

· 药 学 基 础 ·

## 赤箭和天麻调节免疫功能和肠道菌群作用比较

席蕴文<sup>1,2</sup>, 康利平<sup>2</sup>, 孙建辉<sup>3</sup>, 程铭恩<sup>4</sup>, 李洪梅<sup>3\*</sup>, 黄璐琦<sup>1,2\*</sup>

(1. 南京中医药大学药学院, 南京 210023; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700;  
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 4. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012)

**[摘要]** 目的:对赤箭(天麻地上部分)和天麻中腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷B和A的成分含量,以及赤箭水提液和天麻水提液调节免疫功能和肠道菌群作用进行比较,评价赤箭进一步研究和开发的可行性。方法:采用超高效液相色谱法(UPLC)测定6种成分的含量,流动相0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)梯度洗脱(0~4 min, 0.5%B; 4~5 min, 0.5%~2%B; 5~10 min, 2%~15%B; 10~12 min, 15%~20%B; 12~15 min, 20%~95%B; 15~17 min, 95%B; 17~17.5 min, 95%~0.5%B; 17.5~20 min, 0.5%B),流速0.5 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长270 nm。采用环磷酸腺苷小鼠免疫功能低下模型,测定廓清指数、校正廓清指数及外周血象,采用体外淋巴细胞转化试验测定B淋巴细胞增殖,基于16S rDNA技术测定肠道菌群并进行生物信息学分析,对赤箭水提液和天麻水提液进行药理活性比较。结果:赤箭粉末、醇提液中6个成分总量分别高于天麻粉末,醇提液,赤箭水提液和天麻水提液中6个成分含量总和相近,且赤箭粉末和天麻粉末中天麻素和对羟基苯甲醇总量均符合2020年版《中华人民共和国药典》的相关要求。与空白组比较,赤箭水提液中剂量(10 g·kg<sup>-1</sup>)组和天麻水提液中、低剂量(10, 5 g·kg<sup>-1</sup>)组可明显增加免疫功能低下小鼠的廓清指数( $P<0.05$ );赤箭水提液、天麻水提液高剂量组(20 g·kg<sup>-1</sup>)均可明显增高外周血中红细胞和红细胞压积水平( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );400 g·L<sup>-1</sup>天麻水提液和100 g·L<sup>-1</sup>赤箭水提液对脂多糖诱导的B淋巴细胞增殖具有促进作用。肠道菌群研究显示,与空白组比较,在门水平上,赤箭水提液和天麻水提液增加拟杆菌门的相对丰度,降低厚壁菌门的相对丰度;在属水平上,赤箭水提液、天麻水提液均可增加 *Prevotellaceae*\_UCG-001 和 *Ruminococcaceae*\_UCG-005 的相对丰度,降低厌氧棍状菌属, *unclassified\_f\_Erysipelotrichaceae* 和 *Candidatus\_Stoquefichus* 的相对丰度,这些肠道菌与免疫系统、细胞增殖、调节代谢等相关。结论:赤箭粉末、醇提液、水提液所测腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷B和A总量高于或者接近于天麻相应样品;赤箭水提液与天麻水提液药理活性相似,提示赤箭值得进一步研究与开发。

**[关键词]** 天麻; 赤箭; 脂多糖(LPS); 超高效液相色谱法(UPLC); 免疫功能; 肠道菌群; 化学成分

**[中图分类号]** R378.2; R392; R28; O657.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)12-0117-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20211449

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210413.0918.002.html>

**[网络出版日期]** 2021-4-13 11:09

### Comparison of Effect of Chijian and Gastrodiae Rhizoma on Regulating Immune Function and Intestinal Microflora

XI Yun-wen<sup>1,2</sup>, KANG Li-ping<sup>2</sup>, SUN Jian-hui<sup>3</sup>, CHENG Ming-en<sup>4</sup>, LI Hong-mei<sup>3\*</sup>, HUANG Lu-qi<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;

