

---

## 中文摘要

**选题依据：**现代研究和流行病学证明肠道微生物群和肺部之间存在密切的关联，称为“肠-肺”轴。基于“肠-肺”轴的理论，已有“肺病肠治”的研究，通过粪菌移植（Fecal microbiota transplantation, FMT）技术改变肠道菌群结构进而达到治疗呼吸系统疾病的效果，目前该方法已用于 COPD、肺损伤等疾病的治疗。已有研究报道中药或中药成分调节菌群结构和菌群代谢产物是治疗疾病的重要方式。款冬花是菊科植物款冬 *Tussilago farfara* L. 的干燥花蕾，具有止咳、祛痰、平喘的作用，款冬花的祛痰作用与肠道菌群的相关性尚不清楚。

**目的：**本研究拟基于肠道代谢组阐释款冬花祛痰的作用机制与活性成分。

**方法：**

- 1、建立混合抗生素菌群紊乱模型，观察款冬花（FF）祛痰作用的变化；利用 LC-MS 技术与款冬花祛痰作用相关的肠道代谢物。
- 2、利用粪菌移植实验，验证款冬花祛痰作用是否依赖肠道菌群；利用 LC-MS 技术检测与款冬花祛痰作用相关的肠道代谢物的变化。
- 3、基于肠道代谢组学筛选出来的款冬花代谢物（二氢咖啡酸、奎尼酸、咖啡酸）和关键代谢物（精氨酸）进行补充验证实验。通过肠道代谢组学和肺组织代谢组学分析补充二氢咖啡酸、奎尼酸以及精氨酸后内源性代谢物的变化。

**结果：**

1. 款冬花给药后能够显著增加酚红排泌发挥祛痰作用，经过混合抗生素预处理后款冬花的祛痰作用减弱，提示款冬花的祛痰作用依赖肠道菌群；基于 LC-MS 技术筛选出 28 个可能参与款冬花祛痰作用的差异肠道代谢物。
2. 与空白粪菌移植液（CFMT）相比，款冬花移植液（FFMT）能够显著增加酚红排泌，基于 LC-MS 技术进一步确定了与款冬花祛痰作用相关的 16 个关键差异代谢物。热灭菌的菌群移植液也具有祛痰作用，说明除了活菌，菌群移植液中的化学物质可能也发挥祛痰作用。
3. 对菌群移植液中检测到的咖啡酰基奎尼酸的代谢产物二氢咖啡酸、奎尼

---

酸、咖啡酸进行补充验证实验，结果显示二氢咖啡酸、奎尼酸具有祛痰作用；肠道代谢组学分析二氢咖啡酸、奎尼酸同样能够影响精氨酸代谢。精氨酸补充实验证明，精氨酸具有明显的祛痰作用，其机制可能是通过增加肺部活性磷脂的丰度来实现的祛痰作用。

**结论：** 本研究发现款冬花的祛痰机制依赖肠道菌群；DCA 和 QA 是款冬花发挥祛痰作用的关键化合物；精氨酸生物合成途径是款冬花发挥祛痰作用的重要机制。

**关键词：** 款冬花；祛痰；代谢组学；二氢咖啡酸、奎尼酸、精氨酸

## 目 录

中文摘要 .....	I
ABSTRACT .....	III
<b>第一章 引言 .....</b>	<b>1</b>
1.1 立体背景及意义 .....	1
1.2 研究内容、技术流程图及创新点 .....	1
1.2.1 研究内容 .....	1
1.2.2 技术路线图 .....	2
1.2.3 创新点 .....	2
<b>第二章 文献综述 .....</b>	<b>3</b>
2.1 基于肠道菌的中药干预肺部疾病的机制研究 .....	3
2.1.1 肠道菌与哮喘 .....	3
2.1.2 肠道菌与肺损伤 .....	3
2.1.3 肠道菌与肺癌 .....	4
2.1.4 肠道菌与肺纤维化 .....	4
2.1.5 肠道菌与呼吸窘迫综合征 .....	5
2.2 中药祛痰的研究进展 .....	5
2.2.1 中药祛痰药效的临床和动物实验研究 .....	5
2.2.2 中药祛痰作用机制的研究进展 .....	11
<b>第三章 基于肠道菌群紊乱的款冬花祛痰机制研究 .....</b>	<b>12</b>
3.1 引言 .....	12
3.2 实验材料及仪器 .....	12
3.2.1 材料 .....	12
3.2.2 动物 .....	12
3.2.3 仪器与试剂 .....	12
3.3 实验方法 .....	13
3.3.1 款冬花水提液和混合抗生素制备 .....	13
3.3.2 肠道菌群紊乱实验 .....	14
3.3.3 统计学分析 .....	16
3.4 实验结果 .....	16
3.4.1 款冬花祛痰药效实验 .....	16
3.4.2 肠道代谢组学分析 .....	17
3.5 本章小结 .....	23
<b>第四章 基于粪菌移植实验的款冬花祛痰机制研究 .....</b>	<b>24</b>
4.1 引言 .....	24
4.2 实验材料及仪器 .....	24
4.2.1 材料 .....	24
4.2.2 仪器与试剂 .....	24
4.3 实验方法 .....	25
4.3.1 粪菌移植实验 .....	25
4.3.2 制备粪菌移植液 .....	25

4.3.3 粪菌移植受体小鼠的肠道代谢组分析 .....	25
4.3.4 统计学分析 .....	25
4.4 实验结果 .....	26
4.4.1 粪菌移植祛痰效果分析 .....	26
4.4.2 肠道代谢组学分析 .....	27
4.5 本章小结 .....	32
<b>第五章 基于 CQAs 类和精氨酸成分的款冬花祛痰机制研究 .....</b>	<b>33</b>
5.1 引言 .....	33
5.2 实验材料及仪器 .....	33
5.2.1 材料 .....	33
5.2.2 仪器与试剂 .....	33
5.3 实验方法 .....	34
5.3.1 LC-MS 技术分析粪菌移植液中的 CQAs 类成分 .....	34
5.3.2 CQAs 类成分的补充实验 .....	36
5.3.3 肠道代谢组学分析 .....	36
5.3.4 精氨酸的补充实验 .....	36
5.3.5 肺组织代谢组学研究 .....	36
5.3.6 统计学分析 .....	38
5.4 实验结果 .....	38
5.4.1 粪菌移植液中 CQAs 类成分的定性分析 .....	38
5.4.2 CA、DCA、QA 的祛痰实验结果 .....	39
5.4.3 DCA、QA 祛痰作用的肠道代谢组分析 .....	39
5.4.4 精氨酸补充实验结果 .....	41
5.4.5 肺组织代谢组学分析 .....	41
5.5 讨论 .....	53
5.6 本章小结 .....	55
<b>第六章 总结与展望 .....</b>	<b>56</b>
6.1 研究工作总结 .....	56
6.2 不足与展望 .....	56
<b>参 考 文 献 .....</b>	<b>57</b>
<b>攻读学位期间取得的研究成果 .....</b>	<b>65</b>
<b>致 谢 .....</b>	<b>66</b>
<b>个人简况及联系方式 .....</b>	<b>67</b>
<b>承 诺 书 .....</b>	<b>68</b>
<b>学位论文使用授权声明 .....</b>	<b>69</b>

# 第一章 引言

## 1.1 立体背景及意义

现代研究和流行病学证明肠道微生物群和肺部之间存在密切的关联，称为“肠-肺”轴<sup>[1]</sup>。基于“肠-肺”轴的理论，已有“肺病肠治”的研究，例如：Hufnagl K等人通过对哮喘患者口服益生菌和膳食纤维来增加益生菌以及短链脂肪酸的丰度增加，进而达到缓解哮喘的效果<sup>[2]</sup>；包春秀等人通过对 COPD 患者服用宣白承气汤来抑制肠道有害菌的增殖，进而达到缓解 COPD 症状的效果<sup>[3]</sup>。上述研究表明中药或中药成分调节菌群结构和菌群代谢产物是治疗疾病的重要方式。

款冬（*Tussilago farfara* L.）是菊科款冬属植物，花为菊科款冬的花蕾<sup>[4]</sup>。款冬花（FF）作为一种传统中药，FF 在中国广泛使用的历史已有 2000 多年，各个省份都有其分布。FF 最早记载于《神农本草经》，历来用于治疗咳嗽、哮喘、急、慢性支气管炎等疾病。FF 富含萜类、有机酸、黄酮类、生物碱、色酮、挥发油等成分。药理研究显示，FF 具有广泛的活性，如对呼吸、心血管和消化系统的影响，以及抗氧化、抗炎和神经保护活性<sup>[5]</sup>。现代药理学实验证明，FF 水提物具有明显的镇咳、祛痰、平喘活性<sup>[6][7]</sup>，但鲜有创新进展，尤其是在相关机制方面。

