

· 配伍 ·

厚朴醇提物与远志醇提物配伍对大鼠粪便代谢物的影响

马荣, 谢倩, 王建*, 黄立华*, 马骁, 陈念, 董泰玮, 郭晓庆, 樊亚梅

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] **目的:**考察厚朴醇提物、远志醇提物及二者配伍对大鼠粪便代谢物的影响,分析其潜在的代谢通路,为探索厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的机制提供实验依据。**方法:**将40只SD雄性大鼠随机分为空白组,厚朴醇提物组($3.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),远志醇提物组($1.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),配伍组($3.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1} + 1.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),连续灌胃给药3 d,收集大鼠末次给药24 h内的粪便,采用UPLC-Q-TOF-MS采集粪便代谢物数据,流动相乙腈(A)-0.1%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~0.5 min,3% A;0.5~12.5 min,3%~70% A;12.5~13 min,70%~90% A;13~16 min,90%~97% A;16~17 min,97%~100% A;17~22 min,100% A;22~23 min,100%~3% A),电喷雾离子源,正、负离子模式数据采集范围 m/z 50~1 200;借助Progenesis Q1 v2.0, SIMCA-P 14.0, SPSS 20.0, MetaboAnalyst 4.0等软件进行多元分析,筛选特征代谢标志物并分析其相关代谢通路。**结果:**共筛选出5-亚胺甲基四氢叶酸, L-3-羟基犬尿氨酸, 7,8-二氢蝶酸等17个特征代谢标志物,其相关代谢通路为不饱和脂肪酸的生物合成、亚油酸代谢、维生素B₆代谢、叶酸生物合成等。**结论:**厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的作用机制可能与嘌呤代谢、叶酸生物合成、色氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成有关。

[关键词] 厚朴; 远志; 配伍; 粪便; 代谢标志物; 色氨酸代谢; 初级胆汁酸

[中图分类号] R22;R24;R28;C37;R969.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0001-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190303

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181115.1315.043.html>

[网络出版时间] 2018-10-19 14:21

Effect of Compatibility of Alcohol Extract of Magnoliae Officinalis Cortex and Alcohol Extract of Polygalae Radix on Fecal Metabolites of Rats

MA Rong, XIE Qian, WANG Jian*, HUANG Li-hua*, MA Xiao, CHEN Nian, DONG Tai-wei,
GUO Xiao-qing, FAN Ya-mei

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Key Laboratory of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources in Sichuan Province, Key Laboratory Breeding Base of Co-founded by Sichuan Province and Ministry of Science and Technology, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of alcohol extract of Magnoliae Officinalis Cortex, alcohol extract of Polygalae Radix and their compatibility on fecal metabolites of rats, analyze its potential metabolic pathways, and provide experimental basis for exploring the possible mechanism of Magnoliae Officinalis Cortex relieving gastrointestinal motility disorders induced by Polygalae Radix. **Method:** Forty male SD rats were randomly divided into the normal group, alcohol extract of Magnoliae Officinalis Cortex group ($3.50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), alcohol extract of Polygalae Radix group ($1.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and compatibility group ($3.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of alcohol extract of Magnoliae Officinalis Cortex + $1.75\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of alcohol extract of Polygalae Radix). Fecal samples were collected

[收稿日期] 20180913(015)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473371);四川省科技厅面上项目(2017JY0133);四川省教育厅重点项目(17ZA0147)

[第一作者] 马荣,在读硕士,从事中药药性理论与应用研究,E-mail:648510213@qq.com

[通信作者] *王建,教授,博士生导师,从事中药药性理论与应用研究,Tel:028-61800231,E-mail:jianwang08@163.com;

*黄立华,博士,讲师,从事中药药性理论与应用研究,Tel:028-61800237,E-mail:378097998@qq.com

within 24 h after continuous gavage for 3 days. The fecal metabolites in each group was detected by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight-mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS), mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution for gradient elution, data collection range was m/z 50-1 200 under positive and negative ion mode of electrospray ionization. The characteristic biomarkers and corresponding metabolic pathways were analyzed or screened by Progenesis QI v2.0, SIMCA-P 14.0, SPSS 20.0, MetaboAnalyst 4.0 and other softwares. **Result:** A total of 17 characteristic metabolic markers were screened out, including 5-formiminotetrahydrofolic acid, *L*-3-hydroxykynurenine, 7, 8-dihydropteroic acid, etc. The main related pathways included biosynthesis of unsaturated fatty acids, linoleic acid metabolism, vitamin B₆ metabolism, etc. **Conclusion:** The mechanism of Magnoliae Officinalis Cortex relieving gastrointestinal motility disorders induced by Polygalae Radix may be related to purine metabolism, folate biosynthesis, tryptophan metabolism and primary bile acid biosynthesis.

