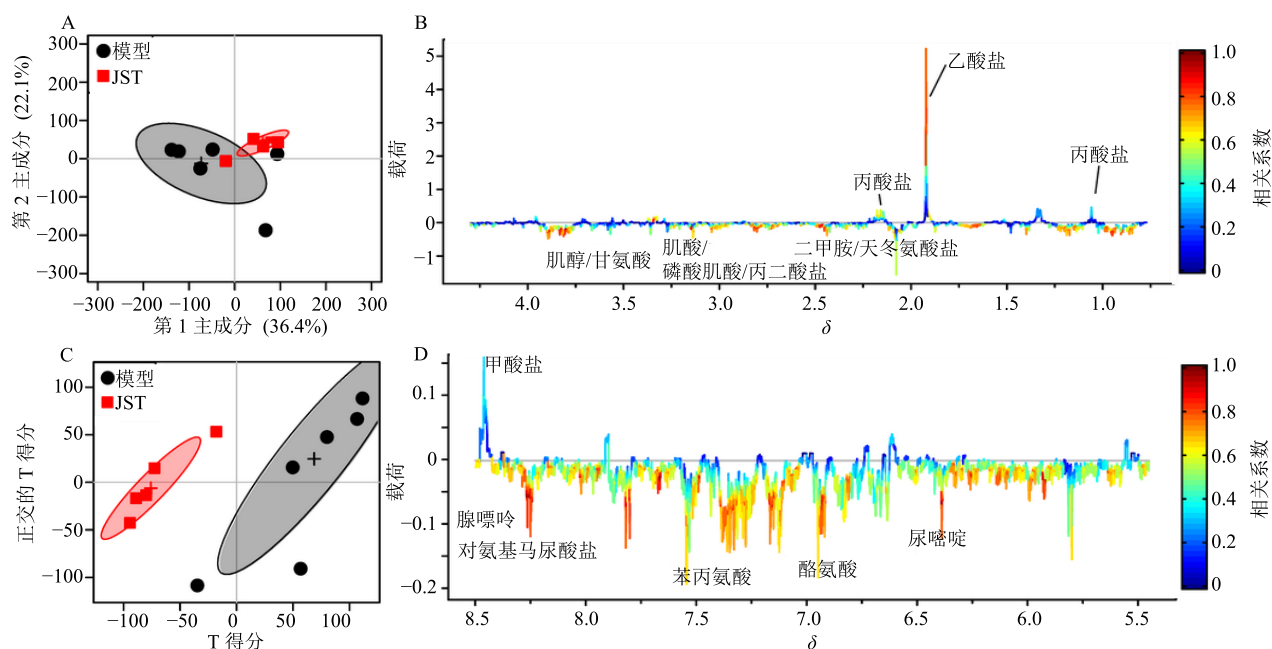


图 5 模型组及 JST 组兔粪便核磁代谢组多变量分析

Fig. 5 Multivariate analysis of ^1H NMR data in feces of rabbits in model group and JST group

2 个组有较少一部分发生重叠;而 OPLS-DA 得分图(图 5-C)中 2 个组基本可以完全分开,其中 JST 组位于负区,模型组位于正区。结合 OPLS-DA 载荷图(图 5-B、D)可知,相比模型组,JST 组兔粪便中显著增加了甘氨酸、磷酸肌醇、肌酸、磷酸肌酸(PC)、丙二酸盐、二甲胺(DMA)、天冬氨酸、对氨基马尿酸盐、腺嘌呤、苯丙氨酸、酪氨酸,同时伴随显著下降的丙酸盐、乙酸盐和甲酸盐。

通过对比 JCT 组和模型组,以及 JST 组和模型组显著改变的差异代谢物可知,无论 JCT 或 JST,其改善兔紊乱的肠道代谢的方式是类似的,即都能够增加模型组中下降了的天冬氨酸、腺嘌呤、苯丙氨酸、酪氨酸,同时降低模型组中升高了的甲酸盐。

3.4 代谢通路分析

通过相关文献挖掘以及查询京都代谢通路数据库(KEGG pathway database)、人类反应数据库(Reactome database),将对照组和模型组,以及 JCT 组/JST 组和模型组兔显著改变的差异代谢物进行代谢通路分析,应用拓扑学计算各关键代谢物在相关

通路中出现的概率,得到各通路的影响力(pathway impact),并进行显著性 P 检验和 false discovery rate(FDR) 检验。其结果以气泡图形式显示(图 6),其中气泡面积的大小和通路影响力呈正比,气泡颜色对应通路的显著性(从红色代表显著性最大到白色代表显著性最小)^[13,17]。

