

· 药物代谢 ·

## 基于UPLC-QE-Orbitrap-MS的生姜干预腹泻小鼠 血清代谢组学分析

玄静, 刘燕, 张永清\*

(山东中医药大学 山东省高等学校中药资源学重点实验室, 济南 250355)

**[摘要]** **目的:**探讨生姜对腹泻小鼠的止泻作用及其机制,为生姜抑制肠蠕动及其用于胃肠疾病的治疗提供研究基础。**方法:**采用番泻叶建立小鼠腹泻模型,设定正常组、模型组、生姜低、中、高剂量(0.1, 0.32, 1.0 g·kg<sup>-1</sup>)组和洛哌丁胺组(给药剂量1.6 g·kg<sup>-1</sup>),通过小鼠腹泻评分,稀便发生率(LSIR),平均稀便等级(ALSG),腹泻指数(DI),肠推进率,肠组织病理切片检测生姜不同剂量组对腹泻小鼠的干预作用;利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-QE-Orbitrap-MS),主成分分析(PCA)及正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)对小鼠血清进行代谢组学分析,流动相选择0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)梯度洗脱(0~3.5 min, 5%~15%B; 3.5~6 min, 15%~30%B; 6~6.5 min, 30%B; 6.5~12 min, 30%~70%B; 12~12.5 min, 70%B; 12.5~18 min, 70%~100%B),流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量5 μL;电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测模式,采集范围 $m/z$  100~1 500。**结果:**与模型组比较,生姜高剂量组可明显降低腹泻评分,LSIR,ALSG,DI和肠推进率( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),改善肠黏膜损伤;正常组、模型组和生姜高剂量组3组之间的主要差异代谢物共有40种,包括葡萄糖-1-磷酸、黄嘌呤、黄嘌呤核苷和酵母甾醇中间体2等;涉及的代谢通路主要有淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢、色氨酸代谢等。**结论:**生姜可抑制腹泻小鼠肠蠕动进而发挥止泻作用,作用机制与调节糖代谢、氨基酸代谢有关。

**[关键词]** 生姜; 腹泻; 代谢组学; 差异代谢物; 代谢通路; 作用机制; 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-QE-Orbitrap-MS)

[中图分类号] R22;R28;R969.1;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)01-0157-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211650

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210514.1638.003.html>

[网络出版日期] 2021-05-16 11:57

### Serum Metabonomics Analysis of Diarrhea Mice Intervened by *Zingiberis Rhizoma Recens* Based on UPLC-QE-Orbitrap-MS

XUAN Jing, LIU Yan, ZHANG Yong-qing\*

(Key Laboratory of Chinese Medicine Resources in Colleges and Universities of Shandong Province,  
Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the antidiarrheal effect and mechanism of *Zingiberis Rhizoma Recens* on diarrhea mice, and to provide research basis for the inhibition of intestinal peristalsis by *Zingiberis Rhizoma Recens* and its application in the treatment of gastrointestinal diseases. **Method:** The diarrhea model of mice was established by *Sennae Folium*. The control group, model group, *Zingiberis Rhizoma Recens* low-, medium-, high-dose groups (0.1, 0.32, 1.0 g·kg<sup>-1</sup>) and loperamide group (1.6 g·kg<sup>-1</sup>) were set. The intervention effect of *Zingiberis Rhizoma Recens* with different doses on diarrhea mice was detected by diarrhea score, incidence rate of loose stools (LSIR), grade of average loose stools (ALSG), diarrhea index (DI),

[收稿日期] 20210322(019)

[基金项目] 山东省重点研发计划项目(2016CYJS08A01-2);2018年中医药公共卫生服务补助专项(财社[2018]43号);2019年医疗服务与保障能力提升项目(财社[2019]39号)

[第一作者] 玄静,在读硕士,从事中药质量控制研究,E-mail:xuanjing2018@163.com

[通信作者] \*张永清,博士,教授,博士生导师,从事中药质量控制研究,E-mail:zyq622003@126.com

intestinal propulsion rate and intestinal pathological section. The serum metabonomics of mice was analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-QE-Orbitrap-MS), principal component analysis (PCA) and orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS-DA). The conditions were as follows: mobile phase of 0.1% formic acid aqueous solution (A)-0.1% formic acid acetonitrile solution (B) for gradient elution (0-3.5 min, 5%-15%B; 3.5-6 min, 15%-30%B; 6-6.5 min, 30%B; 6.5-12 min, 30%-70%B; 12-12.5 min, 70%B; 12.5-18 min, 70%-100%B), flow rate of  $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , injection volume of  $5 \mu\text{L}$ , electrospray ionization (ESI), positive and negative ion detection modes, acquisition range of  $m/z$  100-1 500. **Result:** Compared with the model group, Zingiberis Rhizoma Recens high-dose group could obviously reduce the diarrhea score, LSIR, ALSG, DI and intestinal propulsion rate ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and improve the intestinal mucosal injury. There were 40 main differential metabolites among the control group, model group and Zingiberis Rhizoma Recens high-dose group, including glucose 1-phosphate, xanthine, xanthosine and so on. The metabolic pathways mainly included starch and sucrose metabolism, amino sugar and nucleotide sugar metabolism, fructose and mannose metabolism, tryptophan metabolism, and galactose metabolism. **Conclusion:** Zingiberis Rhizoma Recens can inhibit intestinal peristalsis in diarrhea mice and exert antidiarrhoea effect, the mechanism of which may be related to the regulation of carbohydrate and amino acid metabolism.