[Key words] Magnoliae Officinalis Cortex; Polygalae Radix; compatibility; feces; metabolic markers; tryptophan metabolism; primary bile acids

远志为临床常用药,功效安神益智、祛痰^[1],具有抑菌、抗炎、抗癌、抗衰老、利尿等药理作用^[2],但也存在“戟喉”“腹胀”等不良反应^[3]。本课题组前期研究显示,生远志有损伤胃黏膜、障碍胃肠动力等胃肠靶器官毒副作用^[4];中药配伍减毒是中医遣方用药的特色优势,远志与厚朴配伍后可显著缓解远志所致的胃肠动力障碍,又能保存远志安神、祛痰的药效,达到“减副存效”的目的;综合疗效与经济成本等因素,以厚朴-远志(2:1)为最佳配比^[5-6]。其作用机制可能与促进胃动力起搏细胞活性、下调细胞神经元型一氧化氮合酶(nNOS)的表达有关^[7-8],但二者配伍减毒的深层次机制尚不清楚。

代谢组学通过分析代谢的终端产物,从整体展示生物体的内在变化,已被广泛用于中药的作用机制研究,并取得了一定的成果^[9-11]。本实验拟采用UPLC-Q-TOF-MS结合多变量数据统计分析方法研究厚朴醇提物与远志醇提物配伍对大鼠粪便代谢物的影响^[12-14],探讨厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的可能机制,为阐明二者“配伍减毒”的科学内涵提供实验依据。

1 材料

ACQUITY I-Class UPLC 型超高效液相色谱-Xevo G2-XS 型四级杆-飞行时间质谱联用仪(美国 Waters 公司,含 MassLynx 4.1 工作站),Neofuge 1600R 型低温离心机(上海力申科学仪器有限公司),Vortex3 型涡旋混匀器(德国 IKA 公司),JA5003 型电子分析天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),ULT1386-3-V 型 -80℃ 冰箱(美国赛默飞 Revco 公司)。

厚朴、远志饮片购于成都荷花池中药材市场,经

成都中医药大学卢先明教授鉴定分别为木兰科植物厚朴 *Magnolia officinalis* 的干燥干皮及远志科植物远志 *Polygala tenuifolia* 的干燥根,均符合 2015 年版《中国药典》(一部)的相关规定。聚山梨酯-80(tween-80,成都市科隆化学品有限公司,批号 2017111401),水为娃哈哈纯净水,甲酸、乙腈、甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量(200 ± 20) g,购于四川省医学科学院实验动物研究所,合格证号 SCXK(川)2013-15,实验动物饲养于成都中医药大学实验动物中心清洁级动物实验室。本文涉及的动物实验经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准,批准号 TCM-2016-312。

2 方法与结果

2.1 药物的制备 厚朴、远志饮片打粉,过三号筛,分别加 10 倍量 90% 乙醇回流提取 3 次,每次 2 h,用 6 层纱布趁热过滤并合并滤液,分别减压浓缩干燥,得厚朴、远志浸膏,计算得膏率分别为 25.41% 和 48.59%。量取 tween-80 12.5 mL,少量多次加水研磨均匀,加水定容至 250 mL,即得 5% tween-80 溶液。分别称取厚朴、远志浸膏 11.12, 10.63 g,分别用 5% tween-80 溶液 250 mL 研磨并配成质量浓度为 0.175, 0.087 5 g·mL⁻¹(以生药量计)的厚朴、远志醇提物供试液,即给药剂量分别相当于生药量厚朴 3.50 g·kg⁻¹和远志 1.75 g·kg⁻¹。称取等量的厚朴、远志浸膏,混合后用 5% tween-80 溶液研磨并配制成 0.175 g·mL⁻¹(厚朴) + 0.087 5 g·mL⁻¹(远志)的醇提物配伍药液,即给药剂量相当于生药量厚朴 3.50 g·kg⁻¹ + 远志 1.75 g·kg⁻¹。

2.2 动物分组及给药 健康雄性 SD 大鼠,适应性

喂养 3 d。按体质量随机分为空白组、厚朴醇提物组、远志醇提物组、配伍组共 4 组,每组 10 只。实验前置代谢笼单笼适应性喂养 1 d 后开展实验。各给药组均按 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给予厚朴醇提物、远志醇提物、醇提物配伍药液,空白组灌胃同体积 5% tween-80 溶液,连续给药 3 d。

2.3 粪样的收集与处理 分别收集末次给药后 24 h 内的粪样,并于收集粪样的离心管中提前加入 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 叠氮钠 $50 \mu\text{L}$ 作为防腐剂。采集过程中保持冰浴,收集的粪样于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 下低温保存备用。测定时于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 解冻,将粪样 100 mg 与预冷的水 $500 \mu\text{L}$ 混合,涡旋 3 min ,离心 10 min ($14\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$,下同),转移上清液,剩余的沉淀物用预冷的甲醇 $500 \mu\text{L}$ 进一步提取。将 2 次萃取的上清液合并,离心 15 min ,取上清液进样分析。将上述每个粪样称取 10 mg 于冰上研磨混合后按照上述方法处理制成质量控制 (quality control, QC) 样品,在实验过程中每隔 10 个样品进样 1 次 QC,以确定实验过程中仪器的稳定性。

