

基于“微观表征-化学分析-药效评价”三位一体探究土炒白术健脾止泻作用增强的炮制原理

单国顺¹, 肖欲言¹, 袁楚¹, 陈秀璇², 赵启苗², 刘想¹, 吴昊¹, 张可¹, 刘思奇¹, 于永铎^{1*}
(1. 辽宁中医药大学, 辽宁大连 116600; 2. 辽宁医药职业学院, 沈阳 110101)

[摘要] 目的:通过分析白术土炒前后微观结构、化学成分及抗溃疡性结肠炎(UC)作用的变化情况,解析土炒白术健脾止泻作用增强的炮制原理。方法:采用扫描电子显微镜-能谱法(SEM-EDS)对白术土炒前后的微观结构和元素组成情况进行分析,探究二者微观结构的差异及原因;采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)结合 UNIFI 1.9.2 天然产物分析平台对生白术和土炒白术中化学成分进行分析和鉴定,并结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)等多元统计分析方法,探究二者化学成分的差异及来源;采用葡聚糖硫酸钠(DSS)制备UC小鼠模型,并结合小鼠疾病活动指数(DAI)评价肠道炎症的严重程度,采用苏木素-伊红(HE)染色观察结肠组织的病理变化,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测炎症因子的水平,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)分析肠黏膜屏障关键mRNA及蛋白的表达,16S rRNA技术评价肠道菌群多样性情况,顶空-气相色谱-质谱法(HS-GC-MS)探究粪便中短链脂肪酸(SCFAs)的水平。基于以上研究结果探究白术土炒前后对模型动物的生物屏障、化学屏障、机械屏障和免疫屏障的影响,从对UC小鼠肠黏膜屏障调控的角度探究二者药效作用的差异及机制。结果:SEM观察发现,土炒白术表面有大量灶心土颗粒,且伴有气泡状膨起。同时,辅料灶心土表面也多裂隙和褶皱。EDS分析表明,土炒白术相较于生白术的Si、Al、Mg、Ca等元素含量显著升高,这些元素也均为灶心土的主要成分。采用UPLC-Q-TOF-MS技术结合数据库比对的方法对生白术和土炒白术的化学成分进行鉴定,正离子模式下共鉴定出132种化学成分,主要包括萜类、多酚类和氨基酸类化合物三类;负离子模式下共鉴定出40种化学成分,主要为多酚类和糖苷类化合物。其中,尤以倍半萜类成分和多酚酸类成分在炮制前后的含量变化较明显。白术经土炒可减轻UC小鼠的DAI评分,缓解其结肠长度缩短的情况,并降低血清中白细胞介素(IL)-17、IL-18、 γ 干扰素(IFN- γ)、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等促炎因子的水平,升高血清中分泌型免疫球蛋白A(sIgA)、IL-10、IL-4、转化生长因子- β (TGF- β)等抗炎因子的水平,增加结肠黏膜组织中闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、密封蛋白-1(Claudin-1)、黏蛋白2(MUC2)等肠黏膜屏障关键基因及蛋白的表达,改善肠道菌群多样性和SCFAs水平紊乱的情况($P<0.05$, $P<0.01$);生白术和清炒白术也具有上述作用,但弱于土炒白术,且辅料灶心土也具有一定的作用。结论:土炒可增强白术对UC小鼠肠黏膜屏障的保护作用,这些变化或由加热导致白术内部微观结构和化学成分变化与辅料灶心土吸附的双重作用有关。

[关键词] 土炒白术; 微观表征; 扫描电子显微镜-能谱法(SEM-EDS); 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS); 肠黏膜屏障; 炮制原理; 溃疡性结肠炎(UC)

[中图分类号] R242;R931;R943.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)08-0182-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252069

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251024.1305.001>

[网络出版日期] 2025-10-24 14:52:02 [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Exploring on Processing Mechanism of Enhanced "Invigorating Spleen and Stopping Diarrhea" Effect of Soil-fried *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma Based on "Microscopic Characterization, Chemical Analysis and Pharmacodynamic Evaluation" Trinity

SHAN Guoshun¹, XIAO Yuyan¹, YUAN Chu¹, CHEN Xiulai², ZHAO Qimiao², LIU Xiang¹, WU Hao¹,

[收稿日期] 2025-07-14

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81803726);辽宁省科技计划联合计划面上项目(2024-MSLH-286);辽宁中医药大学青创团队项目(2024-JYTTCB-075);辽宁省教育厅面上项目(LJKMZ20222205, LJKMZ20221308, LJ212414289001);辽宁中医药大学校级课题重点项目(2021LZY054)

[第一作者] 单国顺,博士,副教授,从事中药炮制原理及质量标准研究, E-mail: shanguoshun@126.com

[通信作者] * 于永铎,博士,教授,从事中医药治疗肛肠疾病研究, E-mail: yuyongduo@163.com

ZHANG Ke¹, LIU Siqu¹, YU Yongduo^{1*}

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China;

2. Liaoning Vocational College of Medicine, Shenyang 110101, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the processing mechanism underlying the enhanced effect of invigorating spleen and stopping diarrhea of soil-fried *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma (AMR) by analyzing the changes of microstructure, chemical composition and anti-ulcerative colitis (UC) activity before and after soil stir-frying. **Methods:** The microstructure and elemental composition of AMR before and after soil stir-frying were analyzed by scanning electron microscopy-energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS), to investigate the differences in microstructure and the underlying causes. Ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) coupled with UNIFI 1.9.2 natural product analysis platform were used to analyze and identify the chemical constituents in raw and soil-fried products, and multivariate statistical methods including principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) were used to explore the differences and sources of chemical constituents between them. A dextran sulfate sodium (DSS)-induced UC mouse model was established. The method of disease activity index (DAI) was used to evaluate the severity of intestinal inflammation. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of colon tissue, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of inflammatory factors, Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were used to analyze the expressions of key genes and proteins involved in the intestinal mucosal barrier. The 16S rRNA sequencing was used to evaluate the diversity of intestinal flora, headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS) was used to explore the levels of short-chain fatty acids (SCFAs) in feces. Based on the above findings, this paper investigated the effects of raw and soil-fried AMR on the biological, chemical, mechanical and immune barriers of model animals, and the differences in pharmacological effects and underlying mechanisms from the perspective of regulating the intestinal mucosal barrier in UC mice. **Results:** SEM observation revealed numerous hearth soil particles on the surface of soil-fried AMR, accompanied by bubble-like bulges. At the same time, there were many cracks and folds on the surface of the hearth soil. EDS analysis revealed that the contents of Si, Al, Mg and Ca in soil-fried AMR were significantly higher than those of raw products, and these elements constituted the primary components of hearth soil. UPLC-Q-TOF-MS combined with database comparison was used to identify the chemical constituents of raw and soil-fried AMR. In positive ion mode, a total of 132 components were identified, primarily comprising three categories of terpenoids, polyphenols and amino acids. In negative ion mode, a total of 40 components were identified, primarily polyphenolic and glycoside compounds. Among them, the contents of sesquiterpenes and polyphenolic acids were changed significantly before and after processing. Soil-fried AMR could reduce the DAI score of UC mice, alleviate the shortening of colon length, reduce the levels of pro-inflammatory factors such as interleukin (IL)-17, IL-18, γ -interferon (IFN- γ) and tumor necrosis factor (TNF)- α in serum, increase the levels of anti-inflammatory factors such as secretory immunoglobulin A (sIgA), IL-10, IL-4 and transforming growth factor- β (TGF- β) in serum, increase the expressions of key genes and proteins of intestinal mucosal barrier such as tight junction protein-1 (ZO-1), Occludin, Claudin-1 and mucin 2 (MUC2) in colonic mucosa, and improve the disorders of intestinal flora diversity and the levels of SCFAs ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The raw and stir-fried products of AMR also exhibited the aforementioned effects, but they were weaker than the soil-fried products. Additionally, the auxiliary material hearth soil also had a certain pharmacodynamic effect. **Conclusion:** Soil-fried AMR can enhance the protective effect on intestinal mucosal barrier in UC mice. These changes or heating-induced alterations in the microscopic structure and chemical composition of AMR may be attributed to the dual effects of adsorption of hearth soil.