2. National Resource Center for Chinese Materia Medica,

China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,

China; 4. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

**[收稿日期]** 20210117(009)

**[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302)

**[第一作者]** 席蕴文,在读硕士,从事中药学研究,E-mail:2932088632@qq.com

**[通信作者]** \*黄璐琦,研究员,博士生导师,从事中药资源与分子生药学研究,E-mail:huangluqi01@126.com;

\*李洪梅,研究员,从事中药药理研究及新药开发,E-mail:lihm2006@sina.cn

**[Abstract]** **Objective:** To compare the contents of adenosine, gastrodin, *p*-hydroxybenzyl alcohol, *p*-hydroxybenzaldehyde, parisinin B and parisinin A in Chijian (the aerial part of *Gastrodia elata*) and *Gastrodiae* Rhizoma, and compare their effects on immune function and intestinal microflora, evaluating whether it is necessary to study and develop Chijian. **Method:** The contents of these six constituents were determined by ultra performance liquid chromatography (UPLC), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution (A)-acetonitrile (B) for gradient elution (0-4 min, 0.5%B; 4-5 min, 0.5%-2%B; 5-10 min, 2%-15%B; 10-12 min, 15%-20%B; 12-15 min, 20%-95%B; 15-17 min, 95%B; 17-17.5 min, 95%-0.5%B; 17.5-20 min, 0.5%B), the flow rate was 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, the detection wavelength was 270 nm. The difference of pharmacological activity of water extracts of Chijian and *Gastrodiae* Rhizoma was compared, the clearance index, corrected clearance index and peripheral blood were measured in mice model with low immune function induced by cyclophosphamide, B lymphocyte proliferation was determined by lymphocyte transformation test *in vitro*, intestinal microflora was analyzed by 16S rDNA technology and bioinformatics was conducted. **Result:** The total contents of these six components in powder and ethanol extract of Chijian were higher than that of *Gastrodiae* Rhizoma, but the total contents of these six components in their water extract were similar, and the total contents of gastrodin and *p*-hydroxybenzyl alcohol met the requirements of the 2020 edition of *Chinese Pharmacopoeia*. Compared with the blank group, the clearance index of immunocompromised mice was significantly increased in the middle-dose (10 g·kg<sup>-1</sup>) group of Chijian water extract, middle- and low-dose (10, 5 g·kg<sup>-1</sup>) groups of *Gastrodiae* Rhizoma water extract ( $P<0.05$ ), the levels of erythrocyte and hematocrit in peripheral blood were significantly increased in the high-dose (20 g·kg<sup>-1</sup>) groups of water extracts of Chijian and *Gastrodiae* Rhizoma ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), water extract of *Gastrodiae* Rhizoma with concentration of 400 g·L<sup>-1</sup> and the water extract of Chijian with the concentration of 100 g·L<sup>-1</sup> could promote the proliferation of B lymphocytes induced by lipopolysaccharide. Studies on intestinal microflora showed that compared with the blank group, at the phylum level, the water extracts of Chijian and *Gastrodiae* Rhizoma increased the relative abundance of Bacteroidetes and decreased the relative abundance of Firmicutes, at the genus level, they increased the relative abundance of *Prevotellaceae*\_UCG-001 and *Ruminococcaceae*\_UCG-005, and decreased the relative abundance of *Anaerotruncus*, unclassified\_f\_ *Erysipelotrichaceae* and *Candidatus\_Stoquefichus*. These intestinal bacteria were related to the immune system, cell proliferation, and metabolism regulation. **Conclusion:** The total contents of 6 components in the powder, the ethanol and the water extracts of Chijian are higher than or close to those of the corresponding samples of *Gastrodiae* Rhizoma, the pharmacological activity of Chijian water extract is similar to that of *Gastrodiae* Rhizoma water extract, indicating that Chijian is worthy of further research and development.

**[Key words]** *Gastrodiae* Rhizoma; Chijian; lipopolysaccharide (LPS); ultra performance liquid chromatography (UPLC); immune function; intestinal microflora; chemical composition

天麻为大宗中药材,2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)<sup>[1]</sup> 记载天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的干燥块茎,采收季节为立冬后至次年清明前。古籍记载天麻除了块茎(根)入药,其地上茎(苗)也入药。《本草图经》<sup>[2]</sup> 赤箭一文曰:“……今三月、四月采苗,七月、八月、九月采根……而今方家乃并用根苗,各有收采时月……”。《本草衍义》<sup>[3]</sup> 注曰:“赤箭,天麻苗也。然与天麻治疗不同,故后人分之为二。经言八月采根曝干,故知此即苗也。”《证类本草》<sup>[4]</sup> 注曰:“然赤箭则言苗,

用之有自表入里之功;天麻则言根,用之有自内达外之理。”

近现代天麻地上部分入药较少<sup>[5-7]</sup>。杜红安等<sup>[8]</sup> 研究发现天麻地上部分天麻素的含量远比地下部分高,李慧慧<sup>[9]</sup> 从天麻地上部分分离得到21个化合物,比较了不同产地天麻药材的天麻素含量,但天麻地上部分(赤箭)药理活性研究尚未见报道,其药用价值和保健价值尚待发掘。有文献研究表明,天麻多糖和天麻苷可提高小鼠免疫功能<sup>[10-11]</sup>。基于此,本实验采用超高效液相色谱法(UPLC)同时测

定赤箭和天麻粉末、水提液、醇提液中腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷B和A含量,并比较二者水提液对小鼠免疫功能及肠道菌群的影响,评估赤箭进一步研究和开发的可行性。

## 1 材料

ACQUITY UPLC I-Class型超高效液相色谱系统(美国Waters公司),NewClassic MS-S型电子天平[梅特勒-托利多(上海)有限公司],5810R型离心机(德国Eppendorf公司),5922型冷冻离心机(日本Kubota公司),Epoch型酶标仪(美国BioTek公司),MCO-15AC型CO<sub>2</sub>培养箱(日本三洋公司),Milli-Q超纯水系统(美国密理博公司),GeneAmp 9700型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司),QuantiFluor-ST型蓝色荧光定量系统(美国Promega公司),MiSeq测序仪(美国Illumina公司)。

腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇对照品(中国食品药品检定研究院,批号分别为110807-201809,110807-201703,111970-201702,纯度依次为99.7%,95.5%,99.4%),对羟基苯甲醛、巴利森苷A和巴利森苷B对照品(成都普思生物科技股份有限公司,批号分别为PS010495,PS011141,PS011143,纯度均为99%),黄芪精(江苏聚荣制药集团有限公司,批号19050401),盐酸左旋咪唑片(山东仁和堂药业有限公司,批号200101),环磷酰胺(江苏盛迪医药有限公司,批号18100825),氯化钠注射液(石家庄四药有限公司,批号1904103204),RPMI-1640培养液[赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司,批号8119434],脂多糖(LPS, Sigma-Aldrich公司,批号057M4013V),噻唑蓝(MTT)溶液、印度墨汁及Hank's平衡盐溶液(Solarbio公司,批号分别为20201204,317N021,20191028),DNA抽提试剂盒E.Z.N.A<sup>®</sup> soil DNA kit(美国Omega公司,批号M9636020000k12T004),水为自制超纯水或纯净水,乙腈、甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯;鲜赤箭和鲜天麻采自陕西省宁陕县,经中国中医科学院黄璐琦研究员鉴定为兰科植物天麻*G. elata*的地上部分和块茎。