基于此，本文对款冬花给药后小鼠肠道菌群以及代谢物的分析研究，以“肺-肠”轴为切入点，将药效学—代谢组学相结合，从肠道角度分析款冬花的祛痰机制。

## 1.2 研究内容、技术流程图及创新点

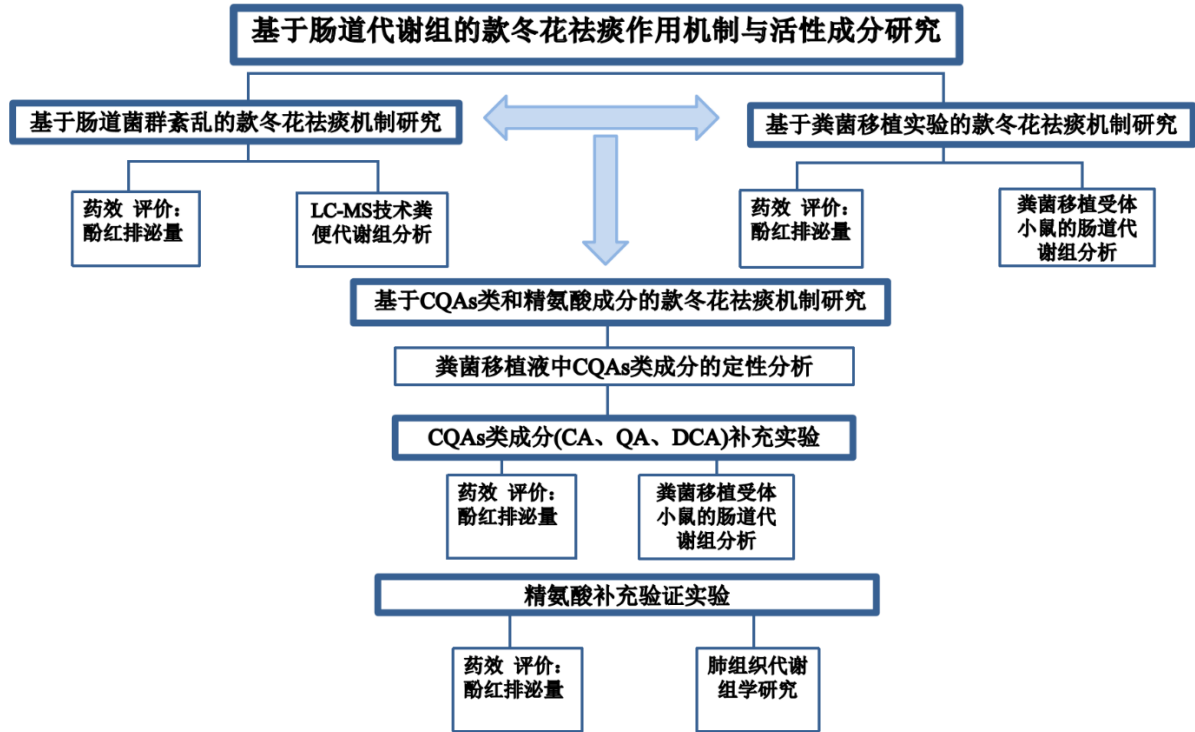
### 1.2.1 研究内容

1、建立混合抗生素菌群紊乱模型，观察款冬花（FF）祛痰作用的变化，进而分析款冬花与肠道菌群的相关性；利用 LC-MS 技术分析和肠道代谢组学分析来筛选与款冬花祛痰作用相关的肠道代谢物。

2、利用粪菌移植实验进一步验证款冬花祛痰作用是否依赖肠道菌群；利用 LC-MS 技术分析和肠道代谢组学分析来筛选与款冬花粪菌移植祛痰作用相关的肠道代谢物。

3、基于上述肠道代谢组学实验筛选出来的款冬花代谢物（二氢咖啡酸、奎尼酸、咖啡酸）和关键代谢物（精氨酸）进行补充验证实验。通过肠道代谢组学和肺组织代谢组学分析补充干预后内源性代谢物的变化。

### 1.2.2 技术路线图



### 1.2.3 创新点

本研究以“肺-肠”轴为切入点，将药效学—代谢组学相结合，从肠道角度分析款冬花的祛痰机制，为以后此类研究提供了新的方法和思路。

## 第二章 文献综述

### 2.1 基于肠道菌的中药干预肺部疾病的机制研究

现代研究报道，肠道微生物群和代谢物的循环和运输、免疫细胞的直接迁移、炎症介质的转运等生命活动是“肺-肠”轴的重要沟通渠道<sup>[8]</sup>。在上述这些因素中，肠道微生物群和代谢物的途径已被证实在肠道和肺部疾病中起特别重要的作用。一方面，肠道内的微生物紊乱会显著改变具有免疫调节特性的小分子代谢物的水平，导致炎症反应和一系列肠道疾病<sup>[9]</sup>。与之相反的是，肠道益生菌和代谢物可通过“肺-肠”轴以缓解肺部炎症，进而发挥调节肺部的免疫应答保护肺部健康的作用<sup>[10]</sup>。小鼠研究表明，源自肠道微生物群的产物，如 SCFAs，可以通过启动免疫效应细胞来调节全身免疫和局部肺部炎症<sup>[11]</sup>。另一方面，呼吸道和胃肠道的微生物群落也可能通过淋巴管中的液体进行相互交换，从而直接影响肺部的健康<sup>[12]</sup>。研究发现，肺结核患者和健康志愿者之间的肠道微生物群组成不同。此外，微生物稳态可通过粪便移植来恢复或维持，从而改善肺部疾病<sup>[13]</sup>。综上所述，探索肠和肺疾病发展过程中微生物群谱和代谢产物的变化规律，对于后续研究肺与肠道的相互作用机制、疾病的防护或治疗方面具有重要意义。

#### 2.1.1 肠道菌与哮喘

哮喘是一种肺部慢性炎症性疾病。其临床表现包括 AHR，患者的症状伴有呼吸困难，喘息，胸闷和咳嗽等症状，其强度随时间发生变化<sup>[14]</sup>。慢性炎症导致危及生命的肺功能进行性丧失，这与疾病的严重程度有关。近年来，其患病率和发病率显著增加，影响了世界人口的 1-18%，并在 2019 年造成约 2 万人死亡<sup>[15]</sup>，尽管大多数患者表现出可控的症状，但生活质量仍然受到影响，给卫生系统造成了巨大的经济和社会负担。Wen 等人利用卵清蛋白和氢氧化铝建立小鼠哮喘模型<sup>[16]</sup>，结果显示定喘汤可以减少咳嗽次数，改善气管和肺部的病理损伤，抑制 *Mycoplasma*、*Oscillatoria* 和 *Pseudomonas* 等菌属的丰度，增加 *Bifidobacterium* 等的丰度。

#### 2.1.2 肠道菌与肺损伤

急性肺损伤（ALI）是由多种肺内（肺炎和感染）或肺外致病因素引起的急性弥漫性炎症性疾病，ALI 可能会进一步诱发急性呼吸窘迫综合征（ARDS）<sup>[17]</sup>。病

理特征的特征<sup>[18]</sup>是肺泡上皮屏障破坏，这显著增加基底膜通透性，并且由于巨噬细胞，中性粒细胞和其他炎症细胞流入肺部而引起肺间质水肿。熊等人<sup>[19]</sup>利用黄芩治疗急性肺损伤，黄芩逆转了 ALI 中的色氨酸代谢物异常；重塑了肠道微生物群落的组成；*Akkermansia muciniphila* 的丰度与色氨酸/犬尿氨酸途径的限速酶吲哚胺 2, 3-双加氧酶 1 (IDO1) 活性显著呈负相关<sup>[19]</sup>。后续进行粪菌移植实验，活的和巴氏灭菌的 *A. muciniphila*，两种粪菌移植都可以改善炎症反应并下调 IDO1 表达，从而恢复色氨酸代谢失衡。综上所述，黄芩可能作用于 *A. muciniphila* 丰度，调节 IDO1 活性，从而改善 ALI。

### 2.1.3 肠道菌与肺癌

肺癌在癌症相关名单中一直名列前茅，根据世卫组织分享的公布数据，它在世界各地引起了很高的发病率和死亡率，其中大约 80%-85%的肺癌是非小细胞肺癌 (NSCLCs) <sup>[20]</sup>。目前程序性死亡抑制剂 1 (PD-1) 是针对各种癌症的有效癌症免疫疗法，但是其治疗率还需要进一步的提高，病人因为对 PD-1 的治疗不够敏感往往造成治疗效果不理想。Huang<sup>[21]</sup>等人利用 PD-1 联合人参多糖对肺癌模型小鼠进行治疗，实验结果显示与单纯的 PD-1 相比，人参多糖联合治疗组能够显著增加 *Muribaculaceae* 的丰度；还可以增加丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、己酸和戊酸的丰度；抑制肿瘤细胞中 IOD 的表达；显著延缓肿瘤生长；增加 IFN- $\gamma$ ，TNF- $\alpha$  和 GZMB 等在血液和肿瘤中的含量。综上所述，人参多糖联合 PD-1 能够通过重塑肠道微生物和色氨酸代谢，进而增强 CD1 T 细胞功能和降低 Tregs 的抑制作用来增强 PD-1 的抗肿瘤作用。

### 2.1.4 肠道菌与肺纤维化

肺纤维化 (PF) 是一种进行性、致命性和慢性疾病，其特征是肺部炎症浸润和肺实质纤维化。随着病情恶化，PF 患者逐渐失去肺功能，可能导致呼吸衰竭甚至死亡。Gao<sup>[22]</sup>等人利用博来霉素建立肺纤维化模型，利用 Qingwen Gupi decoction (QGT)对 PF 进行治疗，结果显示 QGT 能够通过减轻细胞外基质中的炎症反应、氧化应激、成纤维细胞过度增殖和胶原蛋白生成，缓解了低剂量大鼠模型中博来霉素诱导的 PF 的症状。菌群测序结果显示，QGT 增加了益生菌的丰度，包括：*Alistipes*，*Ruminiclostridium*，*Romboutsia*，*Ruminococcaceae\_UCG-136* 和 *Roseburia* 等，并减少了有害细菌的丰度，包括 *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group*，*Escherichia-Shigella*，