结果表明与对照组相比,模型组兔改变的代谢物主要富集在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,谷氨酰胺和谷氨酸盐代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸盐代谢,苯丙氨酸代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(图 6-A)。相比模型组,JCT 组和 JST 组显著改变的代谢通路包括苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,苯丙氨酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸盐代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(图 6-B)。由此可以,JCT 组/JST 组通过调节 LPS 所致的紊乱的苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸盐代谢,以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,使其恢复正常,从而发挥改善 LPS 所致肠道功能紊乱的作用。

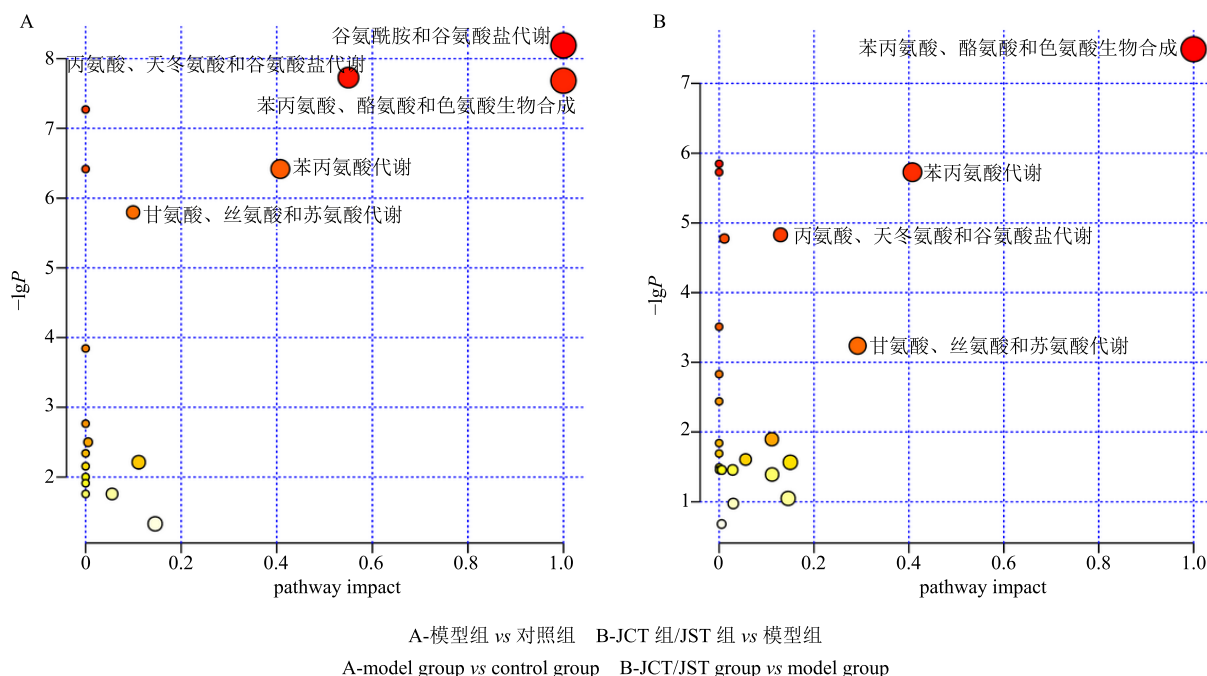


图 6 兔显著改变的差异代谢物构成的代谢通路气泡图分析

Fig. 6 Bubble plots of disturbed metabolic pathways induced by liposaccharide (A) and effects of water and ethanol extracts (JST/JCT) of stems and leaves of *C. morifolium* on interrelationship of identified metabolic pathways (B)

4 讨论

肠道微生物被称为人类的“第二基因组”,其结构、组成和状态与宿主健康息息相关,研究表明肠道微生物参与营养吸收、物质代谢、免疫防御等重

要生理过程以及与多种疾病的发生有关联^[18]。肠道粪便作为宿主与微生物共代谢的超级生态系统,其内源性代谢产物通过参与氨基酸代谢、短链脂肪酸代谢等影响宿主的病理、生理状态。