SPF级ICR小鼠,雌雄各半,体质量18~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产合格证号SCXK(京)2016-0006,饲养于屏障环境,室温20~27℃,相对湿度40%~70%,使用许可证号SYXK(京)2013-0035。本文所涉及动物实验经中国中医科学院中药研究所动物伦理委员会批准,批准号2019B008。

## 2 方法与结果

**2.1 赤箭和天麻的水提液、醇提液制备** 取赤箭和天麻鲜品各200 g,加8倍量水浸泡0.5 h,共煎煮提取2次,每次1.5 h,合并2次滤液,水浴浓缩,得生药质量浓度为1 g·mL<sup>-1</sup>的水提液<sup>[12]</sup>。取赤箭和天麻鲜品各200 g,加8倍量50%乙醇回流提取3次,提取时间分别为80,40,20 min,减压回收乙醇,水浴浓缩,得生药质量浓度为1 g·mL<sup>-1</sup>的醇提液<sup>[13]</sup>。

### 2.2 指标成分的含量测定

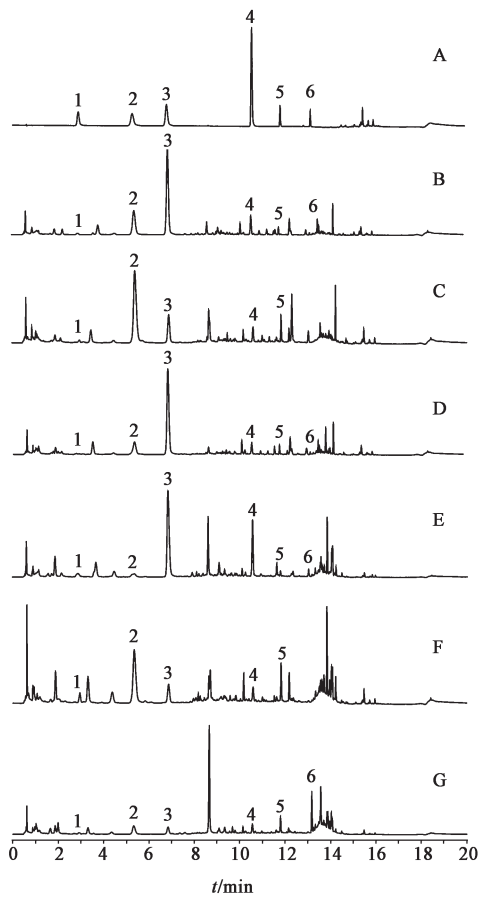
**2.2.1 色谱条件** ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm),流动相选择0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B)进行梯度洗脱(0~4 min,0.5%B;4~5 min,0.5%~2%B;5~10 min,2%~15%B;10~12 min,15%~20%B;12~15 min,20%~95%B;15~17 min,95%B;17~17.5 min,95%~0.5%B;17.5~20 min,0.5%B),流速0.5 mL·min<sup>-1</sup>,柱温35℃,进样量1 μL,检测波长270 nm。

**2.2.2 混合对照品溶液制备** 精密称取腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷A和B对照品适量,加50%甲醇分别制成单个对照品储备液(质量浓度均约2 g·L<sup>-1</sup>)。精密量取各对照品储备液适量,加50%甲醇配成每1 mL含腺苷13.00 μg,天麻素213.35 μg,对羟基苯甲醇87.97 μg,对羟基苯甲醛171.86 μg,巴利森苷B129.15 μg,巴利森苷A85.76 μg的混合对照品溶液,4℃保存备用。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取2.1项下天麻和赤箭的水提液、醇提液各2 mL,95℃水浴蒸干,加入50%甲醇10 mL,离心(13 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min,离心半径9.6 cm,下同),取上清液过0.22 μm微孔滤膜,供UPLC分析用。取赤箭和天麻鲜品适量,阴干,粉碎,过60目筛,得粉末样品。分别取天麻和赤箭粉末0.5 g,精密称定,用50%甲醇定容至10 mL,室温超声(频率40 kHz,功率120 W)60 min,离心,取上清液过0.22 μm微孔滤膜,供UPLC分析用。混合对照品溶液及供试品溶液的色谱图见图1。

**2.2.4 线性关系考察** 取2.2.2项下单个对照品储备液适量,稀释至系列质量浓度,按2.2.1项下色谱条件测定,以对照品的峰面积(Y)对相应质量浓度(X)进行线性回归,绘制标准曲线,以信噪比(S/N)=3计算检测限(LOD),S/N=10计算定量限(LOQ),见表1。结果发现6种成分在相应质量浓度范围内均与峰面积呈良好线性关系。

**2.2.5 精密度试验** 取同一混合对照品溶液,按2.2.1项下色谱条件连续进样6次,计算腺苷、天麻



A 混合对照品; B. 天麻粉末; C. 天麻水提液; D. 天麻醇提液; E. 赤箭粉末; F. 赤箭水提液; G. 赤箭醇提液; 1. 腺苷; 2. 天麻素; 3. 对羟基苯甲醇; 4. 对羟基苯甲醛; 5. 巴利森苷 B; 6. 巴利森苷 A