和 *Odoribacter* 等。综上所述，QGT 发挥治疗效果的途径是通过调节肠道微生物群和代谢途径来达到的。

### 2.1.5 肠道菌与呼吸窘迫综合征

急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是一种急性呼吸衰竭, 可由多种因素引起, 其特征是呼吸窘迫、肺泡和毛细血管膜损伤以及缺氧是最突出的表现<sup>[23]</sup>, 死亡率和发病率高<sup>[24]</sup>。这种疾病的主要病理特征是不控制的急性炎症。Hu<sup>[25]</sup>等人利用 *Staphylococcal enterotoxin B (SEB)* 建立 ARDS 模型, 利用黄芩对其治疗之后, 可显著降低 ARDS 小鼠对肺和结肠组织的病理损伤, 改善肺和肠道功能; 黄芩能够恢复血清和肺组织中细胞因子的正常水平。此外, 黄芩可以逆转 ARDS 小鼠中由 SEB 引起的肠道微生物群失调; 黄芩能够增加肠道中短链脂肪酸 (SCFAs) 的产生; SCFAs 的增加可能会增加 SCFAs 向肺部的迁移, 进而导致肺上皮细胞中游离脂肪酸受体 FFAR2 和 FFAR7 的活化, 从而缓解 ARDS 的症状。综上所述, 黄芩可以通过调节肠道微生物群的结构, 增加 SCFAs 的产生和通过“肺-肠轴”改变粪便代谢物谱来改善 SEB 诱导的 ARDS。

## 2.2 中药祛痰的研究进展

### 2.2.1 中药祛痰药效的临床和动物实验研究

具备祛痰作用的单味中药和复方有很多, 单味药材如: 川贝母、桔梗、甘草、紫菀、枇杷、兴安杜鹃、大叶紫金牛、萝卜以及半夏等; 祛痰复方如: 止鼾通窍汤、射干麻黄汤、定喘汤、清肺化痰汤、小青龙汤、桂龙咳喘宁胶囊、麻芍平喘汤、苓桂术甘汤合三拗汤、豁痰通络汤等。在中药祛痰作用的物质基础方面已有研究报道: 绿原酸 (3-O-caffeoylquinic acid)、异绿原酸 (3,4-di-O-caffeoylquinic acid)、3,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 (3,5-di-O-caffeoylquinic acid)、4,5-O-二咖啡酰基奎宁酸 (4,5-di-O-caffeoylquinic acid)<sup>[26]</sup>、去芹糖桔梗皂苷 D、chuanbeione、progesteron<sup>[27]</sup>、芹糖甘草苷、甘草苷、甘草素<sup>[28]</sup>、8-demethylfarrerol、farrerol 和 scopoletin 等具备祛痰作用<sup>[29]</sup>。

表 2.1 祛痰中药材的现代药理研究

NO.	研究对象 (中药)	药材属/种	药理作用	祛痰药效评价
1	川 贝 母 ( <i>Fritillaria cirrhosa</i> D. Don)	属于百合科, 贝母属	川贝母 (FRC) 具备止咳、祛痰、治疗哮喘、抗炎、抗氧化和抗癌的药理作用 <sup>[30]</sup>	利用酚红排泌法 <sup>[31]</sup> 评估 FRC 的祛痰作用, 结果显示, 增加小鼠气管内酚红排泌, FRC 具备祛痰作用。
2	桔 梗 ( <i>Platycodon grandiflorus</i> )	属于桔梗科, 桔梗属	桔梗 (PG) 常被用于治疗呼吸道疾病, 如咳嗽、痰多和喉咙痛 <sup>[32]</sup>	PG 能够增加小鼠气管内酚红排泌, PG 具备祛痰作用 <sup>[33]</sup> , 除此以外, 通过肠道菌群生物转化和谱效应关系分析, 成功鉴定了桔梗苷在 PG 中具有镇咳和祛痰作用的活性微生物代谢产物。
3	甘 草 ( <i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	属于甘草属, 甘草种、胀果甘草种、光果甘草种	甘草表现出多重药理活性如: 止咳、祛痰、抑菌、保护神经、抗肿瘤、降血糖降血脂以及抗抑郁等作用 <sup>[34]</sup>	毛细管排泌量 <sup>[35]</sup> 来评价甘草水提液的祛痰作用 甘草水提液可以显著增加毛细管排泌量, 发挥祛痰作用。
4	紫 菀 ( <i>Aster tataricus</i> L.f.)	属于菊科紫菀属	紫菀 (RA) 具有多重药理活性如: 抗炎、抗肿瘤、止咳、祛痰、平喘以及抗抑郁等作用 <sup>[36]</sup>	90%乙醇的 RA 提取物 <sup>[37]</sup> 显著增加了小鼠气管酚红的分泌, 能够发挥祛痰作用。
5	枇杷 ( <i>Eriobotrya japonica</i> (Thunb.) Lindl.)	属于杜鹃花科, 杜鹃花属	枇杷具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、解痉、镇咳、止吐和抗糖尿病等生理活性; 它还可以调节血液微循环 <sup>[38]</sup>	利用酚红排泌法证明了枇杷的水提物的祛痰作用 <sup>[38]</sup> , 其中黄酮含量较高的水提取物表现出较强的祛痰活性。

续表 2.1 祛痰中药材的现代药理研究

NO.	研究对象（中药）	药材属/种	药理作用	祛痰药效评价
6	兴安杜鹃（ <i>Rhododendron dauricum</i> L.）	属于杜鹃花科，杜鹃花属	兴安杜鹃(LRD)的叶子用作治疗哮喘，慢性支气管炎，高血压和咳嗽 <sup>[39]</sup>	LRD 总黄酮能够促进小鼠气管中的酚红排泌量，LRD 总黄酮具备祛痰作用 <sup>[39]</sup> 。
7	大叶紫金牛（ <i>Ardisia gigantifolia</i> Stapf）	属于紫金牛科，紫金牛属	大叶紫金牛具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗血栓、抗结核和咳嗽祛痰活性	高（20 g/kg）、中（10 g/kg）和低剂量（5 g/kg）的 <i>A. gigantifolia</i> 乙醇提取物能够增加小鼠气管中酚红的排泌量 <sup>[40]</sup> 。
8	半夏（ <i>Pinellia ternata</i> (Thunb.) Ten. ex Breitenb.）	属于天南星科半夏属	具有抗肿瘤、镇咳、祛痰的作用	利用毛细管法评价半夏的祛痰作用，结果显示，半夏能够增加痰液排出，具备祛痰作用 <sup>[41]</sup> 。

表 2.2 中药祛痰复方的现代药理研究

NO.	研究对象（中药复方）	复方构成	药理作用	祛痰药效评价
1	射干麻黄汤	大枣 4 枚、射干 10 g、五味子 2 g、麻黄 8 g、紫菀 5 g、生姜 10 g、款冬花 5 g、细辛 2 g、半夏 10 g	下气止咳、宣肺祛痰的功效	麻黄汤还使得恢复了 PCT、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8、HS-CRP 及 T 淋巴细胞等的正常 <sup>[42]</sup> 。
2	定喘汤	炙麻黄、桔梗、杏仁、白前、炙紫菀、苏子、炙百部、桑白皮、黄芩、象贝母、制半夏、橘红、炙地龙（5 g、5 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g、10 g）	具有抗炎、抗过敏、抗氧化损伤作用，又有解痉平喘、祛痰止咳作用，常用于慢性支气管炎、支气管哮喘的治疗中	病人经过加味定喘汤的治疗后明显缓解咳嗽、咳痰等症状 <sup>[43]</sup> 。
3	清肺化痰汤	薏苡仁、毛冬青、苇茎、瓜蒌、丹参、贝母、紫菀、紫苏子、甘草（20 g、20 g、15 g、15 g、15 g、15 g、15 g、10 g、5 g）	具有清热化痰，理气止咳的功效临床常用于治疗肺炎、急性支气管炎、慢性支气管炎急性发作等的患者	慢性阻塞性肺疾病的患者经过 2 周治疗后，病人咳嗽、痰多等症状得到缓解，并降低了病人的 IL-6、TNF- $\alpha$ 等炎症因子的水平 <sup>[44]</sup> 。
4	小青龙汤	炙麻黄、细辛、生姜、款冬花、紫菀、白芍、大枣、地龙、法半夏（6 g、3 g、6 g、12 g、12 g、9 g、3 g、10 g、9 g）	具有平喘、抗过敏、抗炎的作用。常用于支气管炎、支气管哮喘、慢性阻塞性肺气肿、肺炎、百日咳、肺心病、过敏性鼻炎等疾病的治疗	小青龙汤能够缓解病人呛咳、咽痛、咯痰及干咳等 <sup>[45]</sup> 。