[Keywords] soil-fried *Atractylodis Macrocephalae* Rhizoma; microstructural characterization; scanning electron microscopy-energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS); ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS); intestinal mucosal barrier; processing mechanism; ulcerative colitis (UC)

辅料炮制是我国传统制药技术的一大特色,具有增强主药疗效、降低毒性或影响主药理化性质等作用。由于辅料的属性不同,在炮制过程中所发挥的作用也有差异,阐明辅料在中药炮制过程中所发挥的作用也是解析中药炮制原理的重要内容^[1]。近年来,研究者已对辅料炮制原理进行了一系列的研究^[2]。但是,对于辅料炮制原理的研究更多关注蜜、酒、盐、醋、姜等液体辅料,有关麦麸、灶心土、米、河砂等固体辅料的炮制原理研究相对较少^[3],亟须相

关研究来推动中药炮制理论的发展,这对于继承和发展传统中药炮制技术也具有重要的价值。

白术因味苦、性偏温燥,为了满足临床多样性的使用需求,历代医家多对白术进行炮制,以缓和燥性,增强益气健脾的作用^[4]。土炒白术是出现最早且使用时间最长的炮制方法,中医认为,白术经土炒后,可借土气资助脾土,增强补脾止泻的作用,多用于脾虚食少、泄泻便溏之证^[5-6]。但是,受社会生产、生活条件改变的影响,传统土炒所用灶心土、

陈壁土的来源受到了限制。目前,饮片生产企业多以黄土、禹余粮或赤石脂等来代替灶心土来炒制白术,这也使得土炒白术饮片的质量、临床疗效及用药安全均受到影响。因此,为了保证土炒白术饮片的质量和临床疗效,推动辅料灶心土的替代研究,有必要对土炒白术的炮制原理进行系统的研究,明确白术土炒前后物质基础及药效作用的差异及辅料土在炮制过程中的作用。

目前,对于白术炮制原理的研究仍多关注中药炮制前后有效成分含量及药效作用等方面的变化。如李亚飞等^[7]采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)法结合多元统计分析技术考察麸炒白术炮制前后差异性化学成分,筛选出白术内酯Ⅰ、白术内酯Ⅱ和白术内酯Ⅲ等11种潜在差异性化学成分。但是,土炒白术与麸炒白术比较,还具有“表面挂土”的特征,即白术饮片表面残留的灶心土可与饮片共同进入煎剂。有研究者通过实验证实了辅料灶心土对白术的化学成分具有影响^[8]。然而,辅料灶心土对土炒白术化学成分及药效作用产生影响的机制尚不清晰。因此,本研究拟构建“微观表征-化学分析-药效评价”三位一体的研究模式,针对白术土炒前后的微观结构和化学成分的变化情况及对溃疡性结肠炎(UC)模型动物的治疗作用进行系统的比较研究,以期探究土炒白术“健脾止泻”作用增强的炮制原理,从而为临床应用白术生、制饮片及辅料灶心土的替代研究提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 GeminiSEM 360型热场发射扫描电子显微镜(德国卡尔蔡司光学有限公司),Xplore型能谱分析仪(英国牛津仪器公司),GVC-1000型离子溅射仪(北京格微仪器有限公司),Xevo G2-XS型四级杆串联飞行时间质谱仪、XEVO TQD型三重四级杆串联质谱仪(美国Waters公司),TL2010S型高通量组织研磨仪(北京鼎昊源科技有限公司),StepOne型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪、Nano Drop One型核酸蛋白测定仪及Multiskan MK3酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司),L96G型基因扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司),Criterion型蛋白电泳系统(美国Bio-Rad公司),Image Quant LAS 500型数码凝胶成像仪(英国Syngene公司),Sigma3k15型通用台式高速冷冻离心机(德国Sigma公司),LX-800型迷你离心机[生工生物工程(上海)股份有限公司],7890B型气相色谱

谱仪、5977B型质量选择检测器(MSD)质谱仪、配备7697A型顶空进样器(美国Agilent公司)。

1.2 药物与试剂 白术饮片购自安国市聚药堂药业有限公司,批号为2403003,经辽宁中医药大学尹海波教授鉴定基原为菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* 的干燥根茎,并符合2025年版《中华人民共和国药典》的质量要求,灶心土(安国市聚药堂药业有限公司,批号2408016),柳氮磺吡啶肠溶片(上海信谊天平药业有限公司,批号20230819),葡聚糖硫酸钠(DSS)盐(大连美仑生物技术有限公司,相对分子质量36 000~50 000 Da,批号DW-40L508)。分泌型免疫球蛋白A(sIgA)、白细胞介素(IL)-4、IL-18、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-10、IL-17、 γ 干扰素(IFN- γ)、转化生长因子- β (TGF- β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海科兴商贸有限公司,批号分别为23061249N、23061259N、23061258N、23061252N、23061261N、23061254N、23061255N、23061251N),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号为CR2501086),闭锁小带蛋白-1(ZO-1)、闭合蛋白(Occludin)、密封蛋白-1(Claudin-1)、游离脂肪酸受体3(FFAR3)、黏蛋白2(MUC2)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔的二抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为bs-AF5145、bs-10011R、bs-A21971、bs-A12636、bs-0535R、bs-A4767、bs-2188R),组织/细胞RNA快速提取试剂盒、mRNA逆转录试剂盒、Real-time PCR试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20230617、20230523、20230611),放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、免封闭PAGE凝胶超快速制备试剂盒10%、蛋白电泳缓冲液、Western快速转膜液、增强化学发光法(ECL)发光液(大连美仑生物科技有限公司,批号分别为MA0073-Apr-228、MA0233-Jul-05G2、MA0387-Jun-271、MA0093-Apr-231、MA0121-2-Oct-261、MA0079-May-285),粪便/土壤基因组DNA提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号B611614-0016],甲酸、甲醇、乙腈均为质谱级,水为娃哈哈纯净水,其余试剂为分析级。

1.3 动物 Balb/c雄性小鼠(SPF级)70只,体质量(20 \pm 2)g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司[生产合格证号SCXK(辽)2020-0001;实验动物质量合格证编号210726241102524464],并饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,保持温度20~25℃,相对湿

度40%~70%,明暗交替循环12 h,期间自由饮食和饮水,并保持垫料干净。

1.4 伦理 本实验经辽宁中医药大学动物伦理委员会批准,伦理编号2025005。

2 方法

2.1 饮片制备 取净白术饮片,置炒制容器内,文火加热至140~150 °C,投入净白术饮片,炒制5 min,至饮片表面焦黄色后取出,放凉,即得清炒白术饮片。按2018年版《湖北省中药饮片炮制规范》,取灶心土置热锅内,中火加热至200~210 °C,投入净白术饮片,快速拌炒7 min至饮片表面均匀挂土色,有香气逸出,取出,筛去多余的土,放凉,即得土炒白术(每100 kg白术片,用灶心土20 kg)^[9]。

2.2 白术土炒前后微观结构和元素组成分析^[10]

将导电胶粘贴于载物台上,取生白术、土炒白术和灶心土黏于导电胶表面,用洗耳球吹去小颗粒,采用真空镀膜法在真空度2 Pa、电流10 mA的条件下喷镀铂金属2 min使样品导电。SEM设置仪器的加速电压为1.0 kV,放大倍数1 000、5 000, I Probe 64 pA, ESB Grid 400 V,工作距离根据每个供试品情况进行调整。能谱分析(EDS)设置采集C、O、Si、Al、Fe、K、Mg、Ca、Na、Ti、Cu等元素。

2.3 白术土炒前后的化学成分分析

2.3.1 供试品溶液制备 称取白术饮片6份,按上述方法分别炮制6份土炒白术,分别粉碎并称取6份生白术和土炒白术样品粉末各约0.2 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入50%甲醇20 mL,称定质量,超声(功率1 000 W,频率100 kHz,下同)30 min,放冷,称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。同时,取各供试品溶液0.5 mL混匀,作为质量控制(QC)样本,用于后续数据采集和分析。

2.3.2 检测条件 色谱条件为ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),使用流动相0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~1 min, 98%A; 1~7 min, 98%~45%A; 7~15 min, 45%~40%A; 15~19 min, 40%~30%A; 19~23 min, 30%~20%A; 23~24 min, 20%~0%A; 24~25 min, 0%A; 25~25.01 min, 0%~98%A; 25.01~30 min, 98%A),流速0.30 mL·min⁻¹,进样量2 μL。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),正负离子模式分别进行检测,毛细管电压2.5 kV(ESI⁺)、-3.0 kV(ESI⁻),锥孔电压35 V,离子源补偿电压60 V,离子源温度50 °C,脱溶剂气温度350 °C,锥孔气流速

100 L·h⁻¹,脱溶剂气流速650 L·h⁻¹。MS^E模式采集数据,低能量扫描传输碰撞能量为3 eV,高能量扫描传输碰撞能量为20~30 eV;数据扫描范围 m/z 50~1 000,亮氨酸脑啡肽(m/z 554.261 5 [M-H]⁻, m/z 556.277 1 [M+H]⁺)作为校正实时校正。