2.4 检测条件

2.4.1 色谱条件 采用 ACQUITY UPLC HSS C_{18} 色谱柱 ($3.0 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$),柱温 $40 \text{ }^\circ\text{C}$,流速 $0.45 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,流动相乙腈 (A)-0.1% 甲酸水溶液 (B) 梯度洗脱 ($0 \sim 0.5 \text{ min}$, 3% A; $0.5 \sim 12.5 \text{ min}$, 3% ~ 70% A; $12.5 \sim 13 \text{ min}$, 70% ~ 90% A; $13 \sim 16 \text{ min}$, 90% ~ 97% A; $16 \sim 17 \text{ min}$, 97% ~ 100% A; $17 \sim 22 \text{ min}$, 100% A; $22 \sim 23 \text{ min}$, 100% ~ 3% A)^[15-16],样品室温度 $4 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $4.0 \mu\text{L}$ 。

2.4.2 质谱条件 采用电喷雾离子源 (ESI),正、负离子模式数据采集范围 m/z $50 \sim 1\ 200$ 。正、负离子模式下毛细管电压分别为 3, 2 kV; 锥孔电压 40 V ,脱溶剂气流速 $800 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,脱溶剂气温度 $500 \text{ }^\circ\text{C}$,锥孔气流量 $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$,离子源温度 $110 \text{ }^\circ\text{C}$,扫描时间 0.15 s ,扫描间延迟时间 0.02 s ,亮氨酸脑啡肽和甲酸钠用于校正仪器。

2.5 数据的处理与分析 将所得样本数据通过软件 Progenesis QI v2.0 进行提取。通过全扫描模式提取 m/z $50 \sim 1\ 200$ 的离子信息,记录其保留时间,采用 SIMCA-P 14.0 对提取的数据进行多元分析。利用无监督模式的主成分分析 (PCA) 对各给药组分别进行分类,并评价所建立模型的效率。进一步采用偏最小二乘法-判别分析 (PLS-DA) 对各给药组进行监督性分类,选取 $p(\text{corr})$ (表示变量对分类的贡献度大小及稳健性) 绝对值 ≥ 0.5 及变量重要性投

影 (VIP) 值 ≥ 1.0 的变量。将所选取的变量采用单因素方差分析,并计算差异倍数 (FC),选定具有显著性差异 ($P < 0.05$) 及 $\text{FC} \geq 1.5$ 的变量作为代谢标志物。将代谢标志物与人类代谢组数据库 (HMDB) 进行比对,采用 MetPA (<http://www.metaboanalyst.ca/>) 数据库进行通路分析。

2.6 大鼠粪便代谢标志物的分析

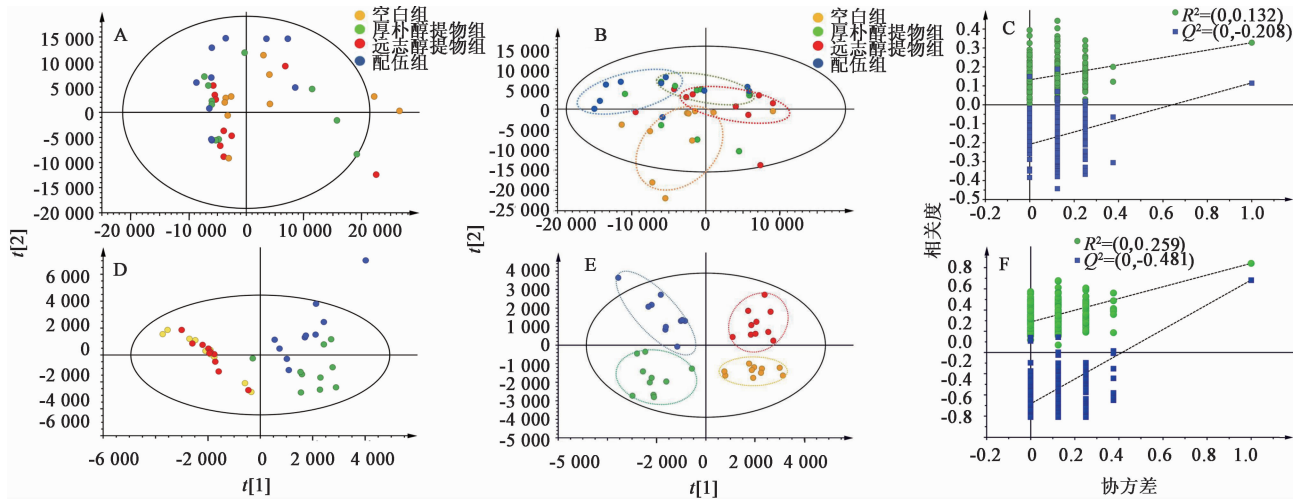
2.6.1 不同给药组间粪便样本的分类信息 由 PCA 分析可知,4 个组别之间的粪便代谢物差异无法区分;由 PLS-DA 分析可知,空白组、厚朴醇提物组、远志醇提物组与配伍组的粪便代谢物均能够明显区分,提示厚朴醇提物、远志醇提物及其配伍对大鼠粪便代谢物产生了显著的影响;由 PLS-DA 模型响应结果置换图可知,排列试验的左端任何一次随机排列产生的 R^2 (表示模型的拟合度) 和 Q^2 (表示模型的预测能力) 均小于右侧原始值 (正离子模式的 $R^2 = 0.132$, $Q^2 = -0.208$, 负离子模式的 $R^2 = 0.259$, $Q^2 = -0.481$), 证明模型有效,见图 1。根据 $\text{VIP} \geq 1.0$, $p(\text{corr})$ 绝对值 ≥ 0.5 , 正离子模式下筛选出 71 个特征代谢成分,负离子模式下筛选出 203 个特征代谢成分。

