

基于超分子传感技术研究血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响

王璐瑶, 张亚平, 穆琦瑄, 于卉娟*, 王跃飞

天津中医药大学 省部共建组中药国家重点实验室, 天津市中药化学与分析重点实验室, 天津 301617

摘要: **目的** 基于超分子传感技术研究血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响。**方法** 采用离体外翻肠囊模型研究三甲胺的结肠吸收; 基于指示剂置换分析策略, 构建选择性识别三甲胺的超分子荧光传感体系, 评价血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响。**结果** 基于杯芳烃分子识别的超分子传感体系实现了三甲胺的灵敏检测; 与对照组相比, 血府逐瘀汤高剂量 (5.0 mg/mL) 组显著降低结肠单位面积三甲胺的累积吸收量 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 血府逐瘀汤低剂量 (2.5 mg/mL) 组能够减少结肠单位面积三甲胺的累积吸收量, 但与对照组相比无显著性差异。**结论** 血府逐瘀汤能够减少三甲胺的结肠吸收, 为血府逐瘀汤活血化瘀作用提供一定依据。

关键词: 超分子传感; 血府逐瘀汤; 指示剂置换分析; 三甲胺; 外翻肠囊法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)06-1783-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.06.021

Effect of Xuefu Zhuyu Decoction on trimethylamine absorption based on supramolecular sensing technology

WANG Lu-yao, ZHANG Ya-ping, MU Qi-xuan, YU Hui-juan, WANG Yue-fei

State Key Laboratory of Component-based Chinese Medicine, Tianjin Key Laboratory of TCM Chemistry and Analysis, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To study the effect of Xuefu Zhuyu Decoction (血府逐瘀汤) on trimethylamine (TMA) absorption based on supramolecular sensing technology. **Methods** The model of everted intestinal sac was used to explore the affection of Xuefu Zhuyu Decoction on colon absorption of TMA. Based on the indicator displacement assay, a supramolecular fluorescence sensing system was established for selective recognition of TMA, which was employed to evaluate the effect of Xuefu Zhuyu Decoction on colonic absorption of TMA. **Results** The established supramolecular sensing method can successfully detect TMA via molecular recognition of calixarene. Compared with control group, the cumulative absorption of TMA per unit area of colon in high-dose Xuefu Zhuyu Decoction (5.0 mg/mL) group was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and there was no significant difference in low-dose Xuefu Zhuyu Decoction (2.5 mg/mL) group. **Conclusion** Xuefu Zhuyu Decoction can reduce colonic absorption of TMA, which provides the basis for the role of Xuefu Zhuyu Decoction in promoting blood circulation and removing blood stasis.

Key words: supramolecular sensing; Xuefu Zhuyu Decoction; indicator displacement assay; trimethylamine; everted intestinal sac

三甲胺是胆碱、甜菜碱及肉碱等经肠道菌群代谢生成的产物, 经肝脏黄素单加氧酶 3 (flavin-containing monooxygenase 3, FMO3) 转化生成氧化三甲胺 (trimethylamine *N*-oxide, TMAO)^[1]。研究表明, 血浆 TMAO 水平升高可导致血小板高反应性, 增加血栓形成风险, 与心血管事件的发生呈正

相关^[2-3]。因此, 通过干预三甲胺的吸收, 减少三甲胺向 TMAO 的转化, 减少 TMAO 的生成, 从而降低血栓形成风险, 有助于预防心血管疾病的发生。血府逐瘀汤源自清代王清任的《医林改错》, 具有活血祛瘀、行气止痛的功效, 临床上广泛用于心血管疾病的预防和治疗^[4-5]。目前, 关于血府逐瘀汤是否

收稿日期: 2021-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873192)

作者简介: 王璐瑶 (1997—), 女, 硕士, 主要从事中药药效物质及质量控制研究。Tel: (022)59596366 E-mail: W1224967197@163.com

*通信作者: 于卉娟 (1988—), 女, 助理研究员, 主要从事中药药效物质及质量控制研究。Tel: (022)59596366 E-mail: huijuanyu@tjutc.edu.cn