4.1 氨基酸代谢

模型组兔粪便中出现显著的氨基酸代谢紊乱,表现为天冬氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸盐显著下降;JCT 和 JST 组能够部分缓解上述紊乱的氨基酸代谢,即能够明显增加兔粪便中天冬氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸的含量。代谢通路分析表明,菊茎叶提取物主要通过调节苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸盐代谢,以及甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,从而发挥改善 LPS 所致肠道功能紊乱的作用。研究表明,肠道中特定的细菌如生孢梭菌 *Clostridium sporogenes* 能够通过分解色氨酸,分泌代谢产物吲哚丙酸等代谢产物进入血液,与宿主的免疫系统互作,从而影响宿主肠道健康和免疫系统;除了色氨酸外,其他芳香氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸也参与上述微生物的代谢过程^[19]。本研究中模型组氨基酸代谢紊乱,及菊茎叶提取物组对其的转归作用可能同样通过调节肠道中生孢梭菌的数量及其代谢发挥作用。

4.2 SCFAs 代谢

SCFAs 是宿主肠道菌的发酵产物,主要包括甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、戊酸等,由糖类、蛋白质、多肽等营养物质在结肠的厌氧环境下部分氧化而产生^[20]。研究表明,SCFAs 通过小肠上皮细胞表达的 GPR41、GPR43 和 GPR109a 等信号分子激活蛋白激酶、磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3K)、细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2),进一步活化转录因子 ATF2,而这一信号通路对与关键免疫及炎症介质如白细胞介素 (IL-1)、IL-6,肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等的表达至关重要,因此 SCFAs 在调节肠道炎症方面具有抗炎活性^[20]。模型组兔粪便中丙酸盐显著下降,提示 LPS 引发兔剧烈的全身炎症反应,大量的丙酸盐转运入血或其他组织器官发挥抗炎活性,这体现机体的自我调节和自我修复作用;而模型组兔粪便中显著增加的甲酸盐,提示 LPS 损伤机体免疫系统,导致甲酸盐无法很好地被组织吸收利用,从而直接从粪便排泄。给予菊茎叶提取物 JCT 和 JST 后,兔粪便中丙酸盐、乙酸盐和甲酸盐均显著下降,可能提示更多的 SCFAs 分子被机体招募并吸收利用发挥抗炎活性。

4.3 能量代谢

相比对照组,模型组兔粪便中乳酸盐和甲酸盐含量显著增加,表明模型组兔出现能量短缺,增加

的乳酸盐表明机体的供能方式已经由高效的有氧呼吸转向低效的无氧呼吸,同时机体大量增加的乳酸和甲酸盐表明动物可能发生酸中毒。甲酸盐的大量增加同时提示线粒体电子传递链、能量生成受阻以及机体 ATP 发生短缺。给予 JCT 后,兔粪便中甲酸盐、乙酸盐、丙酸盐含量显著下降,表明机体酸中毒得到有效地缓解;同时粪便中肌酸和磷酸肌酸含量显著增加,提示磷酸肌酸被动员招募转移磷酸基以促使 ADP 转化为 ATP,从而改善机体能量代谢障碍。

作为一味常用的大宗药材,菊花在我国的种植面积和年产量巨大,由于长期缺乏有效地合理利用,菊茎叶资源浪费严重。本研究团队长期致力于中药资源采收、加工及工业化过程中非药用部位及副产物的资源价值利用研究,已经对丹参茎叶^[21-22]、黄蜀葵茎叶^[23]、瓜蒌瓢、黄芪花^[24]等传统非药用部位及黄蜀葵花药渣^[25]、五味子药渣^[26]、丹红注射液废弃物^[27]等开展了一系列资源价值发现研究,为中药资源循环利用理论体系建立及其产业化利用提供了思路和借鉴。鉴于菊茎叶提取物可以从多个途径改善 LPS 引起的食草动物肠道功能紊乱,加上菊茎叶具有作为青储饲料的潜质,故可以考虑将菊茎叶资源作为功能性饲料添加剂或替代抗生素对抗病原菌感染。

参考文献

- [1] Li L, Gu L, Chen Z, et al. Toxicity study of ethanolic extract of *Chrysanthemum morifolium* in rats [J]. *J Food Sci*, 2010, 75(6): 105-109.
- [2] Liu Y, Wang Z, Zhang J. *Dietary Chinese Herbs* [M]. Vienna: Springer, 2015.
- [3] 常相伟,魏丹丹,陈栋杰,等.药用与茶用菊花资源形成源流与发展变化 [J]. *中国现代中药*, 2019, 21(1): 116-123.
- [4] 魏丹丹,常相伟,郭盛,等.菊花及菊资源开发利用及资源价值发现策略 [J]. *中国现代中药*, 2019, 21(1): 37-44.
- [5] 朱琳,郭建明,杨念云,等.菊非药用部位化学成分分布及其动态积累研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(3): 425-431.
- [6] Lai J P, Lim Y H, Su J, et al. Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 848(2): 215-225.
- [7] 段金彪,张伯礼,宿树兰,等.基于循环经济理论的中草药资源循环利用策略与模式探讨 [J]. *中草药*, 2015,