2.3.3 白术化学成分数据库的建立 通过查阅PubMed、ChemSpider、Massbank、中国知网、万方、维普等数据库中有关白术及菊科同属植物所含化合物的文献,筛选得到各化合物的名称、分子式、CAS号及一级、二级质谱数据,并在PubChem网站查找相关化合物的结构式,使用ChemDraw软件绘制化合物结构式,并保存为.mol格式的文件,并导入UNIFI 1.9.4软件(美国Waters公司),形成白术化学成分数据库。

2.3.4 数据处理 UPLC-Q-TOF-MS的下机数据导入UNIFI 1.9.4软件,得到样品分析列表,并基于白术化学成分的自建数据库,建立一个化合物鉴定的过滤筛选方法,包括保留时间范围0.5~30.0 min,响应强度阈值≥5 000,质量误差≤10 ppm。随后进行化合物鉴定分析,软件得出结果再依据化合物裂解规律、保留时间和样品中分布情况(剔除空白样品含有,以及在QC样本中分布不稳定的化学成分)进行手工剔除假阳性结果。最后,将筛选得到定性化合物的保留时间及峰面积结果导入SIMCA-P 14.1软件,进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA),在OPLS-DA中以变量重要性投影(VIP)值>1筛选生白术与土炒白术间的差异化合物。

2.4 白术土炒前后对UC小鼠肠黏膜屏障功能的影响

2.4.1 供试药液的制备 取白术、清炒白术和土炒白术饮片分别采用10倍量水煎煮1 h,然后8倍量水煎煮0.5 h,合并2次煎煮液,浓缩至0.5 g·mL⁻¹,备用。

2.4.2 造模、分组及给药 参照文献^[11]报道的方法并进行改良,将Balb/c小鼠随机分为空白组、模型组、阳性药组(柳氮磺吡啶,1.59 g·kg⁻¹)、灶心土组(0.001 g·kg⁻¹)、白术组(4.55 g·kg⁻¹)、清炒白术组(4.55 g·kg⁻¹)和土炒白术组(4.55 g·kg⁻¹)。除空白组外,其余各组小鼠均采用自饮用2.5% DSS水溶液的方法建立UC模型,按照每10 d为1个周期,前5 d给予2.5% DSS水溶液,后5 d给予纯净水,连续3个周期。采用边造模边给药的方式,对各组动物进行灌胃给药,给药剂量均按照成人临床使用量与参考文献确定^[4,5,9]。空白组和模型组灌胃等体积的纯净水。

2.4.3 动物取材 末次给药后收集小鼠粪便于无

菌管内,禁食12 h,称质量,目内眦取血,4 °C凝集后离心(3 000 r·min⁻¹,10 min,离心半径11 cm,下同)制备血清;处死动物,剥离胸腺及脾脏,计算胸腺指数和脾指数;记录盲肠至肛门段肠管长度,并使用预冷的生理盐水冲洗结肠,备用。

2.4.4 疾病活动指数(DAI)评分 DAI是评估结肠炎疾病活动程度的指标,在造模及治疗过程中观察各组动物的精神状态、粪便黏稠度、便血程度和体质量等情况并按照下述公式进行疾病活动指数的评分^[12],具体得分标准详见表1。DAI=(体质量下降率评分+粪便性状评分+便血情况评分)/3。

表1 DAI评分标准

Table 1 DAI scoring criteria

| 序号 | 体质量下降率 | | 粪便形状 | | 便血程度 | |
|----|----------|----|------|----|------|----|
| | 标准/% | 得分 | 标准 | 得分 | 标准 | 得分 |
| 1 | >0, ≤1 | 0 | 正常 | 0 | 无 | 0 |
| 2 | >1, ≤5 | 1 | 软便 | 1 | 隐血 | 1 |
| 3 | >5, ≤10 | 2 | 松散 | 2 | 隐血较多 | 2 |
| 4 | >10, ≤15 | 3 | 糊状 | 3 | 少量出血 | 3 |
| 5 | >15 | 4 | 稀便 | 4 | 大量出血 | 4 |

2.4.5 HE染色观察结肠组织病理变化 各组动物处死后,剥离结肠部位,使用预冷的生理盐水冲洗后经4%多聚甲醛固定,经乙醇脱水、石蜡包埋后制片,以HE染色,显微镜下观察小鼠结肠组织的病理变化。

2.4.6 ELISA检测血清炎症因子水平 严格按照试剂盒说明书要求,测定各组动物血清中IFN-γ、TNF-α、IL-17与IL-18等促炎因子及sIgA、IL-10、IL-4与TGF-β等抗炎因子的水平。

2.4.7 Real-time PCR检测结肠组织中肠黏膜屏障相关mRNA水平 取结肠组织适量,液氮中研磨后按照RNA提取试剂盒相关要求提取总RNA,通过逆转录合成cDNA,并以此cDNA为模板,进行扩增,条件为95 °C、60 s预变性,95 °C、15 s变性;63 °C退火/延伸25 s(循环40次),熔点曲线为55~95 °C。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,使用2^{-ΔΔC_t}公式计算ZO-1、Occludin、Claudin-1、FFAR3、MUC2 mRNA的相对表达量。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司提供,序列见表2。

2.4.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测结肠组织中肠黏膜屏障相关蛋白表达量 取结肠组织适量,称质量后加入放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液,混合后低温条件下匀浆,12 000 r·min⁻¹离心20 min分离上清(离心半径6 cm)。采用蛋白定量法(BCA)测定各样品的蛋白浓度,经电泳分离蛋白,电转使蛋白转移至

表2 引物序列

Table 2 Primer sequences

| 引物 | 序列(5'-3') | 长度/bp |
|-----------|-------------------------------|-------|
| ZO-1 | 上游 GAAGGCGGATGGTGTACAAGTG | 232 |
| | 下游 AGGCTCAGAGGACCGTGAATGG | |
| Occludin | 上游 AGTCCACCTCCTTACAGACCTGATG | 330 |
| | 下游 GCCTCCATAGCCACCTCCGTAG | |
| Claudin-1 | 上游 AGAAGATGTGGATGGCTGTCAATTGG | 251 |
| | 下游 CCGTGGTGTGGGTAAGAGGTTG | |
| MUC2 | 上游 CCTTCAACCACCTCACCAACCATC | 348 |
| | 下游 TCCAGAATCCAGCCAGCCAGTC | |
| FFAR3 | 上游 TCCTGGCATCGGCTCACTGTAG | 345 |
| | 下游 ACGGACTCTCACGGCTGACATAG | |
| GAPDH | 上游 ACAGCA ACA GGGTGGTGGAC | 183 |
| | 下游 TTTGAGGGTGCAGCGAACTT | |

聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,封闭后,分别加入相应的一抗(ZO-1、Occludin、Claudin-1、FFAR3和MUC2与β-actin,稀释比例均为1:1 000),4 °C孵育过夜,TBST缓冲液漂洗后加入相应二抗(稀释比例为1:1 000),4 °C孵育1 h,再次洗涤,并滴加增强化学发光法(ECL)化学发光液,于成像仪上进行曝光,并应用Image J软件分析条带灰度值。

2.4.9 肠道菌群结构及多样性分析 取末次给药后收集的小鼠粪便适量,按照试剂盒说明书提取总DNA,并以此为模板对细菌16S rRNA基因V3~V4可变区进行扩增和测序,获得的测序结果导入MicrobiomeAnalyst微生物组学分析平台(<https://www.microbiomeanalyst.ca/>),数据经拆分、拼接、过滤和标准化处理,并进行α多样性分析,比较样本之间多样性和丰富度的差异,通过主坐标分析(PCoA)展示组间物种β多样性,利用线性判别分析(LEfSe)比较样本间的微生物群落差异。

2.4.10 粪便中短链脂肪酸(SCFAs)含量的测定 参照前期建立的方法^[13],小鼠粪便液氮下研均,取约50 mg,精密称定,于20 mL顶空进样瓶,并加入0.2%的H₃PO₄溶液25 μL(含0.668 g·L⁻¹的4-甲基戊酸内标),采用顶空进样气相色谱质谱联用法检测各组样品中乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸和己酸的含量。

2.4.11 统计学分析 采用SPSS 21.0软件对实验数据进行统计学分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐则采用最小显著性差异法(LSD)进行组间两两比较;若方差不齐则采用Tamhane's T2法进行比较。P<0.05表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 土炒对白术微观结构的影响 土炒白术与生白术比较,表面可见大量灶心土颗粒,且伴有气泡状膨起,多有破碎颗粒;辅料灶心土表面多裂隙和褶皱。表明辅料灶心土是土炒白术饮片的重要组成部分,且白术土炒的温度较高,也使饮片的质地发生了较大变化。见图1。