图1 天麻和赤箭样品的UPLC

Fig. 1 UPLC chromatograms of Gastrodiae Rhizoma and Chijian

素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 B 和 A 峰面积的 RSD 分别为 2.4%, 1.2%, 2.6%, 3.2%, 0.6%, 3.2%, 说明仪器精密度良好。

表1 天麻和赤箭中指标成分的线性关系考察

Table 1 Linear relationship of six components in Gastrodiae Rhizoma and Chijian

成分	回归方程	r	线性范围/mg·L <sup>-1</sup>	LOD/mg·L <sup>-1</sup>	LOQ/mg·L <sup>-1</sup>
腺苷	$Y=4\,111\,470.652X+6\,894.812$	0.999 4	20~200	0.50	0.80
天麻素	$Y=300\,869X+14\,318$	0.999 0	50~2\,000	5.00	15.00
对羟基苯甲醇	$Y=1\,156\,425.072X-2\,364.164$	1.000 0	10~800	1.00	3.90
对羟基苯甲醛	$Y=12\,649\,025.650X-1\,595.975$	0.999 8	1~100	0.20	0.70
巴利森苷 B	$Y=237\,173X+861.48$	0.999 7	15~800	2.00	7.20
巴利森苷 A	$Y=219\,678X+845.28$	0.999 0	4~800	1.50	4.00

### 2.3 赤箭和天麻水提液对小鼠免疫功能的影响

**2.3.1 廓清试验** 取小鼠 80 只,按体质量随机分成空白组,赤箭水提液高、中、低剂量(20, 10, 5 g·kg<sup>-1</sup>, 按生药量计)组,天麻水提液高、中、低剂量(20, 10,

**2.2.6 重复性试验** 取天麻粉末 0.5 g,按 2.2.3 项下方法平行制备 6 份供试品溶液,按 2.2.1 项下条件测定,计算腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 B 和 A 平均质量分数分别为 0.155 3, 8.489 5, 6.442 7, 0.078 7, 0.827 1, 0.145 3 mg·g<sup>-1</sup>, RSD 均<3.3%,表明该方法重复性良好。

**2.2.7 稳定性试验** 取天麻粉末 0.5 g,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,分别于制备后 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 按 2.2.1 项下条件测定,计算腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 B 和 A 峰面积的 RSD 分别为 1.9%, 2.3%, 1.3%, 3.0%, 1.6%, 2.4%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

**2.2.8 加样回收率试验** 精密称取天麻粉末适量,共 6 份,精密加入与样品中成分含量相当的对照品溶液,按 2.2.3 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 B 和 A 的平均加样回收率在 96.43%~102.59%, RSD 均<3.5%,表明该方法回收率较好。

**2.2.9 样品测定** 取 2.2.3 项下赤箭和天麻的粉末、水提液、醇提液样品,每批 3 份,按 2.2.1 项下色谱条件测定,计算样品中各成分的质量分数,见表 2。结果显示,赤箭粉末中天麻素和对羟基苯甲醇的总质量分数 1.649%,天麻粉末中此两者总质量分数 1.493%,符合 2020 年版《中国药典》“天麻”项下的要求。赤箭粉末、醇提液中所测腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷 B 和巴利森苷 A 含量总和明显高于天麻粉末、醇提液中 6 种成分含量总和( $P<0.01$ ),赤箭水提液和天麻水提液所测 6 种成分含量总和相近。

5 g·kg<sup>-1</sup>,按生药量计)组和阳性药组(黄芪精,剂量 13.4 g·kg<sup>-1</sup>),每组 10 只,雌雄各半。分别灌胃给药,空白组灌胃给予等体积纯净水(0.02 mL·g<sup>-1</sup>),每天给药 1 次,连续 28 d。给药第 3, 4, 7, 17, 23 天,各组

表2 赤箭和天麻样品中6种成分的质量分数 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

样品	腺苷	天麻素	对羟基苯 甲醇	对羟基苯 甲醛	巴利森苷B	巴利森苷A	总量
天麻粉末	0.016±0.000 09	0.849±0.004	0.644±0.001 9	0.008±0	0.083±0.000 8	0.015±0.000 2	1.614±0.007
天麻水提液	0.004±0.000 08	0.578±0.024	0.041±0.002 4	0.001±0	0.072±0.002 7	-	0.696±0.025
天麻醇提液	0.006±0.000 01	0.137±0.003	0.201±0.000 9	0.001±0	0.039±0.000 5	0.008±0.000 2	0.393±0.003
赤箭粉末	0.055±0.007 66 <sup>1)</sup>	0.268±0.006 <sup>2)</sup>	1.381±0.007 3 <sup>2)</sup>	0.045±0.008 <sup>2)</sup>	0.177±0.026 8 <sup>1)</sup>	0.040±0.008 0 <sup>1)</sup>	1.966±0.035 <sup>2)</sup>
赤箭水提液	0.011±0.000 37 <sup>2)</sup>	0.509±0.007 <sup>1)</sup>	0.033±0.000 2 <sup>1)</sup>	0.002±0 <sup>2)</sup>	0.149±0.003 1 <sup>2)</sup>	-	0.704±0.011
赤箭醇提液	0.008±0.000 17 <sup>2)</sup>	0.218±0.003 <sup>2)</sup>	0.042±0.001 9 <sup>2)</sup>	0.002±0 <sup>2)</sup>	0.135±0.000 2 <sup>2)</sup>	0.367±0.000 9 <sup>2)</sup>	0.772±0.002 <sup>2)</sup>