调控三甲胺的结肠吸收鲜有报道。

三甲胺相对分子质量小,无显色团,为强极性的有机小分子。目前检测三甲胺的方法主要为气相色谱-质谱联用法、液相色谱-质谱联用法、核磁共振法^[6],但检测前样品需进行衍生化或同位素标记等预处理,存在操作繁琐、分析时间长、检测成本高等缺点。基于指示剂置换分析(indicator displacement assay, IDA)的超分子传感技术,通过指示剂荧光信号改变实现分析物的检测,具有操作简单、灵敏度高等优势。基于IDA策略,本课题组前期构建了胍基杯^[5]芳烃-荧光素钠主客体对传感体系,提供了一种易操作、低成本、无标记、灵敏检测TMAO的方法,实现了人工尿液和模拟疾病尿液中TMAO的检测^[7]。本研究构建超分子荧光传感体系识别检测三甲胺,探究血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响,旨在阐明血府逐瘀汤调控与血栓形成相关的三甲胺-TMAO通路的作用。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性Wistar大鼠,体质量(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2016-0006。动物饲养于天津药物研究院新药评价有限公司,室温22~25℃,相对湿度(40±10)%。动物实验经天津药物研究院新药评价有限公司实验动物管理与使用委员会批准(批准号2020060801)。

1.2 药材

柴胡、川芎、炒桃仁、红花、当归、赤芍、炒枳壳、生地、桔梗、甘草、牛膝饮片购自河北美威药业股份有限公司,经天津中医药大学李天祥教授鉴定分别为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC.的干燥根、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎、蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch的干燥成熟种子、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L.的干燥花、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels的干燥根、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall.的干燥根、芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L.及其栽培变种的干燥未成熟果实、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的新鲜或干燥块根、桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.干燥根和根茎、苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl.的干燥

根,均符合《中国药典》2020年版饮片质量标准。

1.3 药品与试剂

氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠、磷酸二氢钠、氯化镁、氯化钙、葡萄糖购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;稀盐酸购自天津市化学试剂供销公司;三甲胺(批号BCBZ6954)购自美国Sigma-Aldrich公司;恶嗪1(oxazine 1, OX1, 批号AAT-89)购自武汉艾美捷科技有限公司;磺化杯^[4]芳烃(*p*-sulfonatocalix^[4]arene, SC4A)由南开大学化学学院郭东升教授惠赠。

1.4 仪器

Varian Cary Eclipse型荧光分光光度计(美国安捷伦科技有限公司);ME 204型万分之一天平、MS 105DU型十万分之一天平(瑞士梅特勒-托利多公司);FDU-2110型冷冻干燥机(上海爱朗仪器有限公司);DB043型离体器官测量系统(北京智鼠多宝生物科技有限责任公司);Centrifuge 5424R型台式离心机(德国艾本德股份公司);Milli-Q超纯水仪(美国密理博公司)。

2 方法

2.1 样品及溶液的制备

2.1.1 血府逐瘀汤冻干粉的制备 取4g当归、4g柴胡、6g桔梗、6g川芎、8g甘草、8g炒枳壳、8g赤芍、12g生地、12g红花、12g牛膝、15g炒桃仁,置于圆底烧瓶中,加入8倍量水,回流提取2次,每次提取2h,合并水提液,浓缩,冷冻干燥,得血府逐瘀汤冻干粉,备用。根据本课题组已建立方法^[8],测定血府逐瘀汤冻干粉中主要成分的含量,冻干粉样品含苦杏仁苷3.50 mg/g、芍药苷5.33 mg/g、阿魏酸0.27 mg/g、柚皮苷7.28 mg/g、新橙皮苷6.18 mg/g、甘草酸1.96 mg/g。

2.1.2 Tyrode缓冲液的配制 按照文献方法^[9]配制Tyrode缓冲液:取0.28g氯化钾、8.0g氯化钠、0.05g磷酸二氢钠、1.0g碳酸氢钠、0.1g氯化镁,溶于500mL蒸馏水中,搅拌均匀;取0.2g氯化钙溶于500mL蒸馏水中,搅拌均匀;将上述溶液混合均匀,临用前加入1.0g葡萄糖,用稀盐酸调pH至7.4,备用。