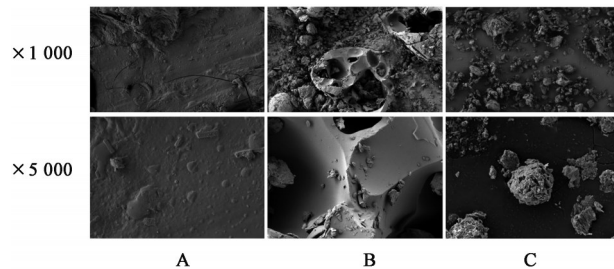


图1 白术土炒前后微观结构的变化(SEM)

Fig. 1 Changes of microstructure of *Atractylodes Macrocephalae Rhizoma* (AMR) before and after soil stir-frying (SEM)

3.2 土炒对白术饮片元素组成的影响 灶心土和生、土炒白术的元素以C、O、Si、Al、Fe、K、Mg、Ca为主。除C和O元素外,灶心土中以Si、Al、Mg、Ca元素为主,生白术中则以Fe和K为主,而土炒白术中Si、Al、Mg、Ca元素的含量均上升,且Fe元素含量也增加,可能为炒制容器引入。见表3。

表3 不同样品中的元素组成情况

| 元素 | 灶心土 | 生白术 | 土炒白术 |
|----|-------|-------|-------|
| C | 46.71 | 42.26 | 43.59 |
| O | 41.71 | 54.32 | 45.74 |
| Si | 10.93 | 0.01 | 4.56 |
| K | 0.22 | 1.85 | 1.94 |
| Al | 2.38 | 0.04 | 2.18 |
| Mg | 2.13 | 0.01 | 0.35 |
| Ca | 1.09 | 0.01 | 0.22 |
| Fe | 0.05 | 0.21 | 1.35 |

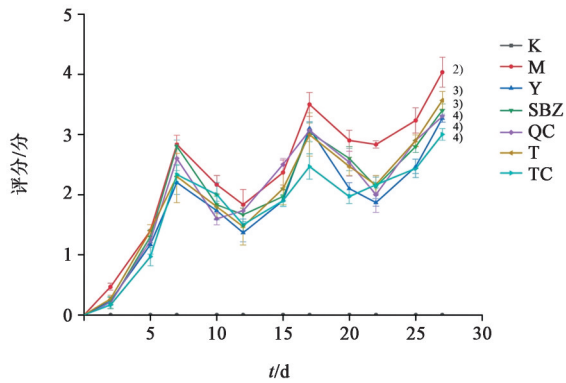
3.3 土炒对白术化学成分的影响 正、负离子模式下的总离子流见增强出版附加材料。通过查阅白术及同属植物化学成分的信息,建立了包含252个化合物的数据库。利用UNIFI 1.9.4平台对生白术和土炒白术样品数据进行处理,并结合化合物保留时间、精确相对分子质量、二级质谱裂解碎片情况进行化合物的分析,详细的分析过程见下文中各类化合物的结构鉴定。结果在正负离子模式下共鉴定出142个化合物,其中正离子模式下132个化合物,负离子模式下40个化合物。详细的化合物相关

信息见增强出版附加材料。

3.4 多元统计分析 PCA结果显示,在正负离子模式下,PC1与PC2贡献率之和均>80%, R^2X (模型对X变量的解释率)均>0.8, Q^2 (模型的预测率)均>0.6,表明PCA模型稳定性及预测信度良好。同时,各样本分别集中于相应区域,并且可以明显区分,表明生白术和土炒白术的化学成分间具有明显差异。见增强出版附加材料。OPLS-DA结果显示,正负离子模式下, R^2Y (模型对Y变量的解释率)与 Q^2 均>0.9,表明该模型具有较好的预测能力,200次的置换检验 R^2 截距均<0.4, Q^2 截距均<0.05,表明该模型稳定性较好,且无过拟合现象。正负离子模式下,在95%置信区间内,两组样本均可被分为两类,在正离子下共鉴定出137种化合物,其中52种化合物VIP值>1,可作为区分生、制白术的差异性成分,主要包括萜类、多酚类和氨基酸类化合物3类。萜类化合物主要有白术内酯I、白术内酯II、白术内酯III和苍术酮等;多酚类化合物主要有1,3-二咖啡酰奎宁酸、异绿原酸A等;氨基酸类化合物主要有组氨酸、L-苯丙氨酸和L-精氨酸等。在负离子下共检测出45种成分,其中12种化合物VIP值>1,可作为区分生、制白术的差异性成分,主要为多酚类和糖苷类化合物。多酚类化合物主要包括1,3-二咖啡酰奎宁酸、新绿原酸等;糖苷类化合物主要有豆甾醇-3-O- β -D-葡萄糖苷和(1S,5R,7R,10R)-裂苍术内酯-11-O- β -D-吡喃葡萄糖苷。具体信息见增强出版附加材料。

3.5 白术土炒前后对UC小鼠一般情况及DAI疾病指数的影响 观察各组动物在造模及给药期间的一般情况,结果显示,从造模第4天开始,模型组小鼠开始出现隐血现象,第7天开始出现肉眼可见的血便;造模第7天后,其他各给药组小鼠基本开始出现粪便隐血情况,表明造模成功。DAI评分结果与一般情况基本一致,造模第5天,模型组小鼠的DAI评分开始显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠DAI评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),尤其是土炒白术组的DAI评分最低($P<0.01$),阳性药组、白术组与清炒白术组和灶心土组的DAI评分差异性较小。上述结果也表明,土炒白术可以显著减缓UC小鼠体质量下降、稀便糊肛和便血等症状。见图2。

3.6 土炒白术对UC小鼠脏器指数的影响 脏器指数结果与DAI评分结果基本一致,与空白组比较,模型组小鼠脾指数显著升高($P<0.01$),胸腺指数显著降低($P<0.01$),表明DSS对小鼠的免疫功能具有



注:K.空白组;M.模型组;Y.阳性药组;SBZ.白术组;QC.清炒组;T.灶心土组;TC.土炒组;与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$

图2 白术土炒前后对UC小鼠DAI的影响

Fig. 2 Effect of AMR before and after soil stir-frying on DAI in UC mice

损伤作用;与模型组比较,各给药组小鼠脾指数均有不同程度降低,除白术组和灶心土组外,差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),胸腺指数均有不同程度的升高,除白术组和灶心土组外,差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$),说明各给药组均存在不同程度的治疗作用。除阳性药外,清炒白术和土炒白术的作用更明显。见表4。

3.7 土炒白术对UC小鼠结肠组织形态的影响 通过对各组小鼠结肠长度进行比较发现,与空白组小鼠比较,模型组小鼠结肠长度明显缩短,各给药组小鼠结肠长度则与模型组比较均有所增长。除阳性药外,以清炒白术和土炒白术的作用更明显。此外,HE染色结果表明,空白组小鼠结肠黏膜上皮结构完整,无炎症细胞浸润现象;模型组小鼠结肠黏

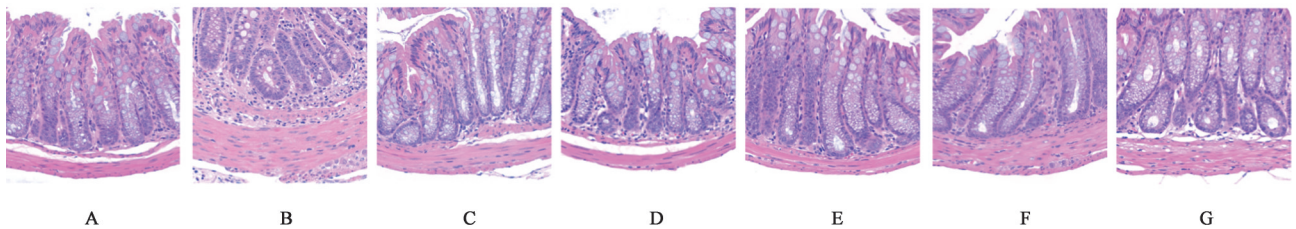


图4 白术土炒前后对UC小鼠结肠组织形态的影响(HE,×40)

Fig. 4 Effect of AMR before and after soil stir-frying on colon tissue morphology of UC mice (HE, ×40)

3.8 土炒白术对UC小鼠血清中炎症因子水平的影响 通过对各组小鼠血清中炎症因子水平进行分析。结果发现,与空白组比较,模型组小鼠体内的促炎因子(IFN- γ 、TNF- α 、IL-17与IL-18)及TGF- β 水平显著升高($P<0.01$),抗炎因子(sIgA、IL-10与IL-4)水平显著降低($P<0.01$);与模型组比较,各给药组均可不同程度回调血清中各炎症因子的水平,