- 46(12): 1715-1722.
- [8] 段金廛, 宿树兰, 郭 盛, 等. 中药资源化学研究与资源循环利用途径及目标任务 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3395-3401.
- [9] Tao J H, Duan J A, Jiang S, *et al.* Polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* Ramat ameliorate colitis rats by modulating the intestinal microbiota community [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(46): 80790-80803.
- [10] Tao J H, Duan J A, Jiang S, *et al.* Simultaneous determination of six short-chain fatty acids in colonic contents of colitis mice after oral administration of polysaccharides from *Chrysanthemum morifolium* Ramat by gas chromatography with flame ionization detector [J]. *J Chromatogr B-Anal Technol Biomed Life Sci*, 2016, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.07.002.
- [11] 刘新丽, 卢 弘. 内毒素诱导的葡萄膜炎发病机制的研究进展 [J]. 国际眼科纵览, 2016, 40(4): 283-288.
- [12] Wei D D, Ge D, Guo P P, *et al.* A bird's eye view of anisatin induced convulsive seizures in brain by a ¹H-NMR based metabolic approach [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10(11): 2923-2934.
- [13] Wei D D, Wang J S, Li M H, *et al.* A pilot study of the onset of hepatic encephalopathy (OHE) in mice induced by thioacetamide and the protective effect of taurine by holistic metabolic characterization [J]. *Metabolomics*, 2015, 11(3): 559-570.
- [14] Wei D D, Wang J S, Duan J A, *et al.* Metabolomic assessment of acute cholestatic injuries induced by thioacetamide and by bile duct ligation, and the protective effects of Huang-Lian-Jie-Du-Decoction [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 458.
- [15] Xing Y X, Li M H, Tao L, *et al.* Anti-cancer effects of emodin on HepG2 cells as revealed by ¹H-NMR based metabolic profiling [J]. *J Proteome Res*, 2018, 17(5): 1943-1952.
- [16] Ruan L Y, Fan J T, Hong W, *et al.* Isoniazid-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in rats investigated by ¹H-NMR based metabolomics approach [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 295: 256-269.
- [17] Wei D D, Wang J S, Wang P R, *et al.* Toxic effects of chronic low-dose exposure of thioacetamide on rats based on NMR metabolic profiling [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.05.035.
- [18] Nicholson J K, Holmes E, Kinross J, *et al.* Host-gut microbiota metabolic interactions [J]. *Science*, 2012, 336(6086): 1262-1267.
- [19] Dodd D, Spitzer M H, Van Treuren W, *et al.* A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 648-652.
- [20] Kim C H, Park J, Kim M. Gut microbiota-derived short-chain fatty acids, T cells, and inflammation [J]. *Immun Network*, 2014, 14(6): 277-288.
- [21] 沙秀秀, 宿树兰, 沈 飞, 等. 不同生长期丹参茎叶及花序中丹酚酸类化学成分分布与积累动态分析评价 [J]. 中草药, 2015, 46(22): 3414-3419.
- [22] 沙秀秀, 戴新新, 宿树兰, 等. 丹参茎叶药材的质量标准研究 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6): 1094-1100.
- [23] 刘 杰, 郭 盛, 段金廛, 等. 黄蜀葵花期不同组织器官中多类型资源性化学成分的分析与利用价值挖掘 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(20): 3782-3791.
- [24] 李 园, 常相伟, 朱邵晴, 等. 黄芩花营养成分分析与资源价值评价 [J]. 中草药, 2018, 49(18): 4408-4416.
- [25] 郭 盛, 唐仁茂, 段金廛, 等. 从黄蜀葵制药过程副产物中提取得到的花蜡、蜜糖、黄酮部位及其制备方法和应用技术: 中国, CN105832579A [P]. 2018-08-31.
- [26] 陶小芳, 沈 飞, 宿树兰, 等. 生脉注射液生产过程五味子药渣中资源性物质的分析与循环利用途径探讨 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2712-2719.
- [27] 沈 飞, 宿树兰, 江 曙, 等. 丹红注射液生产过程中丹参固体废弃物的资源性成分分析及其转化机制研究 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2471-2476.