2.1.3 样品溶液的制备 取血府逐瘀汤冻干粉,精密称定,用Tyrode缓冲液分别配制质量浓度为5.0、2.5 mg/mL的血府逐瘀汤样品溶液,备用。

取SC4A、OX1、三甲胺,精密称定,分别用超纯水配制成浓度为100 mmol/L、100 μmol/L、100

mmol/L 的储备液, 备用。

2.2 外翻肠囊模型的构建与取样

按照文献方法^[9]构建外翻肠囊模型。Wistar 大鼠实验前 16 h 禁食, 自由饮水, 随机分成 5 组, 每组 6 只。大鼠 ip 3% 戊巴比妥钠麻醉 (40 mg/kg), 剥离大鼠肠管, 剪取结肠 (4~7 cm), 用 Tyrode 缓冲液冲洗至无内容物。将肠管一端结扎, 翻转肠管, 另一端结扎成囊状。向肠囊内注入 1 mL Tyrode 缓冲液, 将其放入麦氏浴槽 (20 mL Tyrode 缓冲液) 中, 并向浴槽中通入 95% O₂ 和 5% CO₂, 保持 37 °C, 平衡 5 min, 将麦氏浴槽中的 Tyrode 缓冲液放出, 分别加入 20 mL 样品溶液: 5 mmol/L 三甲胺 (三甲胺对照组)、5.0 mg/mL 血府逐瘀汤 (高剂量血府逐瘀汤对照组)、2.5 mg/mL 血府逐瘀汤 (低剂量血府逐瘀汤对照组)、5.0 mg/mL 血府逐瘀汤+5 mmol/L 三甲胺 (高剂量血府逐瘀汤测试组)、2.5 mg/mL 血府逐瘀汤+5 mmol/L 三甲胺 (低剂量血府逐瘀汤测试组), 分别于 15、30、45、60、90、120 min 时从肠囊内取样 200 μL, 同时补足相同体积的 Tyrode 缓冲液。各组实验结束后将肠管纵向剖开, 自然摊于滤纸上测量长度和宽度, 计算结肠吸收面积。

2.3 荧光分光光度计实验条件

2.3.1 检测溶液的配制 将“2.2”项下采集的肠囊液, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 100 μL, 用 Tyrode 缓冲液稀释 10 倍, 加入 SC4A (测试体系中终浓度为 0.4 mmol/L) 和 OX1 (测试体系中终浓度为 1 μmol/L) 混匀, 总体积为 1 mL, 进行荧光检测。由于肠囊液经 Tyrode 缓冲液稀释 10 倍后进行荧光检测, 故测试体系中血府逐瘀汤质量浓度为 0.50、0.25 mg/mL。

2.3.2 检测条件 采用配备 Cary Single-cuvette Peltier 比色皿控温装置的 Varian Cary Eclipse 荧光光谱仪进行检测, 样品池为石英比色皿, 光程为 10 mm; 荧光滴定试验均在 37 °C 下进行。

2.3.3 数据统计 荧光滴定数据采用主客体 1:1 包结模型拟合公式 (oneHost_oneGuest, oneHost_oneGuest_oneCompetitor) 拟合^[7], 获得主客体对键合常数 (association constant, K_a)。 K_a 、线性关系、检测限 (LOD) 的测定均重复 3 次试验。

3 结果

3.1 杯芳烃超分子荧光传感体系的构建

在超分子荧光传感体系中, 为了提高荧光灵敏度, 降低干扰物的影响, 选择具有高荧光量子效率

及与大环主体分子有强键合的染料作为指示剂, 确保大环分子-染料主客体络合时荧光强度发生显著变化。基于 IDA 策略, 分析物 (竞争客体) 与染料竞争大环主体的空腔, 将染料从络合物中置换出来, 引起体系荧光强度增大或减小, 从而实现分析物的传感检测^[10]。

染料 OX1 具有较高的荧光量子效率, 与大环主体 SC4A 络合后自身荧光被淬灭, 传感体系荧光强度变化范围宽, 是杯芳烃超分子传感体系的理想荧光指示剂^[11]。而且, 在 Tyrode 缓冲液中, OX1 (1 μmol/L) 荧光强度不受三甲胺 (13 mmol/L) 和血府逐瘀汤 (0.50、0.25 mg/mL) 的影响 (图 1)。