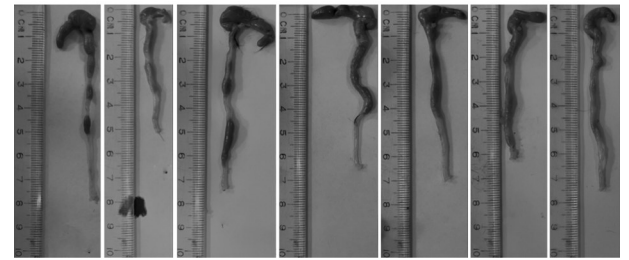
表4 白术土炒前后对UC小鼠脏器指数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 4 Effect of AMR before and after soil stir-frying on organ index of UC mice ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 体质量/g | 脾指数/% | 胸腺指数/% |
|------|-----------------------|------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 24.32±1.61 | 2.87±0.24 | 1.76±0.31 |
| 模型组 | | 19.29±1.26 | 4.69±0.99 ²⁾ | 1.27±0.19 ²⁾ |
| 阳性药组 | 1.59 | 20.88±1.84 | 3.64±0.45 ⁴⁾ | 1.49±0.31 ⁴⁾ |
| 白术组 | 4.55 | 20.73±2.98 | 3.91±0.87 | 1.35±0.23 |
| 清炒组 | 4.55 | 20.06±1.93 | 3.82±0.58 ⁴⁾ | 1.39±0.42 ³⁾ |
| 灶心土组 | 0.001 | 19.07±1.29 | 3.93±0.81 | 1.33±0.15 |
| 土炒组 | 4.55 | 20.92±1.87 | 3.51±0.78 ⁴⁾ | 1.37±0.31 ³⁾ |

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表5-表8同)

膜严重损伤,出现明显杯状细胞丢失、隐窝细胞破坏等情况,并伴有炎症细胞浸润现象。各给药组动物结肠黏膜结构均得到不同程度的恢复,炎症浸润现象减轻。见图3、图4。



注:A.空白组;B.模型组;C.阳性药组;D.白术组;E.清炒白术组;F.灶心土组;G.土炒白术组(图4和图5同)

图3 白术土炒前后对UC小鼠结肠长度的影响

Fig. 3 Effect of AMR before and after soil stir-frying on colon length of UC mice

整体上以土炒白术组的调节作用最显著($P<0.01$),表明土炒白术对UC小鼠的炎症因子水平具有显著的调节作用。见表5。

3.9 土炒白术对UC小鼠结肠组织中肠黏膜屏障相关mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组小鼠结肠组织中肠黏膜机械屏障相关蛋白ZO-1、Occludin和Claudin-1及化学屏障相关蛋白FFAR3

表 5 白术土炒前后对 UC 小鼠血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | IFN- γ | TNF- α | IL-17 | IL-18 |
|-------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 空白组 | | 375.85±45.33 | 213.03±61.05 | 19.30±5.15 | 62.46±14.10 |
| 模型组 | | 655.91±36.72 ²⁾ | 458.96±75.19 ²⁾ | 33.88±7.19 ²⁾ | 115.26±11.03 ²⁾ |
| 阳性药组 | 1.59 | 367.82±50.21 ⁴⁾ | 230.46±46.64 ⁴⁾ | 16.92±5.34 ⁴⁾ | 67.19±16.59 ⁴⁾ |
| 白术组 | 4.55 | 569.47±62.87 | 408.20±77.50 | 27.97±6.24 ³⁾ | 102.77±6.61 |
| 清炒白术组 | 4.55 | 532.26±53.28 ³⁾ | 361.34±56.67 ³⁾ | 27.94±6.07 ³⁾ | 82.90±11.79 ⁴⁾ |
| 灶心土组 | 0.001 | 557.85±41.22 | 380.66±45.15 ³⁾ | 28.60±5.95 ³⁾ | 118.29±18.63 |
| 土炒白术组 | 4.55 | 444.51±81.02 ⁴⁾ | 311.38±74.14 ⁴⁾ | 23.54±4.64 ⁴⁾ | 95.93±12.95 ⁴⁾ |

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | sIgA | TGF- β | IL-4 | IL-10 |
|-------|-----------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白组 | | 26.20±2.07 | 383.32±42.27 | 145.04±13.68 | 274.84±43.18 |
| 模型组 | | 13.26±1.14 ²⁾ | 642.18±41.44 ²⁾ | 102.73±13.45 ²⁾ | 133.71±44.21 ²⁾ |
| 阳性药组 | 1.59 | 24.36±2.75 ⁴⁾ | 376.35±51.25 ⁴⁾ | 148.77±15.16 ⁴⁾ | 253.35±25.31 ⁴⁾ |
| 白术组 | 4.55 | 15.76±2.66 | 563.69±60.16 | 105.90±7.74 | 164.91±47.24 |
| 清炒白术组 | 4.55 | 15.12±3.18 ⁴⁾ | 535.59±53.18 ³⁾ | 127.07±11.55 ⁴⁾ | 192.16±45.65 ⁴⁾ |
| 灶心土组 | 0.001 | 16.59±2.42 ⁴⁾ | 586.99±32.51 | 133.20±10.10 ³⁾ | 182.35±46.10 ³⁾ |
| 土炒白术组 | 4.55 | 16.93±3.37 ⁴⁾ | 437.92±73.21 ⁴⁾ | 143.02±14.02 ⁴⁾ | 231.69±48.01 ⁴⁾ |

和 MUC2 的 mRNA 表达均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组均能在一定程度上升高上述蛋白的基因表达量, 除阳性药组外, 尤以土炒白术的

作用最强 ($P < 0.01$), 表明土炒白术对 UC 小鼠肠黏膜屏障中机械屏障及化学屏障功能具有显著的调节作用。见表 6。

表 6 白术土炒前后对 UC 小鼠结肠组织中肠黏膜屏障相关 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | MUC2 | ZO-1 | Occludin | Claudin-1 | FFAR3 |
|-------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 1.28±0.14 | 0.99±0.12 | 1.47±0.06 | 0.98±0.21 | 1.52±0.12 |
| 模型组 | | 0.25±0.01 ²⁾ | 0.24±0.13 ²⁾ | 0.63±0.09 ²⁾ | 0.29±0.14 ²⁾ | 0.47±0.03 ²⁾ |
| 阳性药组 | 1.59 | 0.93±0.03 ⁴⁾ | 0.76±0.04 ⁴⁾ | 1.18±0.10 ⁴⁾ | 0.49±0.11 ³⁾ | 1.15±0.11 ⁴⁾ |
| 白术组 | 4.55 | 0.87±0.05 ⁴⁾ | 0.32±0.10 | 0.86±0.04 ³⁾ | 0.41±0.05 | 0.82±0.06 ⁴⁾ |
| 清炒白术组 | 4.55 | 0.69±0.72 ⁴⁾ | 0.45±0.03 ³⁾ | 0.63±0.11 | 0.65±0.10 ⁴⁾ | 0.67±0.04 ³⁾ |
| 灶心土组 | 0.001 | 0.48±0.03 ³⁾ | 0.27±0.11 | 0.71±0.04 ³⁾ | 0.28±0.12 | 0.49±0.02 |
| 土炒白术组 | 4.55 | 1.03±0.12 ⁴⁾ | 0.69±0.09 ⁴⁾ | 0.95±0.16 ⁴⁾ | 0.69±0.07 ⁴⁾ | 0.98±0.13 ⁴⁾ |

3.10 土炒白术对 UC 小鼠结肠组织中肠黏膜屏障相关蛋白表达的影响 通过对各组小鼠结肠组织中肠黏膜屏障相关蛋白表达水平进行分析。结果发现, 与空白组比较, 模型组小鼠结肠组织中肠黏膜机械屏障相关蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 及化学屏障相关蛋白 FFAR3 和 MUC2 的表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组均能在一定程度上升高上述蛋白的表达量, 整体上以土炒白术的作用最强 ($P < 0.05, P < 0.01$), 表明土炒白术对 UC 小鼠肠黏膜屏障中机械屏障及化学屏障功能具有显著的调节作用, 详细结果见图 5 和表 7。