[**Keywords**] Zingiberis Rhizoma Recens; diarrhea; metabonomics; differential metabolites; metabolic pathways; mechanism; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-QE-Orbitrap-MS)

腹泻是一种肠道疾病,常作为一种伴随症状频发于临床。该疾病的病理生理基础是肠内水和电解质平衡紊乱,其特征主要表现为肠蠕动增加,排便频率增加,严重影响生活质量及身体健康。生姜为传统中药,具有解表散寒、温中止呕等功效<sup>[1]</sup>,在方剂中常作为佐使药配伍使用;亦有古代本草记载生姜可单独用于止泻,《本草图经》载“以生姜切细,和好茶一、两碗,任意呷之,治痢大妙!”在现代医学中,生姜广泛用于胃肠道疾病的治疗,具有健胃止呕、止泻止痢的功效<sup>[2]</sup>。

有学者着眼于肠道部位,提出生姜缓解抗生素相关性腹泻与肠道菌群有关<sup>[3]</sup>。药理研究证明生姜能够调节胃肠运动<sup>[4]</sup>,对大鼠胃底、回肠均有致痉挛作用,同时还表现出一种通过 $\text{Ca}^{2+}$ 拮抗剂介导的解痉作用,提示生姜对肠道蠕动可能存在双向调节作用<sup>[5-6]</sup>。生姜止泻是否与其抑制肠蠕动有关,具体作用机制尚不清晰。代谢组学作为一种新的研究思路,可从整体角度出发探讨药物治疗肠道疾病的作用及其机制<sup>[7-8]</sup>。基于此,本实验拟利用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-QE-Orbitrap-MS)分析给药前后腹泻小鼠血清代谢组学变化,探讨相关代谢通路,以明确生姜抑制肠蠕动进而发挥止泻的作用机制,为其用于治疗胃动力过速型疾病提供研究基础。

## 1 材料

Vanquish型超高效液相色谱系统,Q Exactive HFX型高分辨质谱仪和Heraeus Fresco17型离心机(美国赛默飞世尔科技公司);BSA124S-CW型电子天平(德国赛多利斯公司),JXFSTPRP-24型研磨仪(上海净信科技有限公司),D24UV型纯水仪(德国默克密理博公司),YM-080S型超声仪(深圳市方奥微电子有限公司),30B型万能粉碎机(常州市奥斯盾干燥设备有限公司)。

甲醇、乙腈和甲酸为质谱纯,水为纯净水或蒸馏水,其他试剂均为分析纯。莱芜大姜采集于山东莱芜生姜种植基地,经山东中医药大学张永清教授鉴定为姜科植物姜 *Zingiber officinale* 的新鲜根茎。采收后,清水洗净,真空冷冻干燥,粉碎,过60目筛,置于生理盐水中,制成0.05, 0.015 8, 0.005  $\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 共3个生药质量浓度的生姜粉混悬液,备用。番泻叶购自山东中医药大学附属医院,批号20171201,产地云南,经山东中医药大学张永清教授鉴定为豆科植物狭叶番泻 *Cassia angustifolia* 的干燥小叶。盐酸洛哌丁胺胶囊购自西安杨森制药有限公司,批号KGJ4U8S,取胶囊内粉末4 mg,溶于50 mL生理盐水中,制成0.08  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 溶液,备用。

SPF级雄性BALB/c小鼠,体质量18~22 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号

SCXK(京)2016-0006。在山东中医药大学实验动物中心无特定病原体条件下饲养,室温(22±2)℃,相对湿度60%~70%,12 h明暗循环,自由饮食。本文涉及的动物实验经山东中医药大学动物伦理委员会批准,批准号SDUTCM20201027001。

## 2 方法

**2.1 造模及动物分组**<sup>[9-10]</sup> 取番泻叶30 g,加水300 mL煎煮2次,每次20 min,纱布过滤,滤液水浴浓缩至生药质量浓度为0.3 g·mL<sup>-1</sup>,4℃保存,用前水浴加热至25℃。小鼠在SPF环境下适应性饲养7 d,随机分为正常组和实验组。实验组每天以剂量6 g·kg<sup>-1</sup>灌胃0.3 g·mL<sup>-1</sup>番泻叶溶液,正常组给予等体积蒸馏水,连续造模3 d,期间正常自由饮食。模型复制后5 h内观察粪便,不成形或稀便且滤纸上有污迹者,视为模型复制成功。正常组小鼠12只;将造模成功后的实验组小鼠随机分为模型组、洛哌丁胺组(1.6 g·kg<sup>-1</sup>)和生姜高、中、低剂量(1.0,0.32,0.1 g·kg<sup>-1</sup>)组,每组12只。给药组均按相应剂量灌胃给药1 d,灌胃前将生姜混悬液稍加振摇,使其均匀分散,吸入相应剂量后迅速灌胃于小鼠体内,正常组、模型组给予相应体积生理盐水。给药后6 h内记录小鼠粪便情况,6 h后进行肠蠕动检测、肠组织病理切片观察。