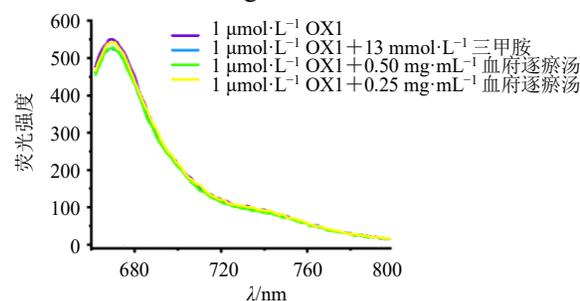


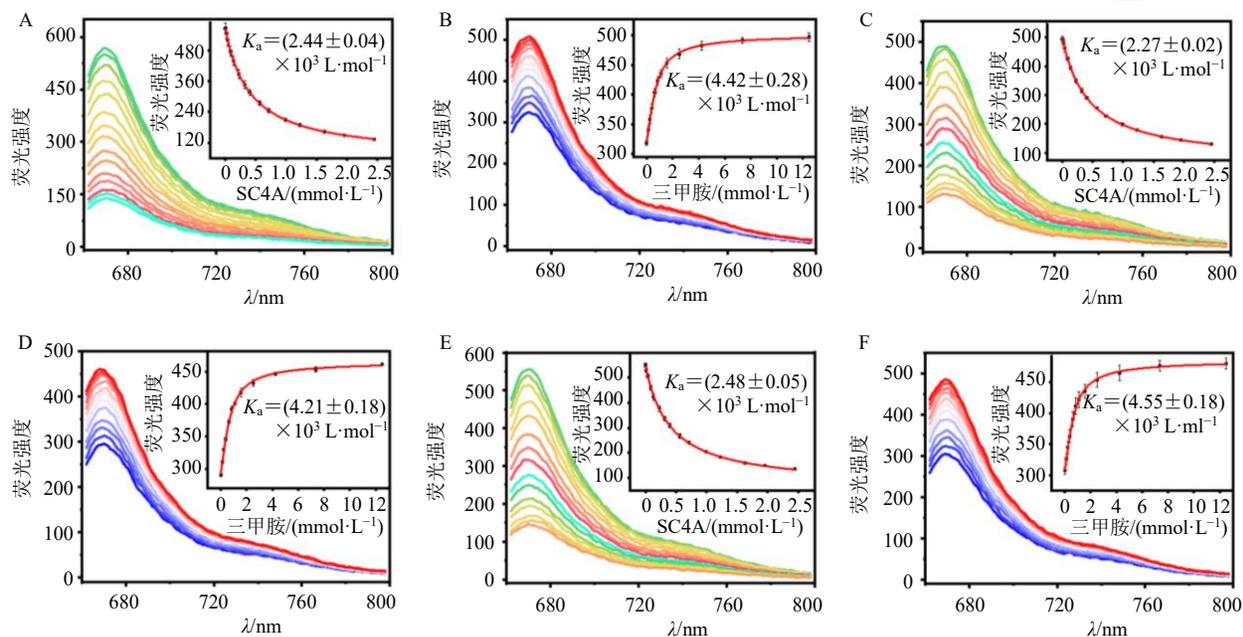
图 1 在 三甲胺 (13 mmol·L⁻¹) 或 血府逐瘀汤 (0.50、0.25 mg·mL⁻¹) 条件下 OX1 (1 μmol·L⁻¹) 的 荧光光谱 (λ_{ex}=648 nm, λ_{em}=660~800 nm)

Fig. 1 Fluorescence spectrum of OX1 (1 μmol·L⁻¹) in trimethylamine (13 mmol·L⁻¹) and Xuefu Zhuyu Decoction (0.50 and 0.25 mg·mL⁻¹) at λ_{ex} = 648 nm, λ_{em} = 660—800 nm

血府逐瘀汤药味多, 化学成分复杂。为评价 SC4A·OX1 主客体对传感体系对三甲胺检测的识别选择性, 系统考察了在血府逐瘀汤样品溶液 (0.50、0.25 mg/mL) 中 SC4A 对三甲胺的包结能力。

在 Tyrode 缓冲液中, 将 SC4A (0~2.45 mmol/L) 逐步滴加到 OX1 (1 μmol/L) 中, 大环主体分子 SC4A 与指示剂 OX1 发生可逆结合, OX1 的荧光信号被显著淬灭, 获得一系列随 SC4A 增加而荧光强度降低的荧光发射光谱 (图 2-A)。将 OX1 荧光光谱最大发射波长处 (668 nm) 的荧光强度与 SC4A 的浓度采用主客体 1:1 包结模型拟合公式 (oneHost_oneGuest) 进行拟合, 获得 SC4A·OX1 主客体对键合常数, 即 $K_a = (2.44 \pm 0.04) \times 10^3$ L/mol。

将三甲胺 (0~12.48 mmol/L) 逐步滴加到 SC4A·OX1 (0.4 mmol/L·1 μmol/L) 主客体对溶液中, 三甲胺与 OX1 竞争 SC4A 的空腔, 将 OX1 从 SC4A·OX1 络合物中置换出来, OX1 恢复在溶液中的荧光信号, 如图 2-B 所示。将 OX1 荧光光谱最大



Tyrode 缓冲液 (A)、0.50 mg·mL⁻¹ 血府逐瘀汤 (C)、0.25 mg·mL⁻¹ 血府逐瘀汤 (E) 中 SC4A (0~2.45 mmol·L⁻¹) 与 OX1 (1 μmol·L⁻¹) 的荧光滴定光谱 (插图为 OX1 在 λ_{em}=668 nm 的荧光强度与 SC4A 浓度的非线性拟合曲线); Tyrode 缓冲液 (B)、0.50 mg·mL⁻¹ 血府逐瘀汤 (D)、0.25 mg·mL⁻¹ 血府逐瘀汤 (F) 中三甲胺 (0~12.48 mmol·L⁻¹) 与 SC4A·OX1 (0.4 mmol·L⁻¹·1 μmol·L⁻¹) 主客体对的荧光竞争滴定光谱 (插图为 OX1 在 λ_{em}=668 nm 的荧光强度与三甲胺浓度的非线性拟合曲线)