2.6.2 特征代谢标志物的鉴定 基于 VIP 值及 $p(\text{corr})$ 的筛选结果,将正、负离子模式中的特征代谢物分别进行 One-way ANOVA 分析,计算组间 P , 计算 4 个组别之间标准化的峰面积均值,比较各组间的 FC,选取 $P < 0.05$ 及 $\text{FC} \geq 1.5$ 的代谢物作为特征代谢标志物,并将其导入 HMDB,最终共鉴别出了 17 个特征代谢标志物,见表 1。

2.7 特征代谢标志物的通路分析 将特征代谢标志物的 HMDB 号输入 MetPA 数据库进行通路分析,共得到 15 个相关的通路,见图 2 和表 2。依据文献 [17],筛选代谢通路影响值 (pathway impact) > 0.02 和 $-\log(P) > 2$ 的通路视为潜在的关键代谢通路。

3 讨论

中药具有多成分、多靶点的特点,同时配伍后多种成分之间还有协同和拮抗等作用,这为揭示中药作用机制带来了困难。而代谢组学可基于整体观测药物作用效应,分析内源性代谢物的变化规律,有助于阐明药物作用机制^[18]。本课题组前期研究发现,皂苷类成分既是远志的活性成分,又是其毒副作用的物质基础;厚朴中酚类成分是促进胃肠动力的物质基础。通过细胞水平研究表明,厚朴与远志配伍可通过缓解细胞钙超载,维持细胞稳态,促进胃间质细胞活性,降低远志对胃间质细胞的损伤,从而缓解



A. ES1⁺ 下 PCA 得分; B. ES1⁺ 下 PLS-DA 得分; C. ES1⁺ 下 PLS-DA 模型响应置换; D. ES1⁻ 下 PCA 得分; E. ES1⁻ 下 PLS-DA 得分; F. ES1⁻ 下 PLS-DA 模型响应置换

图 1 各组大鼠粪便代谢物的分布信息

Fig. 1 Distribution of fecal metabolites of rats in four groups

表 1 不同给药组中特征代谢标志物的鉴定信息

Table 1 Identification of characteristic metabolic markers in different drug-administered groups

No.	t_R /min	m/z	化学式	化合物名称	误差 /ppm	远志醇提取物 vs 空白组		配伍组 vs 远志 醇提取物		相关 通路
						趋势	FC	趋势	FC	
1	2.01	493.154 5	$C_{20}H_{24}N_8O_6$	5-亚胺甲基四氢叶酸 5-formiminotetrahydrofolic acid	-4.25	↑	3.69	↑ ⁴⁾	784.89	f
2	2.57	447.150 0	$C_{10}H_{12}N_2O_4$	L-3-羟基犬尿氨酸 L-3-hydroxykynurenine	-4.82	↓	1.43	↑ ⁴⁾	225.15	l
3	4.01	627.217 5	$C_{14}H_{14}N_6O_3$	7,8-二氢蝶酸 7,8-dihydropteroic acid	-1.16	↓	1.65	↑ ⁴⁾	190.57	d
4	6.22	530.970 3	$C_{10}H_{15}N_4O_{14}P_3$	肌苷三磷酸 inosine triphosphate	2.57	↓ ¹⁾	1.69	↑ ³⁾	1.66	e
5	6.27	545.980 6	$C_{10}H_{16}N_5O_{14}P_3$	鸟苷三磷酸 guanosine triphosphate	1.33	↓ ¹⁾	1.72	↑ ³⁾	1.69	d, e
6	6.54	608.089 3	$C_{17}H_{27}N_3O_{17}P_2$	尿苷二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺 uridine diphosphate-N-acetylglucosamine	0.8	↓	1.60	↑ ³⁾	1.80	k
7	7.33	365.100 1	$C_8H_9NO_4$	4-吡哆酸 4-pyridoxic acid	2.86	↑	1.22	↑ ⁴⁾	2.27	e
8	10.21	410.028 0	$C_{10}H_{15}N_5O_9P_2$	脱氧腺苷二磷酸 deoxyadenosine diphosphate	1.93	-	-	N	-	e
9	10.63	471.310 1	$C_{27}H_{46}O_5$	3a, 7a, 12a-三羟基-5b-胆甾烷酸 3a, 7a, 12a-trihydroxy-5b-cholestanoic acid	3.16	↑ ¹⁾	1.50	↓ ⁴⁾	1.61	n
10	10.68	311.222 4	$C_{18}H_{32}O_4$	13-L-氢过氧基亚油酸 13-L-hydroperoxylinoleic acid	-1.12	-	1.11	↓ ⁴⁾	3.01	b
11	11.37	333.110 3	$C_8H_9NO_3$	吡哆醛 pyridoxal	3.24	-	-	N	-	c
12	13.62	297.095 6	$C_5H_{11}NO_2S$	L-蛋氨酸 L-methionine	2.76	N	-	↑ ⁴⁾	372.98	i, o
13	13.76	301.217 0	$C_{20}H_{30}O_2$	视黄基酯 retinyl ester	-1.00	-	1.12	↓ ⁴⁾	2.85	h
14	13.8	277.217 0	$C_{18}H_{30}O_2$	α-亚麻酸 alpha-linolenic acid	-0.95	-	1.05	↓ ⁴⁾	2.58	a, g
15	14.08	303.232 6	$C_{20}H_{32}O_2$	花生四烯酸 arachidonic acid	-1.12	-	1.11	↓ ³⁾	1.96	a, j
16	14.15	279.232 5	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸 linoleic acid	-1.78	-	1.07	↓ ⁴⁾	2.42	a, b
17	14.66	281.248 2	$C_{18}H_{34}O_2$	油酸 oleic acid	-1.39	-	1.11	↓ ⁴⁾	2.30	a, m