续表 2.2 中药祛痰复方的现代药理研究

NO.	研究对象（中药 复方）	复方构成	药理作用	祛痰药效评价
5	桂龙咳喘宁胶囊	桂枝、瓜蒌皮、法半夏、牡蛎、黄连、苦杏仁、龙骨、牡蛎、黄连、白芍、黄连、生姜、大枣、炙甘草	具有止咳化痰，降气平喘的作用	肺纤维化患者 <sup>[46]</sup> 经过桂龙咳喘宁胶囊治疗 1 个月后改善了咳嗽、咯痰、哮鸣音等症状。
6	麻芍平喘汤	麻黄、细辛、五味子、钩藤、赤芍（10g、3g、9g、12g、7g）	具有宣降肺气，清热化痰的功效	麻芍平喘汤 <sup>[47]</sup> 显著改善了患者们的喘息、咯痰、咳嗽、四肢畏寒等临床症状，同时显著降低了血清中 IL-6、IL-8、IL-13、TNF- $\alpha$ 等炎症因子。
7	苓桂术甘汤合三拗汤	茯苓、桂枝、白术、炙甘草；三拗汤组成：麻黄、苦杏仁、生甘草，水煎时加入生姜 3 片。	大叶紫金牛具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗血栓、抗结核和咳嗽祛痰活性	该汤剂显著减少了豚鼠的咳嗽次数以及咳嗽潜伏期；显著增加了小鼠气管的酚红排泄量，能够发挥祛痰作用 <sup>[48]</sup> 。
8	豁痰通络汤	甘草、胆南星、炙麻黄、瓜蒌、杏仁、桃仁、白附子、郁金、薤白、石膏、磁石（3g、6g、6g、10g、10g、10g、10g、10g、10g、30g）	具有抗肿瘤、镇咳、祛痰的作用	给药 15 天后，该汤剂有效缓解了患者的痰壅、咳嗽、发热、气喘等症状 <sup>[49]</sup> 。

续表 2.2 中药祛痰复方的现代药理研究

NO.	研究对象（中药 复方）	复方构成	药理作用	祛痰药效评价
9	止鼾通窍汤	金银花、蒲公英、土茯苓、蜂房、鱼腥草、 败酱草、辛夷、藿香、砂仁、细辛、牡蛎、 昆布、山慈菇、荔枝核、浙贝母、炒僵蚕、 黄芩、菊花（21g、15g、15g、15g、18g、 15g、15g、15g、9g、3g、30g、15g、15g、 15g、15g、15g、12g、18g）	具有益肾健脾、化湿和胃、涤痰降 脂、宣通鼻窍、安神止鼾的功效	止鼾通窍汤对腺样体肥大(湿热痰凝 型)的患儿进行治疗，该汤剂起到化痰 通窍、清热消肿的效果，改善了患儿 的脏腑功能 <sup>[50]</sup> 。

### 2.2.2 中药祛痰作用机制的研究进展

目前国内外的研究人员对中药祛痰作用的研究多集中在药物药效上，现在尚缺乏对中药祛痰作用机制方面的研究。利用“中国知网”、“Pubmed”、“万方”等数据库进行检索，检索到了少量关于祛痰作用机制的研究，本文将其汇总如下。

宋小兰<sup>[51]</sup>等人利用网络药理学对紫斑罂粟壳挥发油的祛痰机制进行探讨分析，其研究富集到了“pathways in cancer”、“proteoglycans in cancer”、“EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance”、“neuroactive ligand-receptor interaction”、“chemical carcinogenesis-receptor activation”、“endocrine resistance”、“PI3K-Akt signaling pathway”、“rap1 signaling pathway”等通路，上述通路可能是紫斑罂粟壳挥发油发挥祛痰药效的关键通路。除此以外，AKT1、EGFR、MAPK1、SRC 和 TNF 等可能是其发挥祛痰作用的关键靶点。

钟渊涵<sup>[52]</sup>等人利用代谢组学技术来分析去芹糖桔梗皂苷 D 的祛痰作用机制，对小鼠肺组织进行分析后发现了 38 个与祛痰作用相关的化合物，如：fumaric acid、linoleic acid、uric acid、aspartic acid、citric acid。除此以外，通路富集分析显示（ $\text{impact} > 0.1$  或  $P < 0.05$ ），arachidonic acid metabolism、glycerophospholipid metabolism、biosynthesis of unsaturated fatty acid、linoleic acid metabolism、purine metabolism、taurine and hypotaurine metabolism，上述通路可能是去芹糖桔梗皂苷 D 的发挥祛痰作用的关键通路。

## 第三章 基于肠道菌群紊乱的款冬花祛痰机制研究

### 3.1 引言

目前利用混合抗生素紊乱肠道菌的技术已经广泛的应用于中药与肠道代谢相关性的研究中，例如，张晨阳<sup>[53]</sup>利用混合抗生素紊乱小鼠肠道菌群稳态，进而分析藿香正气散与肠道菌群的联系；范建新<sup>[4]</sup>利用混合抗生素紊乱小鼠肠道稳态，进而研究肠道菌群与款冬花止咳药效的相关性；童庆<sup>[54]</sup>利用抗生素紊乱肠道菌和粪菌移植技术来分析二氢杨梅素对肥胖及胰岛素抵抗的治疗作用机制。

课题组前期研究发现款冬花止咳药效的发挥依赖肠道菌群，但是目前尚未有款冬花祛痰作用依赖肠道菌群的相关的报道。因此，本研究利用混合抗生素干扰小鼠的肠道菌群，然后观察款冬花祛痰作用的变化。

### 3.2 实验材料及仪器

#### 3.2.1 材料

款冬花从山西国新晋药集团有限公司购买，经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为菊科植物款冬的干燥花蕾，标本（No. KD-155）保存于山西大学恒温冷藏药材库中。

#### 3.2.2 动物

动物实验经山西大学科学研究伦理委员会批准（SXULL2019014），实验操作严格按照山西大学动物实验伦理和使用指南进行。

32 只 ICR 小鼠，分为 4 组，一组 8 只，雌雄各半，体重（ $18 \pm 2$  g），由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物许可证号为 SCXK（京）2016-0006。动物 24 h 自然昼夜节律光照，温度（ $20 - 25^{\circ}\text{C}$ ），湿度（ $45 \pm 5\%$ ），小鼠自由进食进水适应一周后进行后续实验<sup>[1]</sup>。

#### 3.2.3 仪器与试剂

本实验所用的仪器和试剂详细信息见表 3.1

表 3.1 仪器和试剂列表



仪器试剂	厂家
氨苄西林	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
万古霉素	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
新霉素	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
甲硝唑	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
浓氨水	天津大茂化学试剂有限公司
生理盐水	天津大茂化学试剂有限公司
Milli-Q 纯水制备系统	美国 Millipore 公司
无菌 PBS 缓冲液	山西赛奥生物技术有限公司
氯化铵	北京索莱宝科技有限公司
酚红	生工生物工程（上海）股份有限公司
质谱级乙腈	美国 Thermo Fisher 公司
质谱级甲酸	美国 Thermo Fisher 公司
旋转蒸发器 RE-52A	上海亚荣生化仪器厂
TGL-16 高速台式冷冻离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
漩涡混合器 XW-80A	上海精科实业有限公司
紫外可见分光光度计	上海美谱达仪器有限公司
离心浓缩仪	德国 Eppendorf 公司
KQ-300E 型超声波清洗仪	昆山超声仪器有限公司
TGL-16 高速台式冷冻离心机	湖南湘仪离心机仪器有限公司
Exion LC™ AD 超高效液相色谱串联 Triple TOF 5600+质谱	上海爱博才思公司
冷冻干燥机	上海知信实验仪器技术有限公司
BSA124S 分析天平	德国 Sartorius 公司

### 3.3 实验方法

#### 3.3.1 款冬花水提液和混合抗生素制备

##### 3.3.1.1 款冬花提取液制备

称取 100 g 重量的款冬花药材，按照生药：蒸馏水=1：10 的比例，加入 1 L 蒸馏水回流提取三次，每次 2 h。最后将提取液合并，利用真空旋转蒸发器减压浓缩至 5 g/mL 的浓度，即为款冬花药液。

### 3.3.1.2 混合抗生素制备

混合抗生素中各类抗生素的浓度如下：氨苄西林 1 g/L、万古霉素 0.5 g/L、新霉素 0.5 g/L、甲硝唑 1 g/L。即分别称取氨苄西林（500 mg）、万古霉素（250 mg）、新霉素（250 mg）、甲硝唑（500 mg），利用灭菌的生理盐水溶解上述抗生素，将配置好的混合抗生素置于 4°C 储存备用。

### 3.3.2 肠道菌群紊乱实验

#### 3.3.2.1 动物分组及给药

将小鼠随机分为 4 组，每组 8 只，雌雄各半，空白对照组（CON 组，）灌胃生理盐水；阳性药组（POS 组，1g/kg）灌胃氯化铵；款冬组（FF 组，5 g/kg）灌胃款冬花水提液；抗生素干扰款冬花组（ABFF 组，抗生素预处理+款冬花）：抗生素干扰款冬花组小鼠先经过混合抗生素预处理一周，然后再按照 5 g/kg 的剂量灌胃款冬花水提液。给药过程和试验周期如图 3.1 所示，从第 1 天到第 7 天，按照一天 2 次，每次以 0.2 ml 的剂量将混合抗生素灌胃给 ABFF 组小鼠，连续给药 7 天；对同时期的 CON 组、FF 组以及 POS 组小鼠灌胃生理盐水。从第 8 到第 21 天，FF 组小鼠进行款冬花灌胃处理；CON 组小鼠进行灌胃生理盐水处理，POS 组小鼠进行灌胃氯化铵处理，抗生素干扰款冬花组进行灌胃款冬花水提液处理。所有小鼠按照 0.1 ml/10 g 的灌胃体积进行一天一次的灌胃给药，连续给药 2 周。