注:与相应天麻样品比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ ,<sup>2)</sup> $P<0.01$ 。

小鼠腹腔注射环磷酰胺( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。末次给药后1 h,称定小鼠体质量,尾静脉注射印度墨汁稀释液( $0.01\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),注射后1,5 min用玻璃毛细吸管分别从眼眶后静脉丛取血 $20\ \mu\text{L}$ ,溶于2 mL的 $0.1\%$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液中,摇匀,在650 nm处测定吸光度 $A$ 。将小鼠颈椎脱臼处死,摘取肝、脾,称定质量。分别按 $K=(\lg A_1-\lg A_2)/(t_2-t_1)$ , $\alpha=\text{体质量}/(\text{肝质量}+\text{脾质量})\times K^{1/3}$ 计算廓清指数( $K$ )或校正廓清指数( $\alpha$ ),式中 $A_1, A_2$ 表示1,5 min时取血所得血液的 $A$ , $t_1$ 和 $t_2$ 为注射印度墨汁后的取血时间, $t_1=1\text{ min}$ , $t_2=5\text{ min}$ 。

**2.3.2 外周血象测定** 取ICR小鼠80只,按体质量随机分组,包括空白组,赤箭水提液高、中、低剂量( $20, 10, 5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组,天麻水提液高、中、低剂量( $20, 10, 5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )组和阳性药组(盐酸左旋咪唑片,剂量 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),每组10只,雌雄各半。各组分别灌胃给药,空白组灌胃给予等体积纯净水(给药体积 $0.02\text{ mL}\cdot\text{g}^{-1}$ ),每天给药1次,连续14 d。给药第4,7,10天,各组小鼠腹腔注射环磷酰胺( $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。末次给药后1 h,小鼠眼眶取血,用乙二胺四乙酸二钾( $\text{EDTA-K}_2$ )抗凝,测定全血中白细胞(WBC),红细胞(RBC),红细胞压积(HCT),血红蛋白(HGB)水平。

**2.3.3 淋巴细胞转化试验** 取小鼠5只,将小鼠处死,无菌取脾,置于无菌Hank's液中,用镊子轻轻将脾研碎,制成单个脾细胞悬液。经200目筛网过滤,用Hank's液洗2次,每次离心 $10\text{ min}(1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心半径 $16.7\text{ cm}$ ,下同),将脾细胞悬浮于RPMI-1640完全培养液中,调整细胞浓度为 $3\times 10^6$ 个/mL。将脾细胞悬液加入96孔细胞板,每孔 $100\ \mu\text{L}$ ,每孔加入LPS溶液 $20\ \mu\text{L}$ (终质量浓度 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),加入不同浓度天麻水提液( $25, 100, 400\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )或赤箭水提液( $12.5, 25, 100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) $80\ \mu\text{L}$ ,并设定空白组(不加LPS溶液和药液)和LPS活化组(加LPS溶液,不

加药液)。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育48 h,每孔加入 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  MTT  $20\ \mu\text{L}$ ,继续孵育4 h,离心 $10\text{ min}(2\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,离心半径 $16.7\text{ cm}$ ),吸去上清,每孔加入二甲基亚砜 $150\ \mu\text{L}$ ,震荡10 min后于570 nm处测定 $A$ ,以反映B淋巴细胞的增殖程度。

**2.3.4 对廓清指数的影响** 赤箭水提液和天麻水提液各剂量组均可不同程度地增加免疫低下小鼠的 $K$ 值,其中赤箭水提液中剂量组和天麻水提液中、低剂量组与空白组相比具有显著性差异( $P<0.05$ )。见表3。

表3 赤箭和天麻水提液对小鼠廓清功能的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 3 Effect of Gastrodiae Rhizoma and Chijian water extracts on clearance function of mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	$K$	$\alpha$
空白		0.046±0.012	5.720±0.750
天麻水提液	20	0.055±0.015	6.193±0.729
	10	0.059±0.011 <sup>1)</sup>	6.237±0.390
	5	0.058±0.013 <sup>1)</sup>	6.145±0.524
赤箭水提液	20	0.058±0.015	6.008±0.285
	10	0.061±0.017 <sup>1)</sup>	6.188±0.369
	5	0.054±0.013	5.968±0.577
黄芪精	13.4	0.052±0.015	5.702±0.479

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P<0.05$ 。

**2.3.5 对外周血象的影响** 与空白组相比,赤箭水提液高剂量组和天麻水提液高剂量组可明显增高血中RBC和HCT含量( $P<0.05, P<0.01$ ),天麻水提液高剂量组可显著增高血中HGB含量( $P<0.01$ ),天麻水提液高、中、低剂量组可明显增高血中WBC含量( $P<0.05$ )。见表4。