Direct titration of OX1 (1 μmol·L⁻¹) with SC4A (up to 2.45 mmol/L) and the fitting curve (λ_{em} = 668 nm) (inset) in the tyrode buffer (A), 0.50 mg·mL⁻¹ (C), and 0.25 mg·mL⁻¹ Xuefu Zhuyu Decoction (E), respectively; Competitive titration in the SC4A·OX1 (0.4 mmol·L⁻¹·1 μmol·L⁻¹) reporter pair with trimethylamine (0—12.48 mmol·L⁻¹) and fitting curve (λ_{em} = 668 nm) (inset) in tyrode buffer (B), 0.5 mg·mL⁻¹ (D), and 0.25 mg·mL⁻¹ Xuefu Zhuyu Decoction (F), respectively

图 2 SC4A·OX1 和 SC4A·三甲胺主客体对键合常数的测定结果

Fig. 2 Association constants of SC4A·OX1 reporter pair and SC4A·trimethylamine reporter pair

发射波长处 (668 nm) 的荧光强度与三甲胺的浓度采用主客体 1:1 竞争包结模型拟合公式 (oneHost_oneGuest_oneCompetitor) 进行拟合, 得 SC4A·三甲胺主客体对键合常数, 即 $K_a = (4.42 \pm 0.28) \times 10^3$ L/mol。

同法操作, 在 0.50 mg/mL 血府逐瘀汤样品溶液中 SC4A·OX1、SC4A·三甲胺主客体对键合常数分别为 $K_{a(\text{SC4A} \cdot \text{OX1})} = (2.27 \pm 0.02) \times 10^3$ L/mol (图 2-C)、 $K_{a(\text{SC4A} \cdot \text{三甲胺})} = (4.21 \pm 0.18) \times 10^3$ L/mol (图 2-D); 在 0.25 mg/mL 血府逐瘀汤样品溶液中 SC4A·OX1、SC4A·三甲胺主客体对键合常数分别为 $K'_{a(\text{SC4A} \cdot \text{OX1})} = (2.48 \pm 0.05) \times 10^3$ L/mol (图 2-E)、 $K'_{a(\text{SC4A} \cdot \text{三甲胺})} = (4.55 \pm 0.18) \times 10^3$ L/mol (图 2-F)。

结果表明, 在 Tyrode 缓冲液、血府逐瘀汤 (0.50、0.25 mg/mL) 中测得 SC4A·三甲胺主客体对键合常数基本一致, 键合较强, 即在高、低质量浓度血府逐瘀汤中 SC4A 能够选择性识别三甲胺, 实现三甲胺传感检测。

3.2 Tyrode 缓冲液、血府逐瘀汤样品溶液中三甲胺测定标准曲线的建立

基于 IDA 策略, 分析物与染料竞争大环分子主体的空腔, 在一定浓度范围内随着分析物浓度的增加, 染料荧光强度呈线性增加, 从而构建分析物检测的标准曲线。在 Tyrode 缓冲液中, SC4A·OX1 (0.4 mmol/L·1 μmol/L) 主客体对的荧光强度随三甲胺 (0~0.62 mmol/L) 浓度增加呈线性增加, 以三甲胺浓度和 OX1 荧光强度 (λ_{em}=668 nm) 变化的比值 (I/I_0 , 其中 I_0 和 I 分别为未加入和加入三甲胺时 OX1 荧光信号强度值) 进行线性拟合, 得线性方程, $y = 442.82x + 1.0087$ ($R^2 = 0.9952$), 如图 3-A 所示。根据 $3\sigma/\text{slope}$ 法计算三甲胺的 LOD^[12-13], 计算得 Tyrode 缓冲液中三甲胺的 LOD 为 (32.78 ± 2.63) μmol/L。同理在 0~0.62 mmol/L, 0.50 mg/mL 血府逐瘀汤样品溶液 (图 3-B) 和 0.25 mg/mL 血府逐瘀汤样品溶液 (图 3-C) 中建立了三甲胺检测的标准曲线, LOD 分别为 (36.06 ± 5.10) 、 (35.08 ± 3.35) μmol/L。