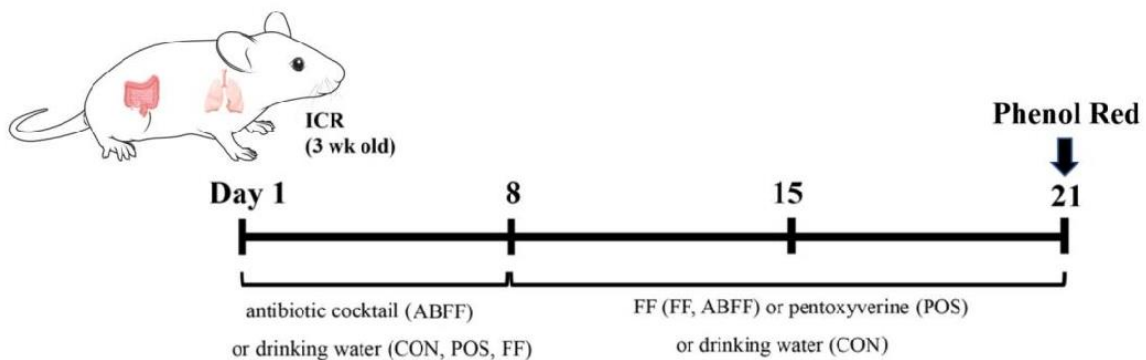


图 3.1 基于肠道菌群紊乱的款冬花祛痰实验过程示意图

#### 3.3.2.2 小鼠酚红排泌实验

第 20 天小鼠禁食不禁水 12 h，末次给药 0.5 h 后腹腔注射 5% 的酚红溶液（250 mg/kg），腹腔注射酚红 0.5 h 后利用摘眼球取血法处死；剪开小鼠颈部皮肤，分离小鼠气管周围组织，将气管自甲状软骨至气管分叉处剪下，将气管放入盛有 1.4 ml 5% 碳酸氢钠的离心管中。超声处理 20 min 后，在 1,500 rpm 下离心 10 min，紫外分光

光度计在 548 nm 在检测吸光度，利用酚红标准曲线计算酚红的质量，酚红标准曲线： $y = 0.1758x + 0.0361$ ， $R^2 = 0.9992$ 。

### 3.3.3 基于 LC-MS 的肠道代谢组学研究

#### 3.3.3.1 粪便样品收集

在第 20 天灌胃 4 h 后，收集小鼠粪便，将收集的小鼠粪便样品保存于-80℃冰箱，用于非靶向粪便代谢组学分析。

#### 3.3.3.2 粪便样品前处理

样品与提取溶剂间的比例为样品/溶剂值=1/100；不同提取溶剂间的比例为：甲基叔丁基醚/80%的甲醇/水溶剂体系（4.5: 1: 2.5）。提取步骤如下：首先，向样品中加入 80%冰冷的甲醇，涡旋 30s。之后加入 4.5 倍甲醇体积的二甲基叔丁基醚。样品通过涡旋混合，并通过超声波处理提取 20 分钟。接下来，加入 2.5 倍甲醇体积的超纯水，4℃孵育 10 分钟，然后以 5,000 rpm/min 离心 15 分钟。将水相转移到 2 ml eppendorf管或玻璃管中，然后使用 speedvac 真空浓缩器(Eppendorf, 德国)和氮气吹扫蒸发器干燥。

样品复溶：利用 150  $\mu$ L 80%甲醇复溶样品，将复溶好的样品转移至 1.5 ml 的离心管中，在 4℃下 12,000 rpm 离心 10 min，取上清液供 UHPLC Q-TOF MS 进样分析。

#### 3.3.3.3 液相条件

样品的色谱分离采用 Waters Acquity UHPLC HSS T3 色谱柱（2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.8  $\mu$ m），柱温为 40 °C，进样量为 5  $\mu$ L。将 0.1%甲酸水溶液（A），ACN（B）作为极性提取物的流动相，流动相的流速设置为 0.3 mL/min。液相梯度条件：0-5min, 2% B; 5-5.5 min, 2-15% B; 5.5-10 min, 15% B; 10-25 min, 15-60% B; 25-29 min, 60% B; 29-30 min, 60-95% B; 30-34 min, 95% B; 34-34.5 min, 95-2% B; 34.5-38 min, 2% B。

#### 3.3.3.4 质谱条件

采用电喷雾电离（ESI）离子源，正负离子模式分别扫描，离子化电压为-4,500 V（负离子）、5,500 V（正离子），离子源温度为 550 °C，喷雾气（Gas 1）55 psi，辅助加热气（Gas 2）55 psi，气帘气（CUR）30 psi，去簇电压（DP）60 V。采用 TOF MS-IDA-MS/MS 扫描模式，一个 MS 循环包含一个 TOF MS 扫描（累积时间 0.25 s）和至多 10 个子离子扫描（累积时间 0.09 s）。信息关联采集（IDA）触发条

件为：强度阈值 100 cps，开启动态背景扣除（DBS）。一级质谱（TOF MS）扫描范围为  $m/z$  100-1,500，子离子扫描范围为  $m/z$  50-1,250，二级碰撞能量（CE）为 35 eV，碰撞能量滚动区间（CEs）15 eV。

每个样本取 10  $\mu$ l 混合为一个质控（QC）样本，采用不同的 CE（15、30、45 eV）采集，以获取更多的二级质谱信息，用于代谢物鉴定。

### 3.3.3 统计学分析

实验数据以平均值 $\pm$ 标准误差（Means  $\pm$  SEM）表示。使用 SPSS 16.0 和 GraphPad Prism 8 进行统计分析和图表绘制，采用单因素方差分析和 t 检验进行差异比较。 $P < 0.05$  表明具有显著性差异。

## 3.4 实验结果

### 3.4.1 款冬花祛痰药效实验

#### 3.4.1.1 药效学结果

气管酚红排泄试验是研究药物对气管支气管分泌作用的一种简单有效的方法。为了评估 FF 促进气管祛痰的作用，在腹腔注射酚红溶液后检测酚红排出量。酚红质量多表示气管与液体排泌多，气管排泌的液体可以降低痰液的粘稠程度，有利于痰液的排出。如图 3.2 所示，与 CON 组相比较，FF 组与 POS 组均可以增加小鼠的酚红排泌（ $\mu$ g）。

为了确定款冬花的祛痰作用是否依赖于肠道菌群，本研究利用抗生素紊乱小鼠肠道菌群，小鼠接受抗生素预处理后再灌胃款冬花水提液，然后进行祛痰实验。结果表明，ABFF 组与 CON 组酚红排出量无显著性差异（ns），该结果表明当使用抗生素造成肠道菌群紊乱后，款冬花的祛痰作用显著降低，说明款冬花的祛痰作用依赖于肠道菌群。

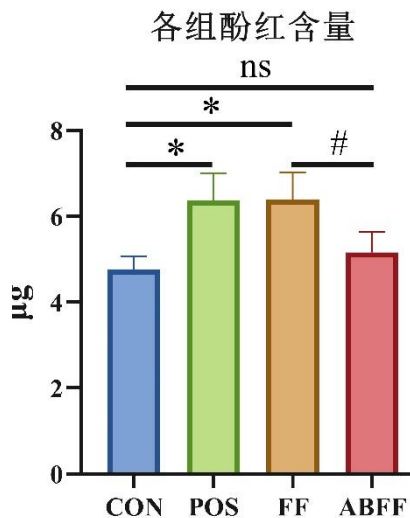


图 3.2 各组小鼠酚红质量，与空白组相比 (\* $P < 0.05$ )；与 FF 组相比 (# $P < 0.05$ )。

### 3.4.2 肠道代谢组学分析

肠道菌群紊乱后，肠道代谢物也发生改变。因此，进一步对各组小鼠粪便进行肠道代谢组学分析。对原始的质谱数据进行峰表提取，获得峰表后导入 SIMCA-P 软件进行 PCA 分析。如图 3.3 (B/D) 所示，QC 样品的标准偏差均在 2 倍 ( $\pm$  SD) 之内，表明分析方法稳定性良好，适合于代谢组学分析。PCA 分析结果如图 3.3 所示，CON 组、FF 组和 ABFF 组间能够明显的区分开，该结果说明 FF 灌胃给药后改变了小鼠的肠道代谢。