**2.2 腹泻指标测定** 给药后将小鼠置于代谢笼内,单笼单只饲养,网下垫有滤纸,每隔1 h更换1次,以腹泻评分,稀便发生率(LSIR),平均稀便等级(ALSG),腹泻指数(DI)为腹泻指标,记录每只小鼠6 h内粪便情况。腹泻评分标准<sup>[11]</sup>为正常小鼠大便正常或没有,计0分;轻度腹泻小鼠大便可见轻微湿软,计1分;中度腹泻小鼠大便较湿且有中度肛周着色,计2分;重度腹泻小鼠大便水样并伴有重度肛周着色,计3分。根据公式LSIR=稀便数量/总便数量计算LSIR,ALSG=所有稀便等级总和/稀便数量计算ALSG,DI=LSIR×ALSG计算DI<sup>[5]</sup>。统计粪便次数时,以每粒或每堆(不能分清粒数者)计为1次。以滤纸上有无污迹来区分干便与稀便。稀便等级依据稀便污染滤纸所形成污迹面积的大小而定,分为四级;分级标准为污染直径<1 cm为一级,污染直径1~1.9 cm为二级,污染直径2~3 cm为三级,污染直径>3 cm为四级;稀便污迹圆形者直接测量直径,椭圆形或不规则形状者,测其最长和近似圆的直径,两数相加除以2。

**2.3 肠蠕动检测和肠组织病理切片观察** 以墨汁在肠道内的推进率(肠推进率)为指标检测肠蠕动。

正常组、模型组、洛哌丁胺组和生姜高、中、低剂量组小鼠在处死前禁食不禁水20 h,给药后6 h灌胃墨汁0.1 mL,0.5 h后腹腔注射1%戊巴比妥钠(剂量50 mg·kg<sup>-1</sup>)深度麻醉并脱颈椎处死;取幽门至肛门的整个肠段测量总长度及墨汁前端到幽门的距离(cm),按公式肠推进率=墨汁前端到幽门的距离(cm)/肠段总长度(cm)×100%计算肠推进率。正常组、模型组和生姜高剂量组小鼠麻醉处死后,截取空肠和回肠,生理盐水冲洗,用4%多聚甲醛固定,取出后适当修整并用蒸馏水冲洗固定液,进行逐步脱水;用二甲苯进行透明处理;用65℃熔化的石蜡包埋,待石蜡冷凝后切片,用二甲苯脱蜡处理;切片用苏木素-伊红(HE)染色,二甲苯处理至透明,中性树胶封固,观察切片组织病理变化。

**2.4 血清样本采集及处理** 正常组、模型组、生姜高剂量组小鼠给药后约1 h摘除眼球取血,室温静置,离心处理(13 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃,15 min,离心半径12 cm),取血清,于-80℃保存备用。分析前将冰冻血清样本置室温下解冻,用移液枪吸取血清样本350 μL于2 mL离心管中。加2 mol·L<sup>-1</sup>盐酸35 μL,涡旋1 min,4℃静置15 min。涡旋、静置共循环重复4次。加入乙腈1.4 mL,涡旋5 min后离心处理(12 000 r·min<sup>-1</sup>,4℃,5 min,离心半径12 cm,下同)。取上清液1.575 mL转移到新离心管中,氮气吹干,加入80%甲醇175 μL复溶,涡旋混匀5 min后离心。取上清液进行UPLC-QE-Orbitrap-MS分析。

**2.5 色谱条件** 采用ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相为0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B),选择梯度洗脱程序(0~3.5 min,5%~15%B;3.5~6 min,15%~30%B;6~6.5 min,30%B;6.5~12 min,30%~70%B;12~12.5 min,70%B;12.5~18 min,70%~100%B),柱温40℃,流速0.4 mL·min<sup>-1</sup>,进样量5 μL。

**2.6 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),正、负离子检测模式。鞘气流量45 arb,辅助气体流量设定15 arb,毛细管温度选择400℃,采集范围设置m/z 100~1 500,全扫分辨率(Full MS)7万,二级分辨率(MS/MS)17 500,碰撞能量(多级模式)15 V/30 V/45 V,喷雾电压4.0 kV(ESI<sup>+</sup>)或-3.8 kV(ESI<sup>-</sup>)。

**2.7 数据分析** 将质谱原始数据导入XCMS软件,进行保留时间(t<sub>R</sub>)校正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等预处理,将所得的数据矩阵归一标准化处理,导入SIMCA 16.0.2软件进行多变量统计分析。依据正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)模型

第1主成分的变量投影重要性(VIP)值(VIP值>1)和独立样本t检验( $P<0.05$ )筛选差异代谢物。结合Metlin, PubChem, HMDB等数据库及人工鉴定差异代谢物,并进行层次聚类分析。使用MetaboAnalyst 4.0进行代谢通路分析。数据统计分析使用SPSS 25.0。计量资料符合正态分布、方差齐性者,采用单因素方差分析评估组间统计差异,不符合正态分布或方差不齐时选用秩和检验, $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 不同剂量生姜干预后小鼠腹泻指标变化 与

正常组比较,模型组小鼠均出现腹泻症状,腹泻评分,LSIR,ALSG和DI均显著增加( $P<0.01$ ),提示模型复制成功。与模型组比较,生姜高剂量组小鼠腹泻评分,LSIR,ALSG和DI均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );洛哌丁胺组小鼠腹泻评分,LSIR和DI均明显降低( $P<0.05, P<0.01$ );生姜中剂量组小鼠腹泻评分,LSIR,ALSG和DI均降低但差异无统计学意义,具体的实验数据见表1。说明中、低剂量生姜对小鼠腹泻症状的改善效果不明显,高剂量生姜则可有效改善小鼠腹泻症状,且药效与阳性药盐酸洛哌丁胺胶囊接近。

表1 生姜对小鼠腹泻评分,LSIR,ALSG,DI,肠推进率的影响( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 1 Effect of Zingiberis Rhizoma Recens on diarrhea score, LSIR, ALSG, DI and intestinal propulsion rate of mice ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