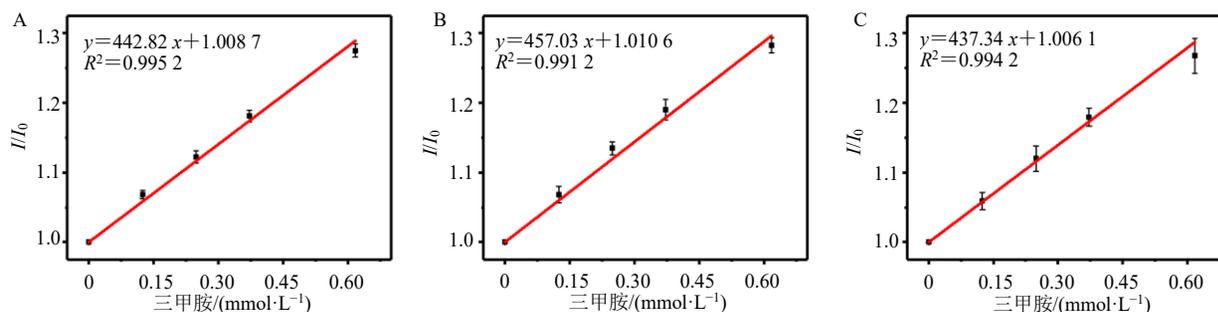


图3 在 Tyrode 缓冲液 (A)、 $0.50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 血府逐瘀汤样品溶液 (B)、 $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 血府逐瘀汤样品溶液 (C) 中 OX1 荧光强度比值与三甲胺浓度的线性拟合方程

Fig. 3 Linear fitting of fluorescence intensity ratio of OX1 and trimethylamine concentration in tyrode buffer (A), $0.50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (B) and $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Xuefu Zhuyu Decoction (C)

3.3 肠囊溶液中三甲胺的测定

本研究构建了 $\text{SC4A}\cdot\text{OX1}$ 超分子主客体对传感体系识别检测三甲胺, 探究血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响。

将“2.3.1”项下各测试液进行荧光检测, 三甲胺对照组、高剂量血府逐瘀汤对照组、低剂量血府逐瘀汤对照组、高剂量血府逐瘀汤测试组、低剂量血府逐瘀汤测试组所测的荧光强度分别记为 $I_{\text{对照}}$ 、 $I_{\text{高对照}}$ 、 $I_{\text{低对照}}$ 、 $I_{\text{高测试}}$ 、 $I_{\text{低测试}}$ 。Tyrode 缓冲液中 $\text{SC4A}\cdot\text{OX1}$ ($0.4\text{ mmol/L}\cdot 1\text{ }\mu\text{mol/L}$) 荧光强度值记为 I_0 。

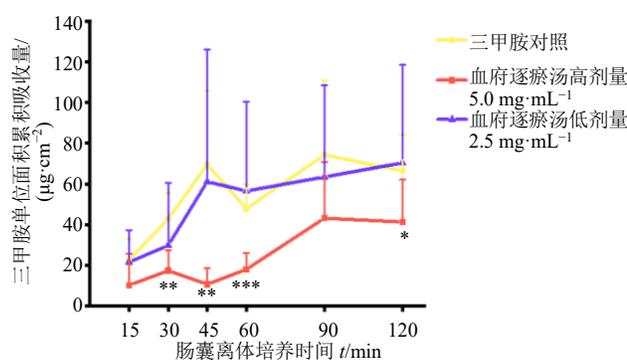
将三甲胺对照组荧光变化值 ($I_{\text{对照}}/I_0$)、高剂量血府逐瘀汤测试组荧光变化值 ($I_{\text{高测试}}/I_{\text{高对照}}$)、低剂量血府逐瘀汤测试组荧光变化值 ($I_{\text{低测试}}/I_{\text{低对照}}$) 分别代入“3.2”项中 Tyrode 缓冲液、 0.50 mg/mL 血府逐瘀汤、 0.25 mg/mL 血府逐瘀汤中测得的标准曲线, 计算得测试溶液中三甲胺浓度 (mmol/L), 记为 C_t ($t=15、30、45、60、90、120\text{ min}$)。因为测试样品在测试时稀释 10 倍, 故各肠囊中三甲胺的浓度为 $10C_t$ 。三甲胺结肠累积吸收量 (Q) 按照公式 (1) [9] 计算, 三甲胺结肠单位面积累积吸收量 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) 按照公式 (2) [9] 计算。

$$Q' = 0.2C'_t \times \frac{V_{\text{平衡}}}{V_{\text{样}}} + 0.2 \sum_{i=1}^{t-1} C'_i \quad (1)$$

$$Q' = \frac{Q}{A} \quad (2)$$

$V_{\text{平衡}}$ 为平衡前肠囊中加入 Tyrode 缓冲液 (1 mL) 的体积, $V_{\text{样}}$ 为每次取样的体积 ($200\text{ }\mu\text{L}$), C'_i 为各取样时间点肠囊中三甲胺的质量浓度 (mg/L), C'_i 为第 ($t+1$) 时肠囊中三甲胺的质量浓度 (mg/L); A 代表离体肠囊面积 (cm^2), 为剪开肠囊后量取其长度和宽度的乘积