注: N. 产生新代谢物质; ↑. 上升; ↓. 下降。与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与远志醇提取物比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。a. 不饱和脂肪酸的生物合成; b. 亚油酸代谢; c. 维生素 B₆ 代谢; d. 叶酸生物合成; e. 嘌呤代谢; f. 一个叶酸碳库; g. α-亚麻酸代谢; h. 视黄醇代谢; i. 半胱氨酸和蛋氨酸代谢; j. 花生四烯酸代谢; k. 氨基糖和核苷酸糖代谢; l. 色氨酸代谢; m. 脂肪酸生物合成; n. 初级胆汁酸生物合成; o. 氨酰基-tRNA 生物合成(图 2 同)。

胃动力障碍; 在体肠灌流试验研究表明, 厚朴醇提取物可抑制远志醇提取物中细叶远志皂苷在空肠和结肠的吸收并使其迅速排出体外, 远志醇提取物又可通过促

进厚朴醇提取物中酚类物质的溶出而延长厚朴发挥促胃动力作用, 进而缓解远志所致的胃肠动力障碍^[19-20]。本研究以中医整体观为指导, 采用代谢组

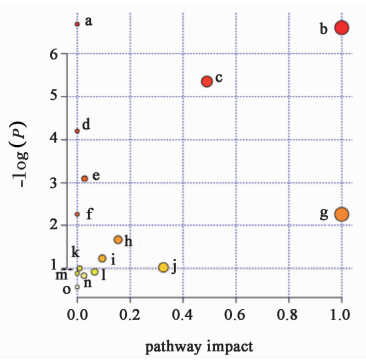


图 2 厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的特征代谢标志物所涉通路
Fig. 2 Pathways involved in characteristic metabolic markers of *Magnoliae Officinalis Cortex* relieving gastrointestinal motility disorders induced by *Polygalae Radix*

表 2 厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的代谢通路信息

Table 2 Information of metabolic pathways of *Magnoliae Officinalis Cortex* relieving gastrointestinal motility disorders induced by *Polygalae Radix*

编号	代谢通路	Match Status	Raw P	-log(P)	pathway impact
a	不饱和脂肪酸的生物合成 biosynthesis of unsaturated fatty acids	4/42	0	6.69	0
b	亚油酸代谢 linoleic acid metabolism	2/5	0	6.60	1.00
c	维生素 B ₆ 代谢 vitamin B ₆ metabolism	2/9	0	5.35	0.49
d	叶酸生物合成 folate biosynthesis	2/16	0.02	4.20	0
e	嘌呤代谢 purine metabolism	3/68	0.05	3.09	0.03
f	一个叶酸碳库 one carbon pool by folate	1/9	0.10	2.26	0
g	α-亚麻酸代谢 alpha-linolenic acid metabolism	1/9	0.10	2.26	1.00
h	视黄醇代谢 retinol metabolism	1/17	0.19	1.67	0.15
i	半胱氨酸和蛋氨酸代谢 cysteine and methionine metabolism	1/28	0.29	1.23	0.09
j	花生四烯酸代谢 arachidonic acid metabolism	1/36	0.36	1.02	0.33
k	氨基糖和核苷酸糖代谢 amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1/37	0.37	1.00	0.01
l	色氨酸代谢 tryptophan metabolism	1/41	0.40	0.92	0.07
m	脂肪酸生物合成 fatty acid biosynthesis	1/43	0.41	0.88	0
n	初级胆汁酸生物合成 primary bile acid biosynthesis	1/46	0.43	0.83	0.03
o	氨基酰-tRNA 生物合成 aminoacyl-tRNA biosynthesis	1/67	0.57	0.57	0