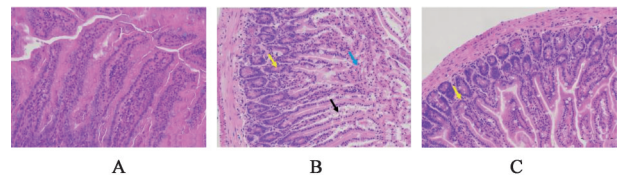
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	腹泻评分	LSIR/%	ALSG	DI	肠推进率/%
正常		0	0	0	0	53.97±4.98
模型		2.30±0.67 <sup>1)</sup>	71.11±2.76 <sup>1)</sup>	1.68±0.27 <sup>1)</sup>	1.19±0.19 <sup>1)</sup>	71.98±5.50 <sup>1)</sup>
洛哌丁胺	1.6	1.40±0.70 <sup>2)</sup>	64.67±3.43 <sup>3)</sup>	1.37±0.25	0.88±0.14 <sup>3)</sup>	60.52±5.45 <sup>3)</sup>
生姜	1.0	1.30±0.82 <sup>2)</sup>	63.66±3.33 <sup>3)</sup>	1.29±0.24 <sup>3)</sup>	0.82±0.15 <sup>3)</sup>	58.93±5.44 <sup>3)</sup>
	0.32	1.70±0.82	67.50±5.82	1.53±0.31	1.04±0.26	65.45±6.91
	0.1	2.30±0.48	72.12±2.84	1.70±0.25	1.23±0.19	74.00±5.28

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>3)</sup> $P<0.01$ 。

3.2 生姜干预后腹泻小鼠肠蠕动变化 经测定,模型组小鼠的肠推进率显著高于正常组( $P<0.01$ ),提示模型复制成功;给予药物干预后,生姜高剂量组、洛哌丁胺组腹泻小鼠的肠推进率均显著降低( $P<0.01$ ),生姜中剂量组腹泻小鼠的肠推进率降低但无统计学差异,生姜低剂量组则出现升高趋势,数据见表1。说明服用高剂量的生姜粉混悬液后可显著抑制腹泻小鼠的肠蠕动,使其状态接近正常小鼠。

3.3 生姜对腹泻小鼠肠黏膜的保护作用 与正常组比较,模型组肠绒毛固有层水肿(黑色箭头),并可见较多的炎性细胞浸润(黄色箭头),且有大量肠绒毛上皮脱落(蓝色箭头)。与模型组比较,生姜高剂量组小鼠肠组织黏膜上皮完整,未见明显脱落,少量肠绒毛固有层轻度水肿,固有层可见少量的炎性细胞浸润(黄色箭头),见图1。提示服用生姜后腹泻小鼠肠黏膜损伤显著降低,且可能与肠蠕动受到抑制密切相关。

3.4 高剂量生姜干预后腹泻小鼠的代谢组学变化 正常组、模型组和生姜高剂量组小鼠血清正、负离子模式下的UPLC-QE-Orbitrap-MS总离子流色谱图(TIC)见图2。结果发现各组谱图的峰形及峰面积有一定差异,表明小鼠体内部分代谢物发生改



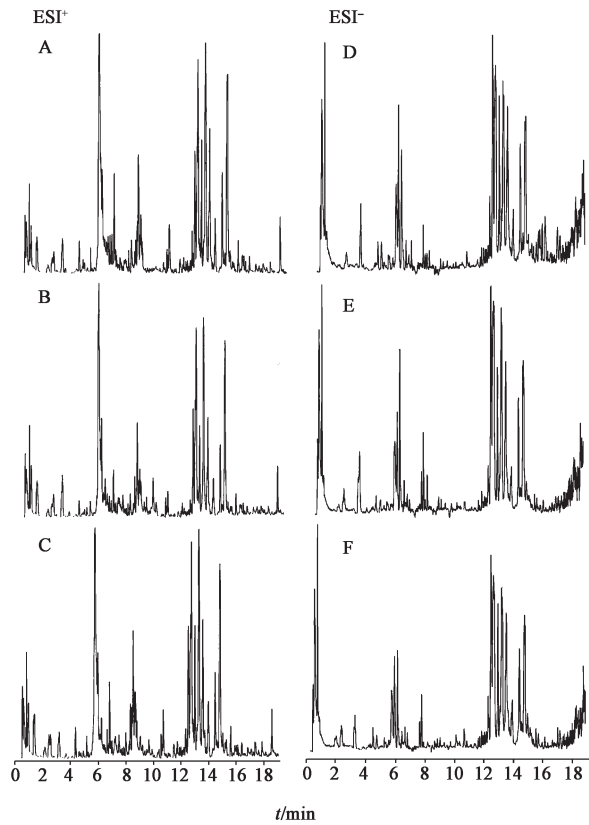
A. 正常组;B. 模型组;C. 生姜高剂量组(图4同)

图1 高剂量生姜干预后腹泻小鼠肠组织病理变化(HE,×400)

Fig. 1 Pathological changes of intestinal tissues in diarrhea mice after intervention of Zingiberis Rhizoma Recens with high dose (HE,×400)

变。测定腹泻小鼠服用高剂量生姜粉前后的血清生化成分,将所得数据进行主成分分析(PCA),见图3。结果发现正常组与模型组明显分离,说明正常小鼠腹泻后血清代谢受到干扰,产生了明显变化;生姜高剂量组介于正常组与模型组之间,且更加接近正常组,提示生姜干预后明显纠正了腹泻小鼠血清代谢异常变化,使血清代谢组分更接近正常组。