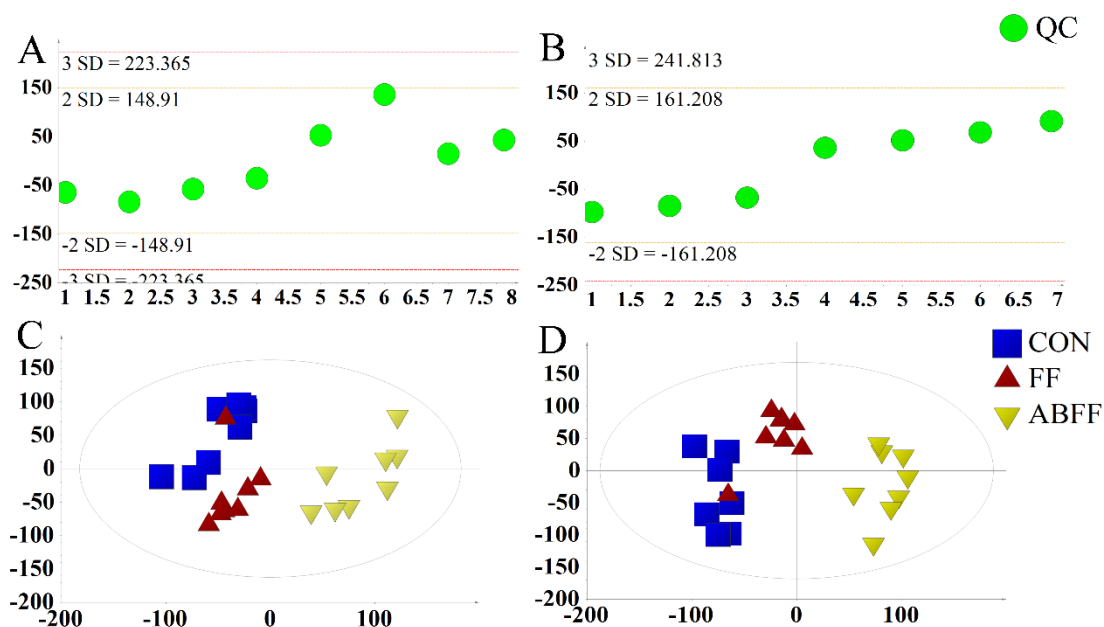


图 3.3 不同模式下 QC 样本分布图：正离子模式 (A)，负离子模式 (B)；正负模式下 PCA 得分图：正离子模式 (C)，负离子模式 (D)

根据  $P < 0.05$ 、FC (Fold change)  $\geq 1.2$  or  $\leq 0.8$  的标准筛选 CON 和 FF 两组间的差异代谢物。FF 组与 CON 组的差异代谢物共筛选出 28 个差异化合物，化合物信息如表 3.2 所示。与 CON 组相比，在 FF 处理后，分别有 16 种和 12 种代谢物显著下调和上调。除此以外，抗生素预处理逆转了其中的 20 个化合物(13 个下调，7 个上调)。因此，被抗生素逆向调节的这 20 个化合物与 FF 发挥祛痰作用密切相关。

### 3.4.2.3 通路富集分析

为了分析 FF 处理调节的相关代谢途径，通过 MetaboAnalyst 网站进一步进行 KEGG 途径分析。28 差异代谢物涉及 10 条显著被影响的代谢途径( $P < 0.05$ ，表 3.3，图 3.4)，排在前五位的代谢通路分别为：精氨酸生物合成、氨酰 tRNA 生物合成、组氨酸代谢和泛酸及辅酶 A 生物合成。



图 3.4 差异化合物的富集分析

表 3.2 CON 和 FF 组间差异代谢物的信息 (n=8), \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 

No.	M/Z	Rt (min)	Compound name	Molecular formula	Adduct	MS2	FF/ CON	ABFF/FF
1	173.1063	0.84	Arginine	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	173.1063,156.0799,131.0836	0.39 ↓*	1.93 ↑*
2	147.1121	0.86	Lysine	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	130.0885,84.0816	0.63 ↓*	1.21 ↑
3	154.0636	0.90	Histidine	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	154.0636,137.0364,110.0740,93.0464,81.0478	0.38 ↓*	1.64 ↑*
4	132.0303	0.93	Aspartic acid	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	132.0303,115.0040,88.0407,71.0125	0.42 ↓*	1.53 ↑*
5	146.0459	0.94	Glutamic acid	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	146.0459,128.0349,102.0554	0.46 ↓*	1.57 ↑*
6	176.1029	0.95	Citrulline	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	176.1029,131.0798,129.9965,101.9946,84.0205	1.77 ↑*	0.46 ↓*
7	180.0686	1.08	Tyrosine	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	180.0686,163.0419,119.0479	0.60 ↓*	1.31 ↑
8	113.0339	1.52	Uracil	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	113.0339,96.0090	1.56 ↑*	0.61 ↓*
9	167.0219	1.60	Uric acid	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	167.0219,124.0154,96.0215	0.42 ↓*	1.19 ↑
10	133.0972	2.38	Ornithine	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	133.0972, 115.0309, 97.1126, 88.0642, 70.0539	0.33 ↓***	3.33 ↑**
11	130.0872	2.41	Alloisoleucine	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	130.0872,113.0611,112.0736,84.0833	0.52 ↓*	1.06 ↑
12	220.118	7.04	Pantothenic acid	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	220.1180,202.1070,184.0967,116.0346,90.0553	2.25 ↑*	1.05 ↑
13	474.1771	7.23	5-formyltetrahydrofolate	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	474.1771,345.1310,327.1185	2.50 ↑*	46.82 ↑*

续表 3.2 CON 和 FF 组间差异代谢物的信息 (n=8), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

No.	M/Z	Rt (min)	Compound name	Molecular formula	Adduct	MS2	FF/ CON	ABFF/FF
14	261.1401	7.30	Glu-Leu	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	261.1401,244.1175,243.1286,198.1111,13 2.1024	2.12 ↑*	0.28 ↓*
15	181.0508	7.44	Hydroxyphenyllactic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	181.0508,163.0404,135.0452,119.0499	13.08 ↑*	0.99 ↓
16	223.1073	7.63	Phenylalanylglycine	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	166.0857,149.0599,120.0805	0.66 ↓*	1.16 ↑
17	190.0558	8.14	Kynurenate	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	190.0558,162.0536,144.0434,116.0492,89 .0391	1.58 ↑*	0.69 ↓*
18	151.0414	8.54	4-Hydroxy-3-methylbenzoic acid	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	151.0414,107.0507	0.53 ↓*	0.98 ↓
19	131.0717	9.13	2-Hydroxyisocaproic acid	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	131.0717,113.0599,85.0670	10.03 ↑*	3.12 ↑*
20	165.0556	11.18	3-Phenyllactic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	165.0556,147.0460,119.0511,103.0549,72 .9957	4.97 ↑*	0.97 ↓
21	165.0568	11.79	3-(3-Hydroxyphenyl)propanoic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	165.0568,121.0659,119.0508	2.86 ↑*	0.85 ↓
22	352.1766	14.13	Tryptophyl-Phenylalanine	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	335.1419,159.0906,120.0821	0.54 ↓*	1.11 ↑



续表 3.2 CON 和 FF 组间差异代谢物的信息 (n=8), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

No.	M/Z	Rt (min)	Compound name	Formula	Adduct	MS2	FF/ CON	ABFF/FF
23	311.2202	19.10	(9Z,12Z,15Z)-(7S,8S)- Dihydroxyoctadeca- 9,12,15-trienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	311.2202,293.2111,275.2009,257.1891,24 7.2038,229.1933,195.1381,167.1081,159. 1172,121.1004	0.43 ↓*	1.71 ↑*
24	229.1447	19.86	Dodecanedioic acid 15,16-	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	229.1447,211.1344,167.1440	0.40 ↓*	0.01 ↓*
25	315.2576	22.79	Dihydroxyoctadecanoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	315.2576,297.2459,279.2353,269.2512	0.25 ↓*	1.34 ↑
26	285.2106	26.14	Hexadecanedioic acid	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	285.2106,267.2018,223.2073	0.31 ↓*	0.8 ↓
27	524.3671	31.11	1-Stearoyl-sn-Glycerol- 3-Phosphocholine	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> NO <sub>7</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	524.3671,506.3554,184.0737,104.1082	2.91 ↑*	0.78 ↓
28	324.2897	31.17	Linolenoyl ethanolamine	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	324.2897,306.3163,263.2371,245.2271,16 1.1321	1.99 ↑*	0.63 ↓*

表 3.3 通路富集分析 Top10

Pathway	Total	Expected	Hits	Raw p	Compounds
Arginine biosynthesis	14	0.128	5	5.42E-08	L-Glutamic acid; L-Arginine; Citrulline; L-Aspartic acid; Ornithine
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	48	0.438	6	5.42E-07	L-Histidine; L-Aspartic acid; L-Arginine; L-Lysine; L-Tyrosine; L-Glutamic acid
Pantothenate and CoA biosynthesis	19	0.173	3	0.000537	Pantothenic acid; L-Aspartic acid; Uracil;
beta-Alanine metabolism	21	0.191	3	0.000729	L-Aspartic acid; Uracil; L-Histidine
Arginine and proline metabolism	38	0.346	3	0.00422	L-Arginine; L-Glutamic acid; Ornithine
Alanine, aspartate and glutamate metabolism	28	0.255	2	0.0255	L-Aspartic acid; L-Glutamic acid
Glutathione metabolism	28	0.255	2	0.0255	L-Glutamic acid; Ornithine
Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	4	0.0365	1	0.036	L-Tyrosine

### 3.5 本章小结

本章节利用抗生素建立了菌群紊乱模型，将款冬花水提液灌胃给抗生素预处理的小鼠，结果显示，肠道菌被抗生素清除之后款冬花的药效减弱，该实验证明了款冬花祛痰药效依赖于肠道菌群；利用 LC-MS 发现了 28 个可能参与到祛痰药效中的差异代谢物；代谢物的富集分析显示 FF 能够显著影响精氨酸生物合成、氨酰 tRNA 生物合成、组氨酸代谢和泛酸及辅酶 A 生物合成等通路，因此这些通路是 FF 发挥祛痰作用的重要机制。