注: Match Status. 与代谢组库精确匹配鉴定的代谢物数量/通路中代谢物的总数; Raw P. 通过通路分析得出的原始 P 值。

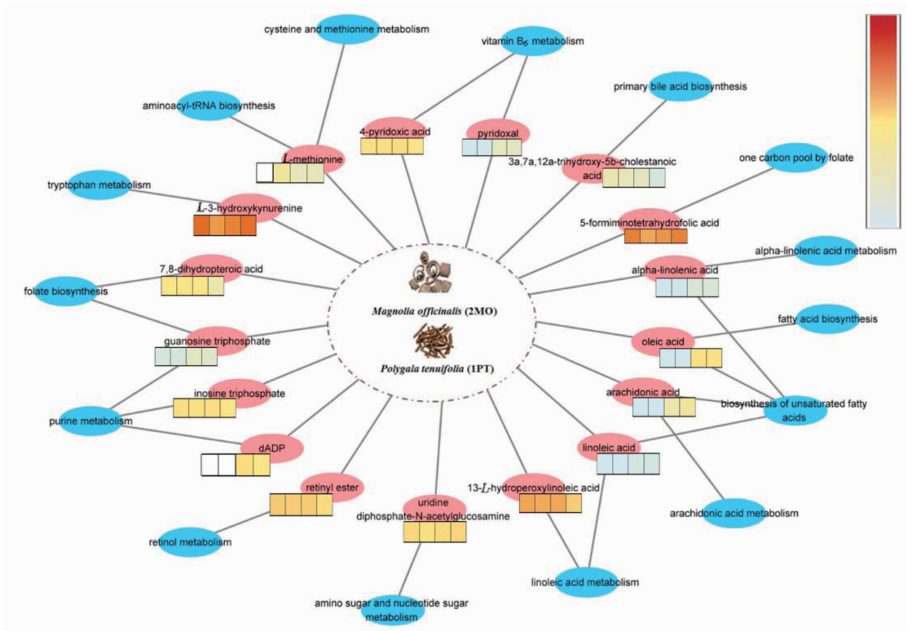
的次要器官^[21], 嘌呤分解代谢酶在出生后胃肠道成熟期间的表达显著增加^[22], 因此维持胃肠功能的完整性对嘌呤代谢具有较高的重要性。叶酸主要在胃肠道吸收, 通过肠肝循环被分解, 其代谢物是体内转移“一碳基团”的载体, 参与嘌呤的合成, 对各种氨基酸的代谢具有重要作用。若出现腹胀、腹泻等胃肠功能疾病, 则导致叶酸在胃肠道的吸收减少, 叶酸水平降低, 嘌呤代谢异常, 补充叶酸则可改善慢性胃炎患者胃黏膜的萎缩、肠化和异型增生^[23]。本文中远志醇提物组大鼠呈现胃胀气、腹泻等现象, 且大鼠粪便中 7,8-二氢蝶酸含量下降, 提示远志引起了叶酸生物合成下降, 而与厚朴配伍后可显著升高该代谢物; 同时, 远志醇提物组大鼠粪便中肌苷三磷酸、

学技术进一步从整体代谢轮廓揭示了厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的机制, 具有中医理论特色和新意。此外, 本文仅以雄性大鼠为研究对象, 排除了雌性大鼠生理周期对代谢物的可能影响。本研究结果显示厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的机制可能与 17 个特征代谢物及其 15 条代谢通路相关, 见图 3。结合相关文献分析, 嘌呤代谢^[21-22]、叶酸生物合成^[23]、色氨酸代谢^[24-26]、初级胆汁酸生物合成^[27-36]可能是其主要相关代谢通路。

3.1 嘌呤代谢及叶酸生物合成 嘌呤代谢是指核酸碱基腺嘌呤及鸟嘌呤等嘌呤衍生物的活体合成及分解, 小肠黏膜是嘌呤核苷酸从头合成及分解代谢

鸟苷三磷酸水平显著下降, 提示远志引起嘌呤代谢紊乱, 配伍厚朴可显著回调该代谢物至正常水平, 提示厚朴可能通过促进叶酸生物合成及调节嘌呤代谢来缓解远志所致胃肠动力障碍。

3.2 色氨酸代谢 胃肠道能够在无中枢神经系统支配条件下完成蠕动、分泌反射, 该过程与色氨酸的代谢物密切相关。色氨酸在人体内的代谢途径包括 5-羟色胺(5-HT)途径和犬尿氨酸途径。约 95% 的色氨酸在吲哚胺 2,3-双加氧酶的作用下生成犬尿氨酸, 继而生成 L-3-羟基犬尿氨酸。只有少部分色氨酸经色氨酸羟化酶生成 5-HT。5-HT 是存在于胃肠道的一种重要神经递质和旁分泌信号分子, 主要来源于黏膜层的肠嗜铬细胞, 参与肠道免疫和蠕动



粉色圆圈代表粪便特征代谢标志物;蓝色圆圈代表相关的通路; 从左到右依次分别表示空白组、远志醇提取物组、厚朴醇提取物组、配伍组代谢物含量水平,其含量水平以颜色深浅表示,含量越少颜色越浅