3.5 差异代谢物筛选 根据VIP值>1及 $P<0.05$ ,筛选差异代谢物。在正、负离子模式下,分别鉴定正常组和模型组、生姜高剂量组和模型组的差异代谢物,其中3组共有差异代谢物40个,见表2。层次聚类分析热图见图4。结果发现正常组、模型组与生姜高剂量组3组小鼠血清中40个差异代谢物相对



A, D. 正常组; B, E. 生姜高剂量组; C, F. 模型组  
图2 不同离子模式下各组小鼠血清的TIC

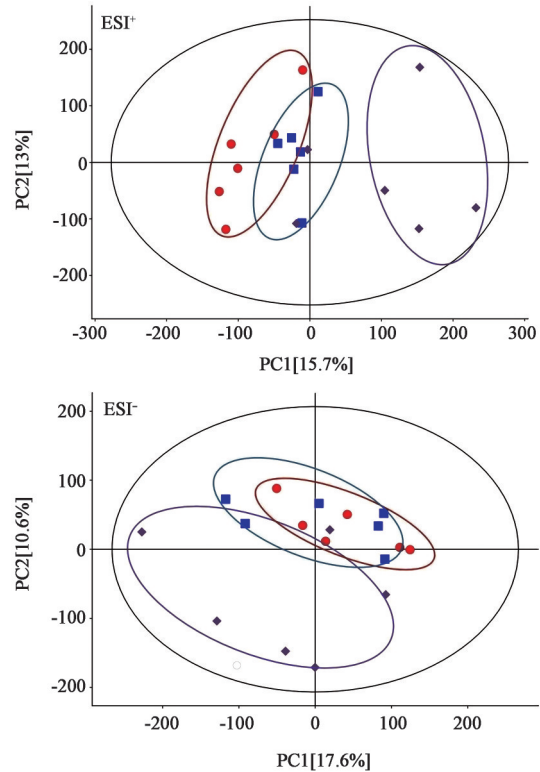
Fig. 2 TIC of serum of mice from each group under positive and negative ion modes

表达量(relative expression)具有明显差异,在灌服高剂量生姜粉混悬液后,腹泻小鼠血清中明显下调的18个代谢物转为上调,22个上调的差异代谢物转为下调,表明给予高剂量生姜干预后这些差异代谢物被不同程度地逆转,提示生姜可使腹泻小鼠异常的血清代谢得到明显恢复而接近正常组。

**3.6 代谢通路分析** 利用MetaboAnalyst 4.0软件,以通路拓扑分析影响值(impact) $\geq 0.01$ 为条件,筛选关键代谢通路,最终得到与生姜止泻密切相关代谢通路5条,见图5。图中气泡所在的横坐标和气泡大小表示该通路拓扑分析 impact 大小,气泡越大 impact 越大;气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析  $P$ ,颜色越深和  $P$  越小代表富集程度越显著。综合考虑富集分析和拓扑分析在图5中凸显出重要的通路。根据上述结果推测,腹泻小鼠服用高剂量生姜粉混悬液后可能是通过调节淀粉和蔗糖代谢、氨基糖和核苷酸糖代谢、果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢、色氨酸代谢进而发挥止泻作用。

#### 4 讨论

生姜临床应用多以切片煎汤内服,在保存过程



A. 正常组; B. 生姜高剂量组; C. 模型组

图3 高剂量生姜干预后腹泻小鼠血清代谢组分变化

Fig. 3 Changes of serum metabolic components of diarrhea mice after intervention of Zingiberis Rhizoma Recens with high dose

中容易失水、发生成分变化,冰冻干燥制成的生姜粉成分最接近生姜,避免了因失水、成分变化导致的剂量不准确的问题。为保证实验前后各种处理剂量统一,本研究在批量采收新鲜根茎后,统一采取真空冷冻干燥,然后粉碎成生姜粉,用时制成混悬液进行灌胃。

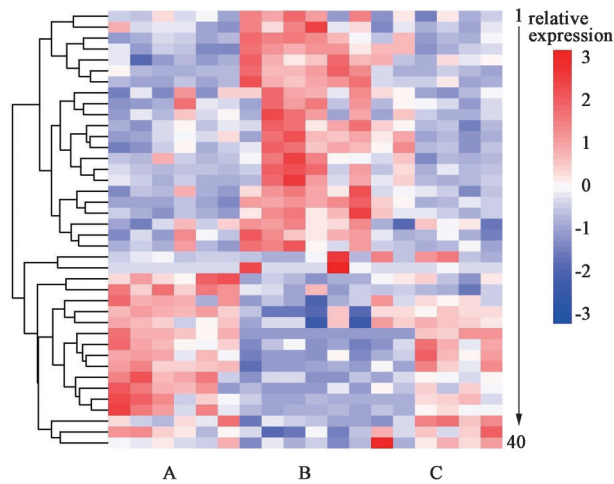
本研究发现,服用高剂量生姜粉混悬液后,腹泻小鼠的腹泻评分,LSIR,ALSG,DI和肠推进率均明显降低,表明生姜显著抑制小鼠肠蠕动、缓解腹泻,其可能的作用机制与各类糖代谢有关,涉及糖代谢的差异代谢物主要为葡萄糖1-磷酸。葡萄糖1-磷酸是合成糖核苷酸的重要前体物质,糖核苷酸参与合成糖原复合物,在能量储藏、信号转导等各种细胞行为中扮演重要角色<sup>[12]</sup>。另一方面,内源性葡萄糖1-磷酸促进钙在肠内的吸收<sup>[13]</sup>。有研究表明钙浓度升高可促进线粒体跨膜电位升高,进而促使生成三磷酸腺苷(ATP);其次,Ca<sup>2+</sup>与钙调蛋白结合后激活ATP酶分解产生能量,导致平滑肌收缩,促进肠蠕动<sup>[14]</sup>。因此,生姜可能通过调控各类糖代谢,显著降低小鼠血液中的葡萄糖1-磷酸水平,抑制钙在肠内的吸收,影响机体能量变化,进而抑制