如图 4 所示, 肠囊离体培养 $15\sim 120\text{ min}$, 与三甲胺对照组比较, 5.0 mg/mL 血府逐瘀汤测试组



与三甲胺对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs trimethylamine control group

图4 三甲胺对照组、血府逐瘀汤高剂量 ($5.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、血府逐瘀汤低剂量 ($2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组的三甲胺单位面积累积吸收量-时间折线图

Fig. 4 Trimethylamine cumulative absorption per unit area-time line graph of trimethylamine control group and Xuefu Zhuyu Decoction ($5.0, 2.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) groups

中三甲胺结肠单位面积累积吸收量明显降低, 且 $30、45、60、120\text{ min}$ 时具有显著性差异 ($P < 0.05、0.01、0.001$); 2.5 mg/mL 血府逐瘀汤测试组中三甲胺结肠单位面积累积吸收量与对照组相比呈降低趋势, 但无显著性差异。

4 讨论

近年来, 超分子化学在生物、环境、医药等领域发挥重要作用[14]。超分子化学主要研究 2 种或 2 种以上的分子通过非共价弱相互作用力 (如氢键、静电作用、疏水作用等) 结合形成的聚集体 (超分子)[15]。环糊精、杯芳烃、葫芦脲等大环主体分子是超分子化学重要组成部分。在超分子传感领域中, IDA 是由美国化学家 Eric V. Anslyn 教授研发的荧光传感策略[16], 是基于指示剂 (染料客体)、分析物 (竞争

客体)与大环主体的竞争性结合,导致测试体系荧光信号增敏 (switch-on) 或淬灭 (switch-off),从而将微观的分子识别行为转化为宏观的易于观察的荧光信号,从而实现分析物的检测。这种基于 IDA 策略的超分子传感检测不受限于分析物有无发色团,无

需同位素标记,具有操作简单、信号灵敏、检测通量高等优势。本研究基于 IDA 策略,构建了 SC4A•OX1 超分子主客体对传感体系(图 5),以 K_a 为评价指标,评价了 Tyrode 缓冲液、血府逐瘀汤中 SC4A 对三甲胺识别的选择性,实现了三甲胺的灵敏检测。

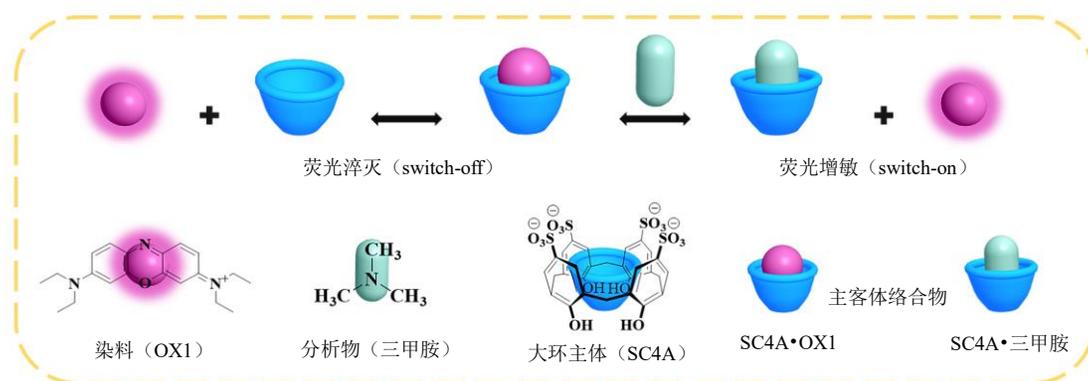


图 5 IDA 示意图

Fig. 5 Schematic of IDA

方剂通过干预免疫应答、影响微生物酶代谢系统、调控肠道菌群,从而干预疾病^[17]。膳食中的胆碱、甜菜碱及肉碱类物质经肠道菌群代谢产生三甲胺,在肝脏中经 FMO3 氧化成心血管“危险分子”TMAO,诱发心血管疾病。近年来,已有研究报道白藜芦醇^[18]、葫芦巴碱^[19]、黄连素^[20]等中药成分通过重塑肠道菌群,抑制胆碱向三甲胺转化,减少三甲胺产生,降低体内 TMAO 水平,从而降低心血管疾病风险。目前,关于血府逐瘀汤抗 TMAO 诱导的血栓性疾病研究主要聚焦于其入血成分调控的三甲胺-FMO3-TMAO 通路,通过抑制 FMO3 活性,抑制 TMA 向 TMAO 的体内转化,减少 TMAO 生成,从而延缓或阻断心血管疾病的发生与发展^[11]。本研究采用离体外翻肠囊模型研究血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响,结果表明,血府逐瘀汤可抑制结肠吸收三甲胺,为血府逐瘀汤调控与血栓形成相关的三甲胺-TMAO 通路的作用提供了依据。