图 3 厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的代谢通路网络
Fig. 3 Network of metabolic pathways of Magnoliae Officinalis Cortex relieving gastrointestinal motility disorders induced by Polygalae Radix

功能的调节,与胃肠道功能的生理及病理密切相关^[24-25],若 5-HT 信号系统发生异常,则可导致胃肠道疾病。本研究显示,远志醇提取物可导致 L-3-羟基犬尿氨酸下降,配伍厚朴醇提取物可显著上调该代谢物,另有研究表明^[26],厚朴中的厚朴酚和与厚朴酚可剂量依赖性地抑制 5-HT 引起的平滑肌收缩。提示远志可能影响色氨酸代谢途径中犬尿氨酸与 5-HT 的代谢平衡,厚朴则可能通过调节色氨酸代谢来缓解远志所致的胃肠动力障碍。

3.3 初级胆汁酸生物合成 在人体内,肝细胞以胆固醇为原料合成初级胆汁酸。初级胆汁酸随胆汁流入肠道,在肠道菌群的作用下生成次级胆汁酸,经过肠壁重吸收后重回肝脏,再经胆道排入肠道,形成肠肝循环。未被肠道吸收的小部分胆汁酸在肠道菌群的作用下,衍生出多种胆烷酸的衍生物并由粪便排除。胆汁酸通过肠肝循环,对于疏水性营养素的消化和肠吸收具有重要作用^[27-28],部分胆汁酸也可以调节胃肠运动^[29-31],而腹胀、腹泻、胃肠动力障碍则会影响胆汁酸的肠肝循环^[32],引起胆汁酸生物合成紊乱,进而导致胆汁酸代谢途径中关键酶的活性下降或缺失,大量胆固醇和胆甾烷醇则通过尿液、粪便排出^[33-34]。本实验发现远志醇提取物可引起大鼠胃胀气、腹泻等现象,测得大鼠粪便中初级胆汁酸合成途径中的重要中间代谢物 3a,7a,12a-三羟基-5b-胆甾烷酸显著升高,提示远志可能导致初级胆汁酸生

物合成紊乱。配伍厚朴可显著回调该代谢物至正常水平。此外,厚朴煎剂具有保肝、利胆、促进大鼠胆汁分泌的作用^[35-36],综合提示厚朴配伍远志可能通过调控初级胆汁酸生物合成来缓解远志所致胃肠动力障碍,这可能与厚朴的行气、促消化功效相关。

另外,还同步开展了厚朴配伍远志对大鼠尿液代谢物的研究,同样显示远志可引起酪氨酸、色氨酸、维生素 B₆ 代谢及初级胆汁酸生物合成紊乱,厚朴配伍远志后可以调控上述代谢通路,二者研究结果部分吻合,尤其初级胆汁酸生物合成过程中,粪便、尿液的检测结果均表明远志导致大鼠体内 3a,7a,12a-三羟基-5b-胆甾烷酸显著升高,配伍厚朴可显著回调该过程,再次提示厚朴缓解远志的胃肠动力障碍可能与调节初级胆汁酸生物合成有关。综上所述,本研究从整体代谢轮廓揭示了厚朴缓解远志所致胃肠动力障碍的机制可能与嘌呤代谢、叶酸生物合成、色氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成等代谢通路有关,但尚未对相关通路的小分子进行验证,且胆汁酸通过肠肝循环在肠道中代谢,与胃肠动力具有重要相关性,从分子生物学角度对相关通路的机制进行验证及胆汁的代谢组学还有待后续深入研究。

[参考文献]

[1] 王建,张冰. 临床中药学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2016:228.