表2 各组小鼠血清共有差异代谢物分析

Table 2 Analysis of common differential metabolites in serum of mice from three groups

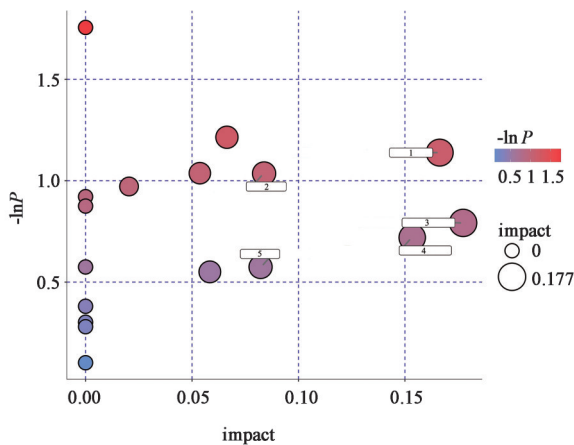
No.	差异代谢物	$t_R$ /min	$m/z$	模型组/正常组			生姜高剂量组/模型组		
				VIP值	FC	变化趋势	VIP值	FC	变化趋势
1	18(R)-羟化二十烷四烯酸 18R-HEPE	12.42	317.21	1.64	1.51	↑ <sup>1)</sup>	1.89	0.60	↓ <sup>3)</sup>
2	葡萄糖 1-磷酸 glucose 1-phosphate	1.15	259.02	1.64	2.06	↑ <sup>1)</sup>	2.07	0.34	↓ <sup>4)</sup>
3	5-羟色胺 serotonin	16.91	177.10	2.13	3.57	↑ <sup>2)</sup>	2.03	0.39	↓ <sup>4)</sup>
4	三萜环西番莲酸 B cyclopassifloic acid B	16.91	521.38	1.98	3.11	↑ <sup>2)</sup>	1.80	0.53	↓ <sup>4)</sup>
5	尿酸 uric acid	0.87	167.02	2.17	1.46	↑ <sup>2)</sup>	1.61	0.83	↓ <sup>3)</sup>
6	黄嘌呤核苷 xanthosine	0.99	283.07	2.30	1.99	↑ <sup>2)</sup>	2.42	0.48	↓ <sup>4)</sup>
7	黄嘌呤 xanthine	0.87	151.03	2.01	17.08	↑ <sup>2)</sup>	1.63	0.21	↓ <sup>4)</sup>
8	酵母甾醇中间体 2 zymosterol intermediate 2	20.76	385.35	1.54	1.45	↑ <sup>1)</sup>	1.91	0.69	↓ <sup>4)</sup>
9	天门冬氨酰苯丙氨酸 aspartylphenylalanine	1.93	279.09	1.78	0.24	↓ <sup>2)</sup>	1.94	5.69	↑ <sup>4)</sup>
10	十七烷酸 heptadecanoic acid	14.06	269.25	1.70	0.78	↓ <sup>1)</sup>	1.78	1.26	↑ <sup>3)</sup>
11	(1xi, 2xi)-1-(4-hydroxyphenyl)-1, 2, 3-propanetriol 3-O-β-D-glucopyranoside	3.34	347.13	1.85	2.22	↑ <sup>2)</sup>	1.82	0.46	↓ <sup>4)</sup>
12	MG[18:3(6Z,9Z,12Z)/0:0/0:0]	16.72	353.27	1.38	2.18	↑ <sup>1)</sup>	1.52	0.46	↓ <sup>3)</sup>
13	1-油酰甘油磷脂酰肌醇 1-oleoylglycerophosphoinositol	12.96	599.32	1.89	2.24	↑ <sup>2)</sup>	1.74	0.59	↓ <sup>3)</sup>
14	α-(2-甲基亚丙基)苯乙醛 4-methyl-2-phenyl-2-pentenal	7.68	175.11	1.60	1.66	↑ <sup>1)</sup>	1.91	0.53	↓ <sup>3)</sup>
15	L-墨蝶呤 L-sepiapterin	1.86	238.09	1.83	3.67	↑ <sup>1)</sup>	1.82	0.34	↓ <sup>3)</sup>
16	anigorufone	3.84	273.09	1.52	8.32	↑ <sup>1)</sup>	1.37	0.22	↓ <sup>3)</sup>
17	佛手苷内酯 bergapten	1.16	217.05	1.92	1.66	↑ <sup>2)</sup>	2.20	0.64	↓ <sup>4)</sup>
18	N-stearoyltryptamine	18.71	427.36	2.21	4.73	↑ <sup>2)</sup>	2.25	0.44	↓ <sup>4)</sup>
19	13-oxo-9E,11E-octadecadienoic acid	13.19	293.21	2.29	2.57	↑ <sup>2)</sup>	2.05	0.57	↓ <sup>4)</sup>
20	6-唾液酰乳糖 6-sialyllactose	12.13	634.22	1.61	1.62	↑ <sup>1)</sup>	1.66	0.53	↓ <sup>4)</sup>
21	7-烯胆(甾)烷醇 lathosterol	26.51	369.35	1.51	2.26	↑ <sup>1)</sup>	1.23	0.31	↓ <sup>4)</sup>
22	亮氨酰-异亮氨酸 leucyl-isoleucine	4.59	245.19	1.71	1.59	↑ <sup>1)</sup>	2.15	0.59	↓ <sup>4)</sup>
23	20-hydroxy-PGF <sub>2α</sub>	10.48	353.23	1.48	4.59	↑ <sup>2)</sup>	1.18	0.41	↓ <sup>3)</sup>
24	mannose 6-phosphate	0.69	283.02	1.98	4.58	↑ <sup>2)</sup>	2.28	0.17	↓ <sup>4)</sup>
25	二十烷五烯酸 eicosapentaenoic acid	15.21	301.22	2.26	0.56	↓ <sup>2)</sup>	1.59	1.29	↑ <sup>3)</sup>
26	1H-indole-3-carboxaldehyde	3.02	144.04	1.28	0.53	↓ <sup>1)</sup>	1.35	2.14	↑ <sup>3)</sup>
27	O-demethylfoncecin	5.46	277.07	1.75	0.51	↓ <sup>2)</sup>	1.81	1.64	↑ <sup>4)</sup>
28	L-缬氨酸 L-valine	2.91	158.08	1.54	0.27	↓ <sup>2)</sup>	1.54	3.07	↑ <sup>3)</sup>
29	庚二酸 pimelic acid	3.91	159.07	1.31	0.51	↓ <sup>1)</sup>	1.36	2.13	↑ <sup>3)</sup>
30	4,5-dimethyl-2-heptyloxazole	9.68	196.17	2.37	0.00	↓ <sup>2)</sup>	1.91	1.34×10 <sup>5</sup>	↑ <sup>3)</sup>
31	甲酰-5-羟基环脲胺 formyl-5-hydroxykynurenamine	4.61	209.09	1.96	0.35	↓ <sup>2)</sup>	1.70	2.43	↑ <sup>3)</sup>
32	3a,6b,7b,12b-tetrahydroxy-5b-cholanoic acid	15.73	425.29	2.08	0.39	↓ <sup>2)</sup>	1.99	2.38	↑ <sup>3)</sup>
33	γ-谷酰基谷氨酸 γ-glutamylglutamic acid	0.82	277.10	2.23	0.56	↓ <sup>2)</sup>	2.04	1.59	↑ <sup>3)</sup>
34	氢化黄体酮 5a-pregnane-3,20-dione	16.94	317.25	1.92	0.34	↓ <sup>2)</sup>	1.52	1.59	↑ <sup>3)</sup>
35	13-L-hydroperoxylinoleic acid	14.98	295.22	1.46	0.11	↓ <sup>2)</sup>	2.01	4.81	↑ <sup>4)</sup>
36	11(R)-羟基二十烷四烯酸 11(R)-HETE	13.25	319.23	1.73	0.10	↓ <sup>1)</sup>	1.52	4.47	↑ <sup>3)</sup>
37	5-羟基二十烷四烯酸 5-HETE	15.03	303.23	2.21	0.14	↓ <sup>2)</sup>	2.01	3.03	↑ <sup>3)</sup>
38	胆绿素 biliverdin	9.81	583.26	1.42	0.57	↓ <sup>1)</sup>	1.60	2.06	↑ <sup>3)</sup>
39	5-aminopentanal	20.63	102.09	1.69	0.75	↓ <sup>2)</sup>	1.93	1.35	↑ <sup>4)</sup>
40	精胺 spermine	0.52	203.22	1.51	0.78	↓ <sup>1)</sup>	1.81	1.56	↑ <sup>3)</sup>