## 第四章 基于粪菌移植实验的款冬花祛痰机制研究

### 4.1 引言

粪菌移植 (Fecal microbiota transplantation, FMT) 是一种调节肠道微生物以及肠道代谢的技术, 即将功能性微生物群从供体的粪便中转移到菌群紊乱的受体胃肠道中, 以期在受体胃肠道中重塑肠道菌群, 并恢复受体肠道代谢功能<sup>[55]</sup>。目前该技术已被广泛应用于中药对“肺-肠”轴作用的研究中, 如人参、栀子、当归和黄芪等, 可通过调节肺-肠黏膜免疫功能改善 LPS 诱导的急性肺组织损伤和病理性结肠组织损伤<sup>[56][57]</sup>。

“第三章”的结果显示, 款冬花灌胃给抗生素预处理的小鼠后不能发挥祛痰作用, 该结果证明款冬花的祛痰作用依赖肠道菌群。为了进一步研究款冬花祛痰作用与肠道菌群的相关性, 本章节利用粪菌移植实验来验证款冬花与菌群的联系。

### 4.2 实验材料及仪器

#### 4.2.1 材料

同“3.2.1”。

#### 4.2.2 仪器与试剂

表 4.1 实验试剂和仪器

试剂名称	公司
无菌 PBS 缓冲液	山西赛奥生物技术有限公司
生理盐水	天津大茂化学试剂有限公司
生化培养箱	上海一恒科学仪器有限公司
96 孔板	无锡耐思生命科技股份有限公司
压力蒸汽灭菌器	SHINVA Medical Instrument
肉汤培养基	北京索莱宝科技有限公司
酶标仪	Tecan Austria GmbH
组织研磨仪	宁波洛尚智能科技有限公司

## 4.3 实验方法

### 4.3.1 粪菌移植实验

#### 4.3.1.1 混合抗生素的制备

混合抗生素的制备方法同“3.3.1.2”所述。

#### 4.3.1.2 动物分组和给药

ICR 小鼠适应一周后，小鼠随机分为 6 组，包括供体组 2 组，受体 4 组，每组 8 只，雌雄各半。供体组包括空白组和款冬花组（款冬花，5 g/kg，0.1 ml/10 g）。空白组灌胃生理盐水，款冬花组灌胃款冬花，每天 1 次，连续灌胃 14 天。受体组小鼠在进行粪菌移植实验之前采用混合抗生素处理一周（2 次/天，0.2 ml），再给予对应的粪菌移植液或者生理盐水，每只小鼠按照 0.1 ml/10 g 的灌胃体积灌胃不同的粪菌移植液或者生理盐水，每天灌胃一次，连续灌胃 2 周。具体实验分组如下：

空白组（CON）：灌胃生理盐水；

款冬花组（FF）：灌胃款冬花水提液；

抗生素干扰组（AB）：混合抗生素预处理一周后，灌胃生理盐水；

空白对照粪菌移植组（CFMT）：灌胃空白组小鼠粪菌移植液；

款冬花活菌移植组（FFMT）：灌胃富含菌群的款冬花粪菌移植液；

款冬花热灭菌移植组（HFMT）：灌胃高压灭菌处理后的款冬花粪菌移植液，高压蒸汽灭菌锅参数设置为 0.1 MPa，121℃（20 min）。

#### 4.3.2 制备粪菌移植液

供体鼠分别灌胃生理盐水和款冬花，连续灌胃 2 周，从灌胃第 8 天开始收集供体小鼠粪便，每天下午收集供体小鼠新鲜粪便分别置于无菌离心管中，保存于-80℃冰箱。采用无菌 PBS 分别混悬空白组和款冬花组小鼠粪便（100 mg/mL），1,500 rpm 离心 3 min 取上清液。

高压灭菌移植液制备：将菌液进行高温高压灭菌处理；

#### 4.3.3 粪菌移植受体小鼠的肠道代谢组分析

粪便样品的收集、预处理，液相条件，质谱条件同“3.3.3”所述。

#### 4.3.4 统计学分析

实验数据以平均值±标准误差（Means ± SEM）表示。使用 SPSS 16.0 和

GraphPad Prism 8 进行统计分析和图表绘制，采用单因素方差分析和 t 检验进行差异比较。 $P < 0.05$  表明具有显著差异。

## 4.4 实验结果

### 4.4.1 粪菌移植祛痰效果分析

为了进一步验证 FF 的祛痰作用是否依赖于微生物群，将健康对照小鼠和 FF 预处理小鼠排出的粪便制备为粪菌移植液，然后对抗生素预处理的受体小鼠分别灌胃空白鼠粪菌移植液、款冬花活菌移植液以及款冬花热灭菌移植液。粪菌移植祛痰实验结果见图 4.1，款冬花粪菌移植液能显著促进气管酚红排出量( $P < 0.05$ )，因此，FF 的祛痰作用可以通过粪菌移植转移，这进一步证实了 FF 的祛痰作用是依赖于肠道微生物群的。

与空白移植液相比，抗生素干扰组不能够增加酚红分泌，不具备祛痰作用；热灭活的粪菌移植液能促进小鼠气管酚红的分泌，发挥祛痰作用( $P < 0.05$ )，但热灭活的粪菌移植液的祛痰效果弱于款冬花移植液的效果。结果表明，菌群被灭活后，热灭菌移植液较款冬花移植液的祛痰作用减弱了，该结果证明菌群在是祛痰作用中发挥重要作用；但是由于热灭菌的移植液依然能够发挥祛痰作用，所以该结果提示我们在热灭菌的移植液中存在与祛痰作用相关的物质。

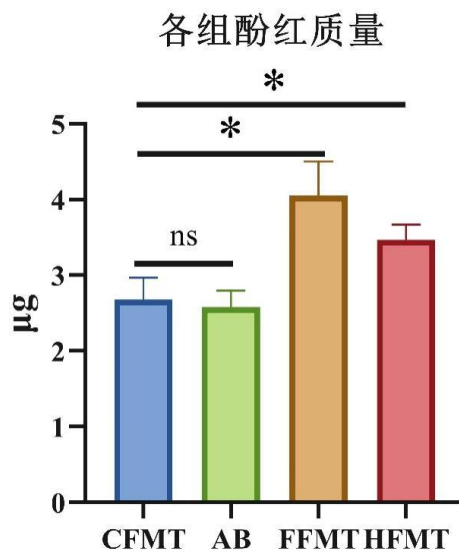


图 4.1 各组小鼠酚红质量图，与空白组相比 (\* $P < 0.05$ )。

## 4.4.2 肠道代谢组学分析

经过粪菌移植液灌胃处理后，肠道代谢物也发生改变。因此，进一步对各组受体小鼠粪便进行肠道代谢组学分析。对原始的质谱数据进行峰表提取，获得峰表后导入 SIMCA-P 软件进行 PCA 分析。如图 4.2 (A/B) 所示，QC 样品的标准偏差均在 2 倍 ( $\pm$  SD) 之内，表明分析方法稳定性良好，适合于代谢组学分析。PCA 分析结果如图 4.2 (C/D) 所示，CFMT 组和 FFMT 组间能够明显的区分开，该结果说明 FFMT 灌胃给药后改变了小鼠的肠道代谢。

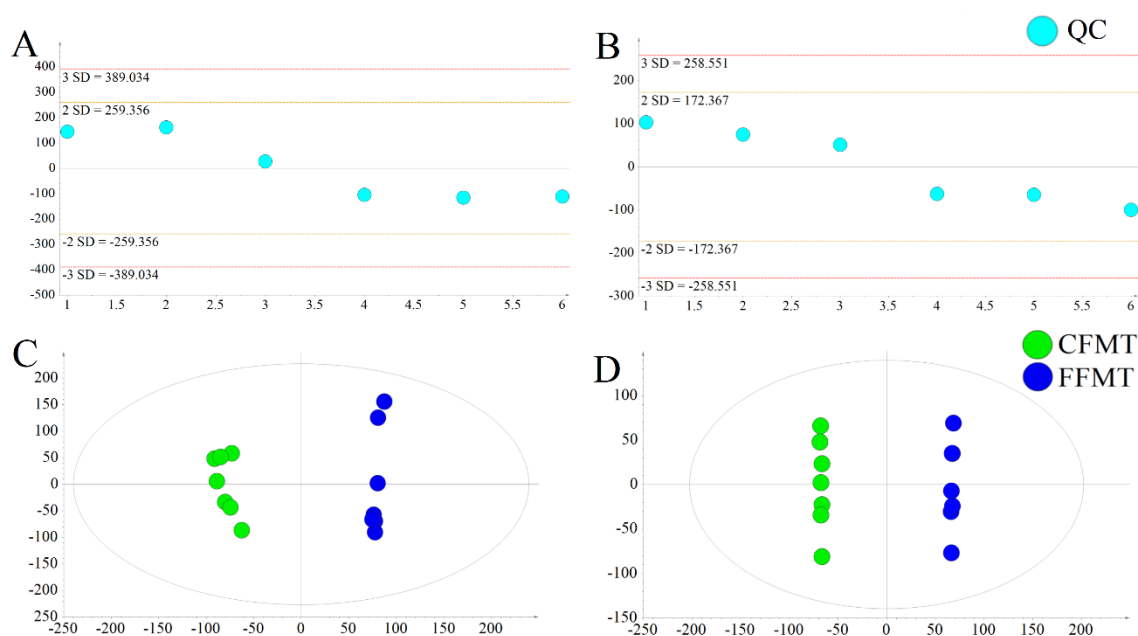


图 4.2 不同模式下 QC 样本分布图：正离子模式 (A)，负离子模式 (B)；正负模式下 PCA 得分图：正离子模式 (C)，负离子模式 (D)