本研究基于 IDA 策略构建了杯芳烃超分子传感体系,实现了三甲胺的灵敏检测,探究了血府逐瘀汤对三甲胺结肠吸收的影响。血府逐瘀汤能够减少三甲胺结肠的吸收,为揭示血府逐瘀汤调控与血栓形成相关的三甲胺-TMAO 通路的机制提供了科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Koeth R A, Wang Z N, Levison B S, *et al.* Intestinal

microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis [J]. *Nat Med*, 2013, 19(5): 576-585.

[2] Zhu W F, Gregory J C, Org E, *et al.* Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk [J]. *Cell*, 2016, 165(1): 111-124.

[3] He S Y, Jiang H, Zhuo C L, *et al.* Trimethylamine/trimethylamine-N-oxide as a key between diet and cardiovascular diseases [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2021, 21(8): 593-604.

[4] 吴剑宏, 陈幸谊. 血府逐瘀汤方剂的现代药理研究进展 [J]. *中成药*, 2013, 35(5): 1054-1058.

[5] 孟瑶, 赵丹阳, 隋月皎. 血府逐瘀汤治疗冠心病疗效的 Meta 分析 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(9): 1990-1997.

[6] 杨睿颖, 朱秋劲, 白晶, 等. 肉制品中三甲胺检测方法的应用研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2020, 41(23): 212-219.

[7] Yu H J, Geng W C, Zheng Z, *et al.* Facile fluorescence monitoring of gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide via molecular recognition of guanidinium-modified calixarene [J]. *Theranostics*, 2019, 9(16): 4624-4632.

[8] Zhang L, Zhu L, Wang Y F, *et al.* Characterization and quantification of major constituents of Xue Fu Zhu Yu by UPLC-DAD-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 62: 203-209.

[9] 朱晶晶, 王智民, 龚慕辛, 等. 基于肠吸收的质量评价指标选择的方法和原则 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(6): 659-662.

[10] Sedgwick A C, Brewster J T, Wu T H, *et al.* Indicator

- displacement assays (IDAs): The past, present and future [J]. *Chem Soc Rev*, 2021, 50(1): 9-38.
- [11] Yu H J, Chai X, Geng W C, *et al.* Facile and label-free fluorescence strategy for evaluating the influence of bioactive ingredients on FMO3 activity via supramolecular host-guest reporter pair [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 192: 113488.
- [12] Huang G B, Wang S H, Ke H, *et al.* Selective recognition of highly hydrophilic molecules in water by endo-functionalized molecular tubes [J]. *J Am Chem Soc*, 2016, 138(44): 14550-14553.
- [13] MacDougall D, Crummett W, Lal J, *et al.* Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry [J]. *Anal Chem*, 1980, 52(14): 2242-2249.
- [14] Geng W C, Sessler J L, Guo D S. Supramolecular prodrugs based on host-guest interactions [J]. *Chem Soc Rev*, 2020, 49(8): 2303-2315.
- [15] Samorì P, Giuseppone N. From supramolecular chemistry to complex chemical systems [J]. *Chemistry*, 2019, 25(58): 13229-13230.
- [16] Nguyen B T, Anslyn E V. Indicator-displacement assays [J]. *Coord Chem Rev*, 2006, 250(23/24): 3118-3127.
- [17] 丁佳敏, 张竞, 肖明明, 等. 方剂“从肠道菌群论治”的理论与实践 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2018, 20(2): 157-162.
- [18] Chen M L, Yi L, Zhang Y, *et al.* Resveratrol attenuates trimethylamine-*N*-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis by regulating TMAO synthesis and bile acid metabolism via remodeling of the gut microbiota [J]. *mBio*, 2016, 7(2): e02210-e02215.
- [19] Anwar S, Bhandari U, Panda B P, *et al.* Trigonelline inhibits intestinal microbial metabolism of choline and its associated cardiovascular risk [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 159: 100-112.
- [20] Li X, Su C, Jiang Z, *et al.* Berberine attenuates choline-induced atherosclerosis by inhibiting trimethylamine and trimethylamine-*N*-oxide production via manipulating the gut microbiome [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2021, 7(1): 36.

[责任编辑 李亚楠]