注: ↑.含量上升; ↓.含量下降; FC.差异倍数; 与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.01,<sup>2)</sup>P<0.01; 与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01。



红色表示该物质含量高表达;蓝色表示该物质含量低表达;化合物编号同表2

图4 高剂量生姜干预腹泻小鼠差异代谢物的层次聚类分析  
Fig. 4 Hierarchical clustering analysis of different metabolites in diarrhea mice after intervention of Zingiberis Rhizoma Recens with high dose



1. 氨基糖和核苷酸糖代谢;2. 半乳糖代谢;3. 淀粉和蔗糖代谢;4. 果糖和甘露糖代谢;5. 色氨酸代谢

图5 腹泻小鼠血清中差异代谢物的代谢通路富集  
Fig. 5 Metabolic pathway enrichment of differential metabolites in serum of diarrhea mice

肠平滑肌收缩。

血清代谢组学研究结果还发现,生姜可能通过调控氨基酸代谢发挥止泻作用。涉及氨基酸代谢的主要差异代谢物为5-羟色胺,主要影响色氨酸代谢。5-羟色胺是一种重要的肠道信号分子,能够推进肠运动,增加肠内水和电解质,促进排便乃至腹泻<sup>[15-16]</sup>,这与腹泻最初发病机制相一致。此外,多项研究表明,5-羟色胺与肠道炎症反应相关,可能参与肠道炎症反应的病理过程<sup>[17-18]</sup>。MA等<sup>[3]</sup>发现生姜在缓解抗生素相关性腹泻的过程中,可改善结肠组织的病理状况,减轻肠道炎症,提高肠道屏障的完