3.11 土炒白术对 UC 小鼠肠道菌群结构与多样性的影响

3.11.1 肠道菌群的多样性分析 Shannon 和

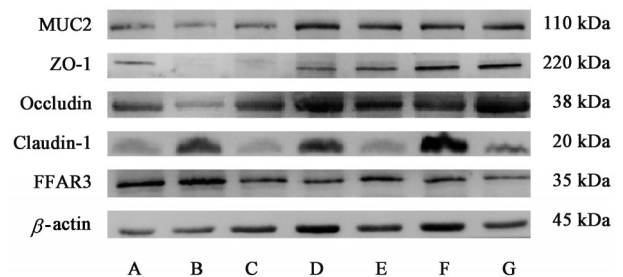


图 5 各组小鼠结肠组织中肠黏膜屏障相关蛋白的表达电泳
Fig. 5 Expression electrophoresis of intestinal mucosal barrier related proteins in colon tissue of mice in each group

Simpson 指数是 2 个常用的均匀度指标, 多用于衡量不同微生物物种在样本中的相对丰度分布是否均匀; Chao1 和 ACE 指数则是常用的丰富度指标, 用于衡量样本中存在的不同微生物物种的数量。

表 7 白术土炒前后对 UC 小鼠结肠组织中肠黏膜屏障相关蛋白的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of AMR before and after soil stir-frying on intestinal mucosal barrier related proteins in colon tissue of UC mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | MUC2 | ZO-1 | Occludin | Claudin-1 | FFAR3 |
|-------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 1.01±0.34 | 0.92±0.25 | 0.80±0.12 | 0.94±0.15 | 0.92±0.34 |
| 模型组 | | 0.66±0.23 ¹⁾ | 0.35±0.23 ²⁾ | 0.24±0.11 ²⁾ | 0.34±0.20 ²⁾ | 0.46±0.16 ²⁾ |
| 阳性药组 | 1.59 | 0.85±0.15 ³⁾ | 0.72±0.13 ⁴⁾ | 0.69±0.06 ⁴⁾ | 0.70±0.15 ⁴⁾ | 0.65±0.27 ³⁾ |
| 白术组 | 4.55 | 0.71±0.36 ³⁾ | 0.39±0.20 | 0.40±0.15 ³⁾ | 0.47±0.09 | 0.44±0.19 |
| 清炒白术组 | 4.55 | 0.87±0.72 | 0.53±0.13 ³⁾ | 0.28±0.21 | 0.50±0.18 ³⁾ | 0.61±0.25 ³⁾ |
| 灶心土组 | 0.001 | 0.72±0.03 ³⁾ | 0.41±0.10 | 0.32±0.21 | 0.27±0.07 | 0.48±0.14 |
| 土炒白术组 | 4.55 | 0.98±0.12 ⁴⁾ | 0.69±0.08 ⁴⁾ | 0.57±0.12 ³⁾ | 0.67±0.11 ⁴⁾ | 0.67±0.17 ³⁾ |

结果显示,各组小鼠 Shannon 和 Simpson 指数差异性较小,说明肠道微生物物种丰度分布较均匀;与空白组比较,模型组 Chao1 和 ACE 指数有上升趋势,说明 UC 可能引起肠道微生物物种的复杂性增加,改变了肠道菌群的群落组成。各给药组中,土炒白术可恢复模型动物紊乱的肠道菌群情况。肠道菌群 Beta 多样性分析包括 PCA 及 PCoA,结果显示空白组与模型组分别分布于象限的不同区域,且距离较大,表明二者的肠道菌群组成具有差异。尤其 PCoA 结果表明,经药物治疗后,各给药组均有向空白组靠近的趋势。其中,清炒白术组、灶心土组和土炒组白术趋势更明显,且彼此具有包含关系,这也与其他药效实验结果相一致。见增强出版附加材料。

3.11.2 肠道菌群的组成分析 在门水平上,各组小鼠的肠道菌群主要由厚壁菌门 Firmicutes、拟杆菌门 Bacteroidota 和弯曲杆菌门 Campylobacterota 组成,与空白组比较,模型组 Firmicutes 相对丰度增加, Bacteroidota、Campylobacterota 相对丰度减少;在属水平上,各组动物肠道菌群的种类及丰度也具有明显差异。与空白组比较,模型组中 *Turicibacter*、*Clostridia*_UCG-014 和梭状芽孢杆菌属 *Clostridium* 等菌群的相对丰度升高, *Candidatus*_ *Saccharimonas*、HT002、幽门螺杆菌属 *Helicobacter*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio* 等菌群的相对丰度降低。各给药组均能对模型动物肠道菌群的种类和丰度进行调整,尤其是在属水平上对双歧杆菌属 *Bifidobacterium*、毛螺菌属 *Muribaculum* 和 *Clostridium* 等菌群丰度的调整作用较为明显。其中,各给药组中又以土炒白术组的调节作用最明显。此外,门、属水平的种群分布情况显示,模型组与空白组在门、属水平的种群覆盖度均存在差异,且各给药组均能显著减低这种差异性,其中又以土炒白术组的作用最明显。这也表明 DSS 诱导的 UC

小鼠肠道内属水平的菌群结构发生变化,土炒白术能够调节模型动物肠道菌群的结构。见增强出版附加材料。

3.11.3 肠道菌群的 LEfSe 通过分析各组小鼠肠道菌群的多级物种层级聚类树,在空白组中鉴定出 12 个类群, *s_Lactobacillus*、*f_Atopobiaceae*、*s_Otseella*、*g_Otseella* 和 *f_Erysiplacrichaceae* 等为相对占比丰度较高的优势菌群。而 *s_Lachnospiraceae*_NK4A13、*g_Lachnospiraceae*_NK4A136、*o_Lachnospirales* 和 *f_Lachnospiraceae* 等 14 个分类群在模型组中丰度较高。虽然各给药组动物肠道的种群分类情况均有不同变化。但均有将优势菌群向空白组调整的趋势。其中,土炒白术组作用相对更为明显。见增强出版附加材料。

3.12 土炒白术对 UC 小鼠粪便中 SCFAs 含量的影响 与空白组比较,模型组动物粪便中乙酸水平显著升高 ($P<0.01$),异丁酸、丁酸、异戊酸、戊酸和己酸的含量显著降低 ($P<0.01$),表明模型动物肠道内 SCFAs 代谢受到影响;与模型组比较,各给药组均可显著调控丙酸、异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸的水平,阳性药组和土炒白术组可显著调控乙酸水平。见表 8。

4 讨论

本研究通过构建“微观表征-化学分析-药效评价”三位一体的研究模式,针对白术土炒前后的微观结构和化学成分的变化情况进行表征,并对不同白术炮制品对 UC 小鼠的治疗作用进行系统的比较。SEM 观察土炒白术饮片表面的微观结构也发现,白术经土炒后表面多有气泡状膨起,推测为高温条件下白术饮片内淀粉膨化所致,而这些气泡状膨起也证明土炒白术饮片的质地发生了显著的变化,有利于有效成分的煎出,此外土炒白术表面可见大量灶心土残留,表明灶心土确实是土炒白术发挥药效作用的物质基础之一。尤其是灶心土表面

表 8 白术土炒前后对 UC 小鼠粪便中 SCFAs 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 乙酸 | 丙酸 | 异丁酸 | 丁酸 | 异戊酸 | 戊酸 | 己酸 |
|-------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 空白组 | | 2 679.85±22.34 | 27.63±5.21 | 107.84±9.65 | 131.37±11.21 | 4.17±0.33 | 29.94±4.20 | 4.70±0.35 |
| 模型组 | | 3 515.69±34.99 ²⁾ | 27.60±6.37 | 75.13±6.33 ²⁾ | 80.35±7.35 ²⁾ | 2.62±1.21 ⁴⁾ | 11.33±2.96 ²⁾ | 2.61±0.67 ²⁾ |
| 阳性药组 | 1.59 | 5 214.06±62.85 ⁴⁾ | 41.84±2.95 ⁴⁾ | 121.06±8.35 ⁴⁾ | 151.49±11.24 ⁴⁾ | 4.31±0.52 ⁴⁾ | 26.61±3.21 ⁴⁾ | 2.10±0.32 |
| 白术组 | 4.55 | 8 247.16±47.82 ⁴⁾ | 38.30±5.16 ⁴⁾ | 97.80±6.13 ⁴⁾ | 117.13±10.21 ⁴⁾ | 4.01±0.93 ⁴⁾ | 22.76±5.38 ⁴⁾ | 1.51±0.15 |
| 清炒白术组 | 4.55 | 4 389.26±102.37 | 45.01±6.28 ⁴⁾ | 102.18±11.79 ⁴⁾ | 108.21±12.33 ⁴⁾ | 4.47±1.03 ⁴⁾ | 19.22±5.29 ⁴⁾ | 2.22±0.51 |
| 灶心土组 | 0.001 | 3 244.79±65.21 | 39.32±3.21 ⁴⁾ | 99.06±6.22 ⁴⁾ | 95.19±8.55 ⁴⁾ | 3.89±0.67 ⁴⁾ | 18.08±3.46 ⁴⁾ | 1.02±0.23 |
| 土炒白术组 | 4.55 | 8 181.06±39.48 ⁴⁾ | 38.18±3.87 ⁴⁾ | 124.55±8.27 ⁴⁾ | 108.70±7.62 ⁴⁾ | 4.29±0.54 ⁴⁾ | 21.02±3.25 ⁴⁾ | 2.52±2.27 |