**2.3.6 对LPS诱导B淋巴细胞增殖的影响** 空白组,LPS活化组,天麻水提液高、中、低剂量组,赤箭水提液高、中、低质量浓度组的 $A$ 分别为 $1.428\pm$

表4 赤箭水提液和天麻水提液对免疫功能低下小鼠外周血象的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 4 Effect of Gastrodiae Rhizoma and Chijian water extracts on peripheral blood of immunocompromised mice ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	RBC( $\times 10^{12}$ )/个/L	HCT/%	HGB/g·L <sup>-1</sup>	WBC( $\times 10^9$ )/个/L
空白		7.41±0.54	41.43±3.02	120.63±7.80	1.14±0.33
天麻水提液	20	8.48±0.90 <sup>2)</sup>	46.95±4.59 <sup>2)</sup>	137.50±12.96 <sup>2)</sup>	2.14±1.00 <sup>1)</sup>
	10	7.88±0.95	44.00±5.59	135.00±17.56	1.81±0.80 <sup>1)</sup>
	5	8.02±0.89	44.72±4.38	131.67±15.81	1.62±0.39 <sup>1)</sup>
赤箭水提液	20	8.16±0.62 <sup>1)</sup>	45.06±3.09 <sup>1)</sup>	129.44±12.36	1.42±0.62
	10	8.01±1.08	43.61±5.33	129.44±17.22	1.50±0.49
	5	7.39±0.78	41.00±3.64	122.22±10.93	1.14±0.32
盐酸左旋咪唑片	0.08	7.42±0.72	40.44±3.84	122.22±12.77	1.34±0.31

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01(表5同)。

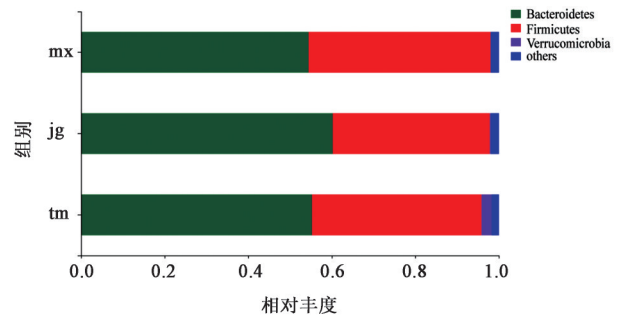
0.233, 1.645±0.259, 1.564±0.311, 1.488±0.154, 3.152±0.303, 1.473±0.347, 1.603±0.275, 2.476±1.033。其中,400 g·L<sup>-1</sup>天麻水提液和100 g·L<sup>-1</sup>赤箭水提液对LPS诱导的B淋巴细胞增殖具有促进作用(P<0.01)。

#### 2.4 赤箭水提液和天麻水提液对免疫功能低下小鼠肠道菌群的影响

**2.4.1 肠道内容物DNA提取,PCR扩增及生物信息分析** 免疫功能低下小鼠设定空白组、赤箭水提液组(10 g·kg<sup>-1</sup>)和天麻水提液组(10 g·kg<sup>-1</sup>),造模和给药同2.3.1项,廓清试验结束前1 d,无菌取小鼠粪便,液氮速冻后置于-80 °C保存,采用16S rDNA技术进行肠道菌群分析。利用DNA提取试剂盒提取小鼠粪便总DNA,并对所提取DNA 16S V4区进行PCR扩增,扩增引物为338F-806R,其中338F序列为5'-ACTCCTACGGAGGCAGCAG-3',806R序列为5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。扩增后的产物使用2%琼脂糖凝胶电泳检测,多次洗脱收集回收后,用1% NaOH溶液使DNA变成单链,完成文库构建,利用Illumina MiSeq平台对文库进行高通量测序。对所得数据进行操作分类单元(OTU)聚类、物种注释等生物信息学分析,在门、属水平上对物种丰度进行显著性分析。

**2.4.2 小鼠肠道的微生物群落结构** 在门水平上,相对丰度较高的菌群为拟杆菌门(Bacteroidetes),厚壁菌门(Firmicutes)和疣微菌门(Verrucomicrobia),其中拟杆菌门和厚壁菌门占优势。赤箭水提液组和天麻水提液组的拟杆菌门相对丰度较空白组分别高5.76%,0.80%,厚壁菌门相对丰度较空白组分别降低5.95%,2.96%,见图2。在属水平上,乳杆菌属(*Lactobacillus*)和norank\_f\_Muribaculaceae相对丰度占绝对优势;其余丰度较高的有拟杆菌属(*Bacteroides*),拟普雷沃菌属(*Alloprevotella*),毛螺

菌科 NK4A136 组 (*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*),理研菌科 RC9 肠道群 (*Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group*),产丁酸菌属 (*Alistipes*),艾克曼菌属 (*Akkermansia*),*Prevotellaceae\_UCG-001*,罗斯氏菌属 (*Roseburia*)等。见图3。



mx.空白组;jg.赤箭水提液组;tm.天麻水提液组(图3~5同)

图2 各组小鼠肠道菌群在门水平的物种分布

Fig. 2 Species distribution of intestinal flora of mice in each group at phylum level

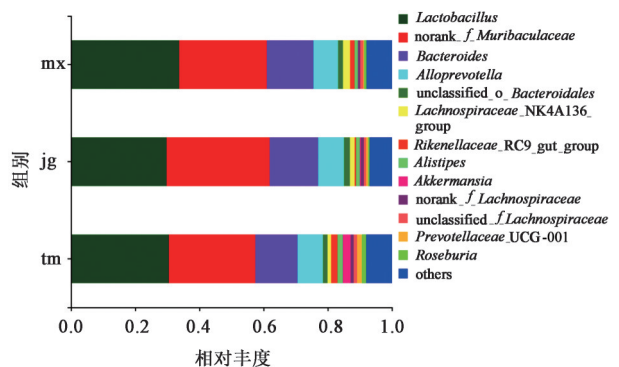


图3 各组小鼠肠道菌群在属水平的物种分布

Fig. 3 Species distribution of intestinal flora of mice in each group at genus level