整性。在本研究中,给予高剂量生姜粉混悬液干预后,腹泻小鼠肠黏膜损伤显著降低,推测生姜也可能通过调节色氨酸代谢,显著降低小鼠血清的5-羟色胺水平,缓解机体肠道组织的炎症反应,进而抑制肠运动。

线粒体不仅调节能量代谢,也可以激活炎症反应<sup>[19]</sup>,较多文献报道,线粒体与炎症信号调节具有相关性<sup>[20-21]</sup>。与生姜止泻相关的代谢通路主要包括糖代谢和氨基酸代谢,所涉及的潜在差异代谢物与能量代谢、炎症反应密切相关,最终推测其止泻的作用机制可能是糖代谢和氨基酸代谢共同发挥作用,引起体内相关代谢反应,降低血清中的葡萄糖1-磷酸和5-羟色胺含量,主要介导线粒体功能,影响机体能量变化,缓解炎症反应,从而抑制肠蠕动,缓解腹泻。

综上所述,本研究通过比较正常组、模型组、洛哌丁胺组和生姜高、中、低剂量组小鼠的腹泻评分,LSIR,ALSG,DI和肠推进率,结果显示生姜高剂量组能够缓解腹泻小鼠的腹泻症状,明显降低小鼠腹泻评分,LSIR,ALSG,DI和肠推进率。观察正常组、模型组和生姜高剂量组小鼠的肠组织病理切片发现,生姜高剂量组可显著降低肠黏膜损伤。血清代谢组学分析发现,腹泻小鼠体内代谢物发生明显变化,内服高剂量生姜粉混悬液干预后异常代谢可显著回调,其中胆绿素、甲酰-5-羟基环脲胺和氢化黄体酮等明显上调,葡萄糖1-磷酸、酵母甾醇中间体2和黄嘌呤等明显下调;代谢通路分析发现,生姜抑制肠蠕动进而发挥止泻的作用机制可能与糖代谢、氨基酸代谢有关,至于这2条代谢通路的相关性及深层机制,仍需通过实验验证。

[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,2020:179.

[2] 田光芳,张渊智,余玉红. 生姜泻心汤在功能性消化不良重叠腹泻型肠易激综合征中的应用[J]. 中国现代药物应用,2020,14(11):208-210.

[3] MA Z J, WANG H J, MA X J, et al. Modulation of gut microbiota and intestinal barrier function during alleviation of antibiotic-associated diarrhea with Rhizoma Zingiber Officinale (ginger) extract [J]. Food Funct, 2020, 11(12):10839-10851.

[4] KUBRA I R, RAO L J M. An impression on current developments in the technology, chemistry, and

- biological activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2012, 52(8): 651-688.
- [5] RIYAZI A, HENSEL A, BAUER K, et al. The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*), its fractions and isolated compounds on the 5-HT<sub>3</sub> receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum[J]. Planta Med, 2007, 73(4): 355-362.
- [6] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Persistent diarrhoea in children in developing countries: memorandum from a WHO meeting [J]. Bull World Health Organ, 1988, 66(6): 709-717.
- [7] 李永彪, 吴兰兰, 樊玉青, 等. 蜘蛛香环烯醚萜部位干预CUMS致抑郁小鼠脑组织的<sup>1</sup>H-NMR代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(19): 195-203.
- [8] 王淑, 王信, 孙萍, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的白花蛇舌草干预结肠炎相关结肠癌小鼠血清代谢组学分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 94-104.
- [9] 周干南, 胡芝华, 汪亚先, 等. 小鼠腹泻模型的制备与腹泻指数的应用[J]. 中草药, 1994, 25(4): 195-196, 199, 223-224.
- [10] 杨晓希, 武小利, 高纺, 等. 不同穴位艾灸对腹泻模型小鼠腹泻指数及小肠AQP8、VIP及SP表达的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(2): 50-53.
- [11] KURITA A, KADO S, KANEDA N, et al. Modified irinotecan hydrochloride (CPT-11) administration schedule improves induction of delayed-onset diarrhea in rats[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2000, 46(3): 211-220.
- [12] 许向华. 葡萄糖-1-磷酸高产菌株的选育及发酵条件优化[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [13] FUJINAKA H, NAKAMURA J, KOBAYASHI H, et al. Glucose 1-phosphate increases active transport of calcium in intestine[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 460(2): 152-160.
- [14] 宋晓冬, 王美蓉, 张瑾锦, 等. 中药胃肠舒对Ca<sup>2+</sup>信号传导途径的调控[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(8): 866-869.
- [15] MAWE G M, COATES M D, MOSES P L. Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2006, 23(8): 1067-1076.
- [16] GERSHON M D. Review article: serotonin receptors and transporters-roles in normal and abnormal gastrointestinal motility[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004, 20(Suppl 7): 3-14.
- [17] SHAJIB M S, KHAN W I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation[J]. Acta Physiol (Oxf), 2015, 213(3): 561-574.
- [18] 陈梦露, 董仕楨, 常永超, 等. 5-羟色胺对肠炎小鼠结肠组织中GRP78表达的影响[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2016, 51(2): 171-175.
- [19] 于妍. 川芎嗪、黄芪液和参附液抑制心肌肥大及对线粒体和能量代谢的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.
- [20] 刘彦君. 鱼腥草来源的胞外囊泡对巨噬细胞线粒体代谢和炎症反应的调控作用[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [21] 王磊, 刘子泉, 侯伊玲, 等. 富氢水抑制离心运动后骨骼肌线粒体氧化应激和炎症反应[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(29): 4682-4687.

[责任编辑 刘德文]