多裂隙和褶皱的结构可增强在肠道内对水分的吸附作用,从而增强“止泻”作用。此外,本研究在 SEM 分析的基础上,采用 SEM-EDS 技术对土炒白术饮片的元素组成进行分析。结果发现,土炒白术相较于生白术饮片的 Si、Al、Mg、Ca 等元素含量显著升高,这些元素又均在辅料灶心土中丰度较高。现代研究表明,含 Al、Mg、Ca 等元素的盐可吸附肠道内的分泌液、刺激性物质或毒素从而发挥止泻的作用^[14]。由此可见,土炒可改变白术饮片和辅料灶心土的微观结构,增强对有效成分的溶解度和有毒物质的吸附作用;同时,辅料灶心土也是土炒白术饮片发挥功效的重要组成部分,这也印证了土炒白术“挂土增香”的合理性。

中药化学成分是发挥药效作用的物质基础。现代研究表明,白术中富含倍半萜类、多酚类、香豆素类、聚乙炔类和黄酮类等多种类型的化合物。这些化合物具有调节胃肠道、抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤、保肝、保护心血管和神经系统等广泛的药理作用^[15-16]。白术炮制过程中的氧气、温度和辅料等因素均会对上述成分的组成及含量产生影响从而令白术饮片的外观性状及功效作用产生变化^[17-19]。对白术土炒前后的化学成分进行分析发现,倍半萜类成分是白术土炒前后变化最明显的化合物。实际上,以白术内酯为代表的倍半萜类化合物作为白术中主要的化学成分,具有抗炎、抗氧化、促进胃肠运动和提高机体免疫力等作用^[20],也是白术质量控制和活性评价的重要指标^[21]。倍半萜类化合物本身的结构不稳定,尤其是在高温条件下容易发生氧化、分解,有研究者根据白术炮制前后倍半萜类成分及健脾作用的变化规律还提出了白术炮制“减酮减燥,增酯增效”的炮制理论^[22]。此外,多元酚酸类成分在白术炮制前后的含量变化也较明显。以绿原酸为代表的多元酚酸类成分具有抗炎、抗氧化和抑菌等作用^[23-24],也是控制白术饮片质量的重要指标^[25]。这两类成分在炮制过程中的变化

使得白术抗炎、抗氧化及调节胃肠功能等方面的作用受到影响,这或是其土炒后“健脾止泻”作用增强的重要原因。

现代研究表明,肠黏膜屏障异常在 UC 的发生发展中起着至关重要的作用。肠黏膜屏障由生物屏障、化学屏障、机械屏障和免疫屏障 4 部分组成,以协调的方式阻止抗原、毒素和微生物副产物的通过,同时保持上皮屏障、免疫系统的正常发育及对肠道微生物群耐受性的获得,当这个防御系统遭到破坏,肠黏膜屏障受损时,会释放大量炎症因子,继而诱发肠上皮细胞凋亡、紧密连接蛋白异常表达和肠道菌群改变等病理变化,最终导致肠道炎症的发生^[26-28]。因此,维持肠黏膜屏障的稳定对于溃疡性结肠炎的治疗具有重要意义。本研究中,UC 小鼠经生、制白术干预后,sIgA 水平显著升高,表明生、制白术可以通过调节 sIgA 水平,改善机体免疫稳态,从而有效改善 UC 状态下的免疫功能紊乱,增强肠道免疫屏障的功能。二者还可以显著促进 UC 小鼠结肠组织中 ZO-1、Occludin、Claudin-1 mRNA 及蛋白的表达,从而有效修复 UC 导致的肠黏膜受损,并提高肠道通透性,进而发挥增强肠黏膜机械屏障的作用,并且显著升高 MUC2 mRNA 及蛋白的表达,说明生、制品白术可以通过调节 MUC2 蛋白的表达,增强肠黏膜化学屏障。研究表明,UC 小鼠肠道菌群结构显著改变,肠道菌群多样性指数明显降低,益生菌明显减少(如乳杆菌、双歧杆菌等),致病菌增多,其释放的肠毒素可导致肠上皮通透性增加,破坏肠道屏障完整性,扰乱抗炎/促炎细胞因子的平衡,释放大量炎症介质,激活肠道黏膜的免疫活性,使小肠黏膜隐窝细胞分泌功能增强而出现腹泻^[29]。本研究发现,生、制白术均可调节 UC 小鼠肠道菌群的结构与多样性,使模型动物的肠道菌群趋于空白组,从而在维持肠黏膜屏障方面发挥作用。同时,SCFAs 作为肠道菌群代谢物,在维持肠道屏障

功能方面也具有重要作用,SCFA的产生减少可使肠道免疫紊乱,屏障功能下降,成为诱发UC炎症的重要因素^[30]。本研究发现,经白术干预后UC小鼠肠道中降低的异丁酸、丁酸、异戊酸和戊酸含量都有所提升,表明生、制白术可以通过提高SCFAs的含量,进而调节肠道免疫功能、恢复肠黏膜通透性,以达到增强肠黏膜屏障的作用。综合各组对UC模型动物肠黏膜屏障损伤的修复作用。其中,白术清炒品及土炒品的作用较生品更强,这或与白术炮制后具有抗炎作用的倍半萜类成分含量增加有关。土炒白术与清炒白术间调节肠黏膜屏障损伤的药效作用虽相似,但整体以土炒白术稍强,这或与土炒和清炒的炮制温度不同,对倍半萜和多元酚酸类的影响不同有关。此外,辅料灶心土也呈现出一定的保护肠黏膜屏障的作用。因此,土炒白术的药效作用应是白术经加热改变化学成分与辅料灶心土形成的综合作用。

综上,本文建立了“微观表征-化学分析-药效评价”三位一体的研究模式,并揭示了土炒白术“健脾止泻”作用增强是白术土炒过程中加热和灶心土的双重作用,这对于白术生、制饮片炮制工艺的优化和临床合理用药均具有参考价值。但是,本文仅对白术土炒前后的微观结构、化学成分及药效作用的变化情况进行了比较,未对白术土炒过程中上述情况进行系统的观察,未来还需开展相关研究,从而为深入解析白术土炒的炮制原理提供理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 袁星,杨添钧,黎量,等. 中药炮制用辅料的现状及对策[J]. 中药与临床,2015,6(1):62-64.
YUAN X, YANG T J, LI L, et al. Current situation and countermeasures for TCM processing excipient [J]. Pharm Clinics Chin Mater Med,2015,6(1):62-64.
- [2] 张玮焯,曾敬其,宋金菁,等. 炮制辅料“酒醋盐蜜”关联的特征组分解析及其应用:以蜜炙黄芪为例[J]. 药学报,2024,59(6):1819-1827.
ZHANG W Y, ZENG J Q, SONG J J, et al. Analysis and application of the characteristic components associated with the processing excipients "wine, vinegar, salt, honey": A case study of honey-processed Astragali Radix[J]. Acta Pharm Sin, 2024,59(6):1819-1827.
- [3] 杨春雨,曹晖,王孝涛,等. 我国炮制用辅料标准现状研究及工作建议[J]. 中国中药杂志,2017,42(7):1401-1406.
YANG C Y, CAO H, WANG X T, et al. Status and suggestions for adjuvant standard for Chinese materia medica processing in China [J]. Chin J Chin Mater Med,2017,42(7):1401-1406.
- [4] 吴鑫,陈翠微,余乔,等. 浙派特色炮制品九蒸九制白术的多维全息表征[J]. 中国实验方剂学杂志,2026,32(6):197-205.
WU X, CHEN C W, YU Q, et al. Multi-dimensional holographic characterization of Zhejiang characteristic Atractylodis Macrocephalae Rhizoma with nine-time repeating steaming and processing[J]. Chin J Exp Tradit Med Form,2026,32(6):197-205.
- [5] 贾天柱. 中药炮制学[M]. 2版. 上海:上海科学技术出版社,2013:105-106.
JIA T Z. Zhongyaopaozhixue [M]. 2nd Edition. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers,2013:105-106.
- [6] 车锦祥,马海璇,曾海成,等. 基于数据挖掘分析麸炒白术、土白术和白术用药规律[J]. 今日药学,2024,34(12):916-922.
CHE J X, MA H X, ZENG H C, et al. Medication rule analysis of bran-fried Atractylodis Macrocephalae Rhizoma, soil-fried Atractylodis Macrocephalae Rhizoma and Atractylodis Macrocephalae Rhizoma based on data mining [J]. J Today Pharm,2024,34(12):916-922.
- [7] 李亚飞,汤璐璐,唐瑞,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS法分析麸炒白术炮制前后差异性化学成分[J]. 中成药,2023,45(8):2774-2781.
LI Y F, TANG L L, TANG R, et al. Based on UPLC-Q-TOF-MS to analyze differential chemical components of bran-fried Atractylodes macrocephala before and after processing [J]. Chin Tradit Pat Med,2023,45(8):2774-2781.
- [8] 张磊,任榕霞,丁宁,等. HPLC多波长切换指纹图谱结合化学计量学研究白术土炒前后成分变化规律[J]. 药学研究,2024,43(2):154-158.
ZHANG L, REN R X, DING N, et al. Comparative study of Atractylodis Macrocephalae Rhizome before and after stir-baking with soil based on HPLC multi-wavelength switching fingerprint combined with chemical pattern recognition [J]. J Pharm Res,2024,43(2):154-158.
- [9] 湖北省药品监督管理局. 湖北省中药饮片炮制规范[M]. 北京:中国医药科技出版社,2019.
Hubei Provincial Drug Administration. Chinese medicine decoction pieces processing specification of Hubei province [M]. Beijing:China Medical Science Press,2019.
- [10] 张慧,高岩,熊慧,等. 采用扫描电镜-能谱仪比较水飞法、水洗法及干研法对雄黄饮片质量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(11):22-26.
ZHANG H, GAO Y, XIONG H, et al. Effect of water-flying, water-washing and dry grinding methods on quality of Realgar decoction pieces by SEM-EDS [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul,2018,24(11):22-26.
- [11] 栗嘉淇,尹磊,郑威,等. 六神曲多糖提取工艺优化及其抗溃疡性结肠炎作用研究[J]. 中成药,2024,46(1):232-237.
LI J Q, YIN L, ZHENG W, et al. Optimization of extraction process of Liushenqu polysaccharides and its anti-ulcerative colitis effect[J]. Chin Tradit Pat Med,2024,46(1):232-237.
- [12] 王婷婷,曹欣垚,马贝贝,等. 香连止泻片对溃疡性结肠炎小