**2.4.3 小鼠肠道微生物群落结构的变化情况** 基于偏最小二乘法-判别分析(PLS-DA)显示,赤箭水提液组和天麻水提液组与空白组之间物种组成存

在一定差异。见图4。

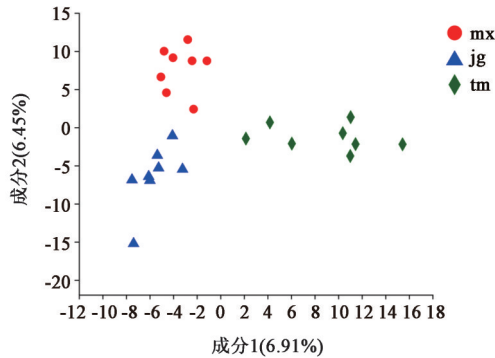


图4 各组小鼠肠道菌群主坐标分析

Fig. 4 Principal coordinate analysis of intestinal microflora in mice from each group

**2.4.4 丰度显著差异分类单元筛选** 采用LEfSe方法在属水平上筛选丰度差异的肠道菌,线性判别分析(LDA)得分>2的肠道菌包括厌氧棍状菌属(*Anaerotruncus*),韦荣球菌科 unclassified\_f\_ *Erysipelotrichaceae* 属,脱铁杆菌科 *Mucispirillum* 属,瘤胃菌科 *Ruminococcaceae*\_UCG-005 属,克雷

表5 属水平显著差异物种在各组中的相对丰度 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 5 Relative abundances of significant difference species in each group at genus level ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

物种	空白组	天麻水提液组	赤箭水提液组
<i>Prevotellaceae</i> _UCG-001	0.387±0.361	1.510±1.216 <sup>1)</sup>	0.670±0.390
<i>Ruminococcaceae</i> _UCG-005	0.001±0.002	0.012±0.009 <sup>1)</sup>	0.012±0.007 <sup>2)</sup>
<i>Anaerotruncus</i>	0.156±0.157	0.128±0.086	0.032±0.024 <sup>1)</sup>
<i>Candidatus</i> _Stoquefichus	0.095±0.125	0.078±0.038	0.033±0.028
unclassified_f_ <i>Erysipelotrichaceae</i>	0.013±0.019	0.001±0.002	0±0.001

**2.5 统计学分析** 使用SPSS 21.0对数据进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间多重比较分析采用单因素方差分析,结合最小显著性差异法(LSD)多重比较分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

### 3 讨论

通过本草考证,宋代赤箭和天麻均使用,赤箭指茎,有自表入里的功效,天麻指根,有自内达外的功效;清代以后赤箭未作药用。本研究从化学成分、免疫功能、肠道菌群角度对赤箭和天麻进行了对比研究。肖慧等<sup>[13]</sup>以天麻素和巴利森苷提取量为天麻的评价指标;康传志等<sup>[14]</sup>用50%甲醇超声提取60 min进行天麻供试品溶液制备;田紫平等<sup>[15]</sup>研究表明巴利森苷类受温度和pH影响,且与天麻素之间存在转化,从而使天麻炮制后的天麻素含量增加,故将巴利森苷类和天麻素类进行综合评价是很有意义的。本研究参考了上述文献中天麻供试品

伯氏菌属(*Klebsiella*),毛螺菌科 *Tyzzarella* 属,丁酸弧菌属(*Butyricimonas*),凸腹真杆菌(*Eubacterium*\_ *ventriosum*\_group),见图5。与空白组相比,在赤箭水提液组和天麻水提液组中变化趋势一致且相对丰度>0.01%,即被认为丰度显著差异分类单元,见表5。其中赤箭水提液组和天麻水提液组 *Prevotellaceae*\_UCG-001, *Ruminococcaceae*\_UCG-005的丰度高于空白组,厌氧棍状菌属, unclassified\_f\_ *Erysipelotrichaceae*, *Candidatus*\_ *Stoquefichus*的丰度低于空白组。

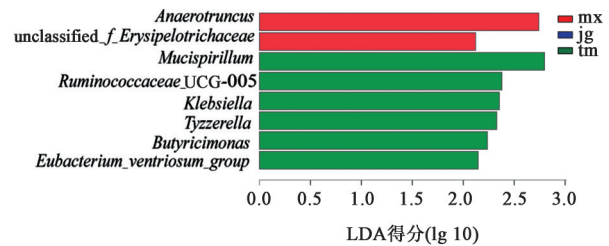


图5 属水平丰度差异肠道菌的LDA得分

Fig. 5 LDA scores of intestinal microflora with difference in abundance at genus level

制备方法和检测方法,选择腺苷、天麻素、对羟基苯甲醇、对羟基苯甲醛、巴利森苷B和A这6种成分进行含量测定。UPLC测定结果显示,赤箭粉末、醇提液所测6种成分含量总和分别显著高于天麻粉末、醇提液,赤箭水提液和天麻水提液所测6种成分含量总和相近。文献[8]研究发现天麻地上部分天麻素含量远比地下部分高,但本文检测了上述6种化学成分,赤箭所测6种成分含量不低于天麻,为赤箭化学成分研究及进一步开发奠定了基础。