- [2] 马洪伟,付文亮,钟美蓉,等.远志药理活性研究进展[J].承德医学院学报,2010,27(2):196-198.
- [3] 田徽.生远志的胃肠毒性物质基础及蜜炙减毒部分机理研究[D].成都:成都中医药大学,2006.
- [4] 武云.生远志与蜜远志的毒理及其对胃肠运动影响的实验研究[D].成都:成都中医药大学,2005.
- [5] 江娟,王建,李达,等.远志与厚朴不同煎煮时间及不同配比对小鼠胃肠运动的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2009,30(3):380-382.
- [6] 马骁.厚朴汁炙远志减毒存效及化学成分研究[D].成都:成都中医药大学,2013.
- [7] 唐丹霞,王建,袁奕,等.厚朴汁炙远志含药血清对胃Cajal间质细胞活力及nNOS表达的影响[J].中药药理与临床,2013,29(6):100-103.
- [8] 唐丹霞,王建,郑新光,等.厚朴汁炙远志炮制品对胃间质细胞活力影响的探讨[J].中药与临床,2014,5(2):63-65,68.
- [9] DONG H, YAN G L, HAN Y, et al. UPLC-Q-TOF/MS-based metabolomic studies on the toxicity mechanisms of traditional Chinese medicine Chuanwu and the detoxification mechanisms of Gancao, Baishao, and Ganjiang[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13(9): 687-698.
- [10] 马致洁,章从恩,唐进法,等.雷公藤配伍甘草降低肝毒性的代谢通路探讨[J].药学学报,2017,52(7):1077-1084.
- [11] 唐冰雯,李俊健,毋福海,等.甘遂-甘草配伍对大鼠肾脏毒性代谢组学的影响[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(9):88-92.
- [12] 高鹏飞,刘卫红,吴俊珠,等.代谢组学在中医药研究中的应用进展[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(21):284-288.
- [13] SUN B, WANG X B, CAO R L, et al. NMR-based metabonomics study on the effect of Gancao in the attenuation of toxicity in rats induced by Fuzi[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 193: 617-626.
- [14] 章斌,娄子洋.液质联用技术在中药代谢物及代谢组学研究中的应用分析[J].第二军医大学学报,2011,32(6):658-662.
- [15] Williams M D, XIAN L, Huso T, et al. The fecal metabolome in hmgal transgenic mice with polyposis: evidence for potential screen for early detection of precursor lesions in colorectal cancer[J]. J Proteome Res, 2016, 15(12): 4176-4187.
- [16] YU M, JIA H M, ZHOU C, et al. Urinary and fecal metabonomics study of the protective effect of Chaihu-Shu-Gan-San on antibiotic-induced gut microbiota dysbiosis in rats[J]. Sci Rep, 2017, doi: 10.1038/srep46551.
- [17] 杨瑞,唐思,董晓茜,等.基于UPLC-Q-TOF-MS分析雷公藤配伍甘草治疗肾病综合征大鼠的尿液代谢组学[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(12):150-156.
- [18] 郭慧,崔扬,王秋红,等.基于代谢组学技术的中药复方研究近况[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(1):213-219.
- [19] 黄立华,王建,吴明权,等.远志、厚朴配伍对其活性成分在大鼠肠段吸收的影响[J].中成药,2015,37(4):739-745.
- [20] 罗凤娟,王建,马骁,等.远志-厚朴配伍对厚朴酚、和厚朴酚胃肠代谢的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(7):154-158.
- [21] Ho C Y, Miller K V, Savaiano D A, et al. Absorption and metabolism of orally administered purines in fed and fasted rats[J]. J Nutr, 1979, 109(8): 1377-1382.
- [22] Witte D P, Wiginton D A, Hutton J J, et al. Coordinate developmental regulation of purine catabolic enzyme expression in gastrointestinal and postimplantation reproductive tracts[J]. J Cell Biol, 1991, 115(1): 179-190.
- [23] 朱舜时,夏书军,陈晓宇,等.叶酸治疗萎缩性胃炎并干预胃癌生成的分子生物学机制[J].胃肠病学,2002,7(2):86-89.
- [24] 李小兰,江敏,阮征,等.色氨酸及其代谢产物5-HT对肠道功能的作用综述[J].食品安全质量检测学报,2014,5(7):1997-2002.
- [25] 丁健华,傅传刚,赵荣华.五羟色胺在胃肠道功能性疾病中的研究现状[J].世界华人消化杂志,2005,13(20):2405-2408.
- [26] 张卫卫.半夏厚朴汤及厚朴主要成分促胃肠运动、抗焦虑和抗抑郁作用的研究[D].沈阳:中国医科大学,2004.
- [27] Almé B, Bremmelgaard A, Sjövall J, et al. Analysis of metabolic profiles of bile acids in urine using a lipophilic anion exchanger and computerized gas-liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Lipid Res, 1977, 18(3): 339-362.
- [28] 徐运杰,汪前红.胆汁酸的作用与分子调控机制[J].饲料博览,2015,36(2):21-25.
- [29] Armstrong D N, Krenz H K, Modlin I M, et al. Bile salt inhibition of motility in the isolated perfused rabbit terminal ileum[J]. Gut, 1993, 34(4): 483-488.
- [30] Penagini R, Misiewicz J J, Frost P G. Effect of jejunal infusion of bile acids on small bowel transit and fasting jejunal motility in man[J]. Gut, 1988, 29: 789-794.
- [31] Jr S W, Shiff S, Cohen S. Effect of deoxycholic acid on colonic motility in the rabbit[J]. Am J Physiol, 1980, 238(4): G321-G325.
- [32] 周军.基于肝肠循环的“王氏益灵丸”神阙穴外治肝硬化肝源性腹泻的临床研究[D].上海:上海中医药大学,2016.
- [33] 王会敏,王正平,董旻岳.胆汁酸代谢与调控研究进展[J].国际消化病杂志,2010,30(2):79-82.
- [34] 张久聪,聂青和.胆汁酸代谢及相关进展[J].胃肠病学和肝病杂志,2008,17(11):953-956.
- [35] 孟宪元,尹珉,王学江.厚朴对低温条件下大鼠胆汁分泌影响的初步观察[J].北京中医,2005,24(3):180-181.
- [36] 陆茵,张大方.中药药理学[M].北京:人民卫生出版社,2015:126.

[责任编辑 刘德文]