- 鼠 Th17/Treg 免疫轴的影响[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(12):6690-6694.
- WANG T T, CAO X Y, MA B B, et al. Effect of Xianglian Zhixie tablets on Th17/Treg immune axis in mice with ulcerative colitis [J]. Chin J Tradit Med, 2024, 39(12):6690-6694.
- [13] LIU L L, HAN X Y, SHAN G S, et al. Mechanism difference of ginseng medicines with different natures on hyperthyroidism [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(2): 117194.
- [14] 马瑜璐, 房方, 刘圣金, 等. 矿物类中药止泻药理作用及临床应用研究进展[J]. 中国现代中药, 2022, 24(11):2260-2268.
- MA Y L, FANG F, LIU S J, et al. Mechanisms of anti-diarrhea mineral Chinese medicine and the clinical application: A review[J]. Chin Mod Chin Med, 2022, 24(11):2260-2268.
- [15] ZHU B, ZHANG Q L, HUO J W, et al. The traditional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Atractylodes macrocephala* Koidz. : A review[J]. J Ethnopharmacol, 2018, 226:143-167.
- [16] LUO W, ZHANG K, WANG Y, et al. The Rhizome of *Atractylodes macrocephala* Koidz. : A comprehensive review on the traditional uses, phytochemistry and pharmacology[J]. Chem Biodivers, 2025, 22(3):e202401879.
- [17] 李亚飞, 汤璐璐, 赵明方, 等. 基于 Heracles NEO 超快速气相电子鼻麸炒白术炮制全过程气味变化识别研究[J]. 中草药, 2023, 54(15):4812-4822.
- TANG Y F, TANG L L, ZHAO M F, et al. Identification of odor changes in whole process of *Atractylodes Macrocephalae* Rhizoma processing based on Heracles NEO ultra-fast gas phase electronic nose[J]. Chin Herb Med, 2023, 54(15):4812-4822.
- [18] 吴晓莹, 张安然, 杨丹阳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析白术及其不同炮制品化学成分及其差异[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(10):2395-2403.
- WU X Y, ZHANG A R, YANG D Y, et al. Analysis of chemical components and differences in *Atractylodes Macrocephalae* Rhizoma and its different processed products based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2023, 34(10): 2395-2403.
- [19] 张靖年, 毕晓黎, 胥爱丽, 等. 基于 UPLC 指纹图谱结合化学模式识别的白术炮制前后成分对比研究[J]. 中药材, 2024, 47(11):2746-2750.
- ZHANG J N, BI X L, XU A L, et al. Comparative study of components before and after processing of *Atractylodes macrocephala* based on UPLC fingerprint combined with chemical pattern recognition[J]. Chin Med Mat, 2024, 47(11): 2746-2750.
- [20] XIE Z Y, LIN M Q, HE X L S, et al. Chemical constitution, pharmacological effects and the underlying mechanism of atractylenolides: A review[J]. Molecules, 2023, 28(10):3987.
- [21] 周云, 盛云杰, 李城燕, 等. 白术中内酯成分及其质量评价的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(8):1142-1150.
- ZHOU Y, SHENG Y J, LI C Y, et al. Research progress of lactone components and quality evaluation of *Atractylodes macrocephala* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2024, 41(8):1142-1150.
- [22] 赵文龙, 吴慧, 单国顺, 等. 麸炒白术“减酮减燥, 增酯增效”炮制理论的再印证[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20):3493-3497.
- ZHAO W L, WU H, SHAN G S, et al. Verification of processing theory of "reducing ketone and dryness, and increasing ester and effect" for bran-fried *atractylodes* [J]. Chin J Chin Mater Med, 2013, 38(20):3493-3497.
- [23] 齐怀远, 李钟, 许巧欣, 等. 绿原酸对气道炎症损伤调控作用的实验研究[J]. 中药材, 2023, 46(5):1290-1295.
- QI H Y, LI Z, XU Q X, et al. Experimental study on regulatory effect of chlorogenic acid on airway inflammatory injury[J]. J Chin Med Mater, 2023, 46(5):1290-1295.
- [24] 陈治民, 李翠, 韦继天, 等. 绿原酸生物合成调控及其应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2024, 40(1):57-71.
- CHEN Z M, LI C, WEI J T, et al. Research progress on regulation of chlorogenic acid biosynthesis and its application [J]. Biotechnol Bull, 2024, 40(1):57-71.
- [25] 张文芳, 胡梅, 陈锦霞, 等. UPLC法测定不同产地白术中绿原酸、绿原酸和隐绿原酸的含量[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(4):479-483.
- ZHANG W F, HU M, CHEN J X, et al. Simultaneous determination of neochlorogenic acid, chlorogenic acid and cryptochlorogenic acid in *Atractylodes Macrocephalae* Rhizome from different habitats by UPLC [J]. Acad J Guangdong Coll Pharm, 2020, 36(4):479-483.
- [26] 黄茂光, 谢胜, 王金鑫, 等. 中药调节肠道菌群治疗溃疡性结肠炎的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(2):267-275.
- HUANG M G, XIE S, WANG J X, et al. Chinese medicine in treatment of ulcerative colitis by regulating intestinal flora: A review[J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2024, 30(2):267-275.
- [27] 谢军, 张溪, 李昌林. 基于肠黏膜屏障修复中医药治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(6):177-182.
- XIE J, ZHANG X, LI CL. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of ulcerative colitis based on repairing the intestinal mucosal barrier[J]. J Liaoning Univ of Chin Med, 2025, 27(6):177-182.
- [28] 李志华, 罗青, 王曦旻, 等. 升麻水提物对溃疡性结肠炎小鼠肠黏膜的保护作用[J]. 中成药, 2025, 47(7):2221-2228.
- LI Z H, LUO Q, WANG X Y, et al. Protective effects of aqueous extract of *Cimicifugae Rhizoma* on intestinal mucosa of ulcerative colitis mice[J]. Chin Tradit Pat Med, 2025, 47(7):2221-2228.
- [29] MOHSENI A H, CASOLARO V, KEYVANI H, et al. Modulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by probiotics as a fruitful target for orchestrating the immune response[J]. Gut Microbes, 2021, 13(1):1-17.
- [30] SHIN Y, HAN S, KWON J, et al. Roles of short-chain fatty acids in inflammatory bowel disease[J]. Nutrients, 2023, 15(20):4466.

[责任编辑 吕冬梅]