李晓冰等<sup>[10]</sup>发现天麻多糖可以缓解环磷酰胺对小鼠体液免疫功能的抑制作用。王强等<sup>[11]</sup>研究表明环磷酰胺联用天麻多糖可使环磷酰胺对脾指数、胸腺指数和WBC计数的影响降低。鲁艳娇等<sup>[16]</sup>发现天麻苷可增强抗感染能力,明显提高小鼠的免疫功能。说明天麻具有提高免疫功能的作用,而本文研究发现赤箭水提液和天麻水提液可提高

免疫力低下小鼠的K值,高剂量组可增加血中RBC和HCT,对LPS诱导的B淋巴细胞增殖具有促进作用,两者具有相似的增强免疫作用,提示赤箭可能与天麻具有类似的药理作用。

华中一等<sup>[12]</sup>研究表明天麻水提液可显著提高正常小鼠肠道菌的益生菌属,长期服用鲜天麻可调节小鼠的肠道菌群。本文研究了赤箭和天麻水提液对免疫功能低下小鼠肠道菌群的影响,结果发现二者均可在门水平上增加拟杆菌门丰度,降低厚壁菌门丰度;在属水平上增加 *Prevotellaceae*\_UCG-001 和 *Ruminococcaceae*\_UCG-005 的相对丰度,降低厌氧棍状菌属, *unclassified\_f\_Erysipelotrichaceae* 和 *Candidatus\_Stoquefichus* 的相对丰度。拟杆菌门作为一种常见益生菌,对宿主健康起着重要作用,如促进调节T细胞的分化、抑制炎症反应、影响宿主的免疫系统<sup>[17]</sup>。普雷沃氏菌科(*Prevotellaceae*)被认为与短链脂肪酸(SCFAs)的合成相关<sup>[18]</sup>。SCFAs在调节宿主代谢、免疫系统和细胞增殖方面具有关键作用,肠道微生物产生的SCFAs可促进抗体反应,调节免疫系统,支持宿主抗体通过调节基因表达的反应促进细胞新陈代谢、血浆B细胞分化<sup>[19]</sup>。厌氧棍状菌属与代谢有关,脂代谢异常时会引起其含量升高<sup>[20]</sup>; *Ruminococcaceae* 有关研究表明多糖、黄酮等物质均可以增加该菌在肠道中的相对丰度<sup>[12]</sup>。 *Erysipelotrichaceae* 的相对丰度与炎症因子表达呈正相关,是条件致病菌,其丰度增高与代谢紊乱相关<sup>[21]</sup>。然而,目前关于 *Candidatus\_Stoquefichus* 和 *Mucispirillum* 的报道较少。总之,赤箭的化学成分、药理作用与天麻较为相似,提示赤箭值得进一步的研究和开发。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:59-60.  
[2] 苏颂. 本草图经[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1994:67-68,235.  
[3] 寇宗奭. 本草衍义[M]. 北京:人民卫生出版社,1990:45,66.  
[4] 唐慎微. 证类本草[M]. 北京:华夏出版社,1993:177-178,252-253.  
[5] 世界书局. 中国药学大辞典[M]. 北京:人民卫生出版社,1956:199-202.  
[6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999:716-712.

[7] 南京中医药大学. 中药大辞典:上[M]. 上海:上海科学技术出版社,2014:373-376.  
[8] 杜红安,权秀丽,赵萌,等. 天麻地上部分化学成分研究-天麻素的含量测定[J]. 陕西中医学院学报,2006,29(4):63-64.  
[9] 李慧慧. 天麻地上部分化学成分研究及天麻药材质量评价[D]. 合肥:安徽中医药大学,2015.  
[10] 李晓冰,展俊平,张月腾,等. 天麻多糖对环磷酰胺所致免疫功能低下小鼠体液免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志,2016,36(5):1027-1028.  
[11] 王强,张沂,李佳,等. 天麻多糖通过影响小鼠免疫系统抑制肿瘤生长[J]. 免疫学杂志,2014,30(6):566-568.  
[12] 华中一,李洪梅,孙建辉,等. 鲜天麻提取物对小鼠肠道菌群结构的影响[J]. 中国中药杂志,2019,44(5):1004-1009.  
[13] 肖慧,王跃生,陈莎,等. 动态优化法在天麻提取工艺优化中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(20):35-38.  
[14] 康传志,吕朝耕,杨健,等. 基于UPLC-MS/MS的不同主产区天麻药材质量评价研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(5):2010-2015.  
[15] 田紫平,肖慧,冯舒涵,等. 天麻有效成分巴利森苷的降解规律分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(23):18-21.  
[16] 鲁艳娇,王强,张伟,等. 天麻苷增强小鼠免疫功能的实验研究[J]. 内科急危重症杂志,2015,21(2):141-143.  
[17] ZENG Q, LI D F, HE Y, et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities [J]. Sci Rep, 2019, 9(1):13424.  
[18] VUILLERMIN P J, O'MARTIN H, COLLIER F, et al. Maternal carriage of prevotella during pregnancy associates with protection against food allergy in the offspring [J]. Nat Commun, 2020, 11(1):1452.  
[19] KIM M, QIE Y Q, PARK J, et al. Gut microbial metabolites fuel host antibody responses [J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(2):202-214.  
[20] KAPLAN R C, WANG Z, USYK M, et al. Gut microbiome composition in the hispanic community health study/study of latinos is shaped by geographic relocation, environmental factors, and obesity [J]. Genome Biol, 2019, 20(1):219.  
[21] 孙成静. 丹参茎叶酚酸和黄酮有效部位研究及其改善微循环障碍作用[D]. 南京:南京中医药大学,2020.

[责任编辑 刘德文]