在结果“4.4.1”中两种款冬花粪菌移植液均能够增加小鼠的气管酚红排泄量。进一步根据 LC-MS 技术来分析空白移植组和款冬花移植组间的差异代谢物。基于  $FC \geq 1.2$  or  $\leq 0.8$  的标准筛选出 56 个差异代谢物。对这 56 个受款冬花粪菌移植液调节的肠道化合物以及 28 个受款冬花调节的肠道代谢物进行 Venn 图分析，结果如图 4.3 所示，有 16 个化合物为二者的交集化合物，因此该 16 个交集化合物是款冬花祛痰作用的关键化合物 (表 4.2)，包括：arginine、aspartic acid、glutamic acid、histidine、uric acid、hydroxyphenyllactic acid、hexadecanedioic acid、15,16-dihydroxyoctadecanoic acid、uracil、kynurenate、glu-leu、(9Z,12Z,15Z)-(7S,8S)-dihydroxyoctadeca-9,12,15-trienoic acid、linoleoyl ethanolamide、5-

formyltetrahydrofolate、ornithine、citrulline。上述结果表明款冬花粪菌移植液处理改变了受体小鼠的肠道代谢物，同时，这些肠道代谢物的变化趋势整体与款冬花调节的趋势一致。

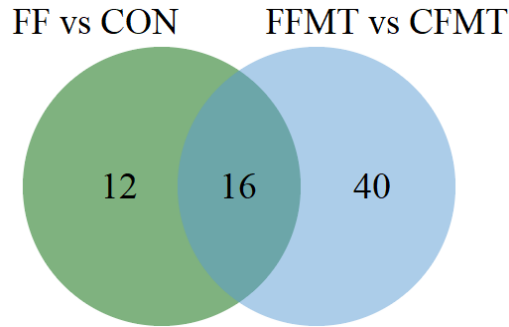


图 4.3 关于 FF vs CON 和 FFMT vs CFMT 的 Venn 图分析

#### 4.4.2.3 差异代谢物的通路富集分析

为了进一步分析上述 16 个关键差异化合物发挥祛痰作用涉及到的代谢通路，本章节同样利用 MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 网站对上述的 16 个粪菌移植差异代谢物进行通路富集分析。结果如图 4.4 所示，16 个化合物涉及到了 11 条显著相关的代谢通路 ( $P < 0.05$ )，精氨酸的生物合成排在第一位。

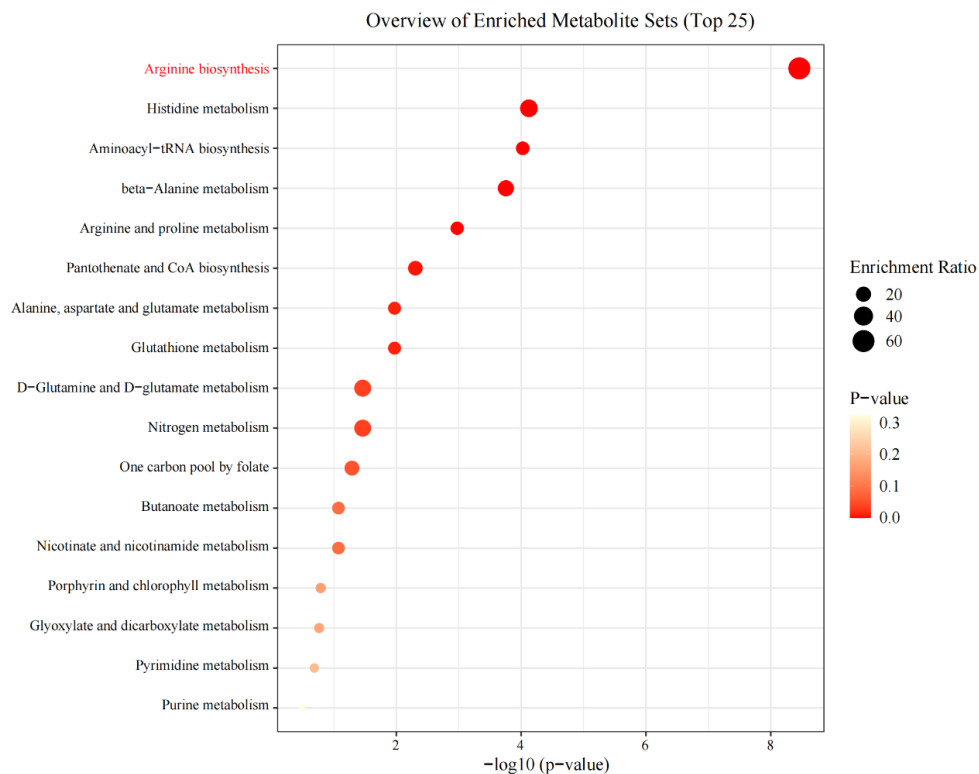


图 4.4 粪菌移植实验代谢物的通路富集分析



表 4.2 粪菌移植差异代谢物具体信息 (n=8), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 

No.	M/Z	Rt/ (min)	Compound name	Formula	Adduct	MS2	FF/CO N	ABFF/ FF	FFMT /CFM T	HFMT/ CFMT
1	173.1063	0.84	Arginine	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	173.1063,156.0799,131.0836	0.39 ↓*	1.93 ↑*	0.08 ↓*	0.07 ↓*
2	154.0636	0.90	Histidine	C <sub>6</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	154.0636,137.0364,110.0740,93.0464,81.0478	0.38 ↓*	1.64 ↑*	0.10 ↓*	0.22 ↓*
3	132.0303	0.93	Aspartic acid	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	132.0303,115.0040,88.0407,71.0125	0.42 ↓*	1.53 ↑*	0.35 ↓*	0.68 ↓
4	146.0459	0.94	Glutamic acid	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	146.0459,128.0349,102.0554	0.46 ↓*	1.57 ↑*	0.03 ↓*	0.05 ↓*
5	176.1029	0.95	Citrulline	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	176.1029,131.0798,129.9965,101.9946,84.0205	1.77 ↑*	0.46 ↓*	2.27 ↑*	2.06 ↑**
6	113.0339	1.52	Uracil	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	113.0339,96.0090	1.56 ↑*	0.61 ↓*	3.07 ↑*	2.24 ↑*
7	167.0219	1.60	Uric acid	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	167.0219,124.0154,96.0215	0.42 ↓*	1.19 ↑	0.43 ↓*	0.72 ↓
8	133.0972	2.38	Ornithine	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	133.0972, 115.0309, 97.1126, 88.0642, 70.0539	0.33 ↓***	3.33 ↑**	0.40 ↓*	0.41 ↓
9	474.1771	7.23	5-formyltetrahydrofolate	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	474.1771,345.1310,327.1185	2.50 ↑*	46.82 ↑*	1.67 ↑*	3.44 ↑*
10	261.1401	7.3	Glu-Leu	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	261.1401,244.1175,243.1286,198.1111,132.1024	2.12 ↑*	0.28 ↓*	2.00 ↑*	1.30 ↑

续表 4.2 粪菌移植差异代谢物具体信息 (n=8), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$

No.	M/Z	Rt/ (min)	Compound name	Formula	Adduct	MS2	FF/CO N	ABFF/ FF	FFMT /CFM T	HFMT/ CFMT
11	181.0508	7.44	Hydroxyphenyllactic acid	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	181.0508,163.0404,135.04 52,119.0499	13.08 ↑*	0.99 ↓	3.1 ↑*	4.33 ↑*
12	190.0558	8.14	Kynurenate	C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	190.0558,162.0536,144.04 34,116.0492,89.0391	1.58 ↑*	0.69 ↓*	2.50 ↑*	4.24 ↑*
13	311.2202	19.10	(9Z,12Z,15Z)-(7S,8S)- Dihydroxyoctadeca- 9,12,15-trienoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	311.2202,293.2111,275.20 09,265.2182,257.1891,247 .2038,229.1933,223.1673, 195.1381,177.1259,167.10 81,159.1172,153.0914,121 .1004	0.43 ↓*	1.71 ↑*	0.09 ↓*	0.08 ↓*
145	315.2576	22.79	15,16- Dihydroxyoctadecanoic acid	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	315.2576,297.2459,279.23 53,269.2512	0.25 ↓*	1.34 ↑	0.38 ↓*	0.51 ↓*
15	285.2106	26.14	Hexadecanedioic acid	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	285.2106,267.2018,223.20 73	0.31 ↓*	0.8 ↓	0.10 ↓*	0.76 ↓
16	324.2897	31.17	Linolenoyl ethanolamine	C <sub>20</sub> H <sub>37</sub> NO <sub>2</sub>	[M+H] <sup>+</sup>	324.2897,306.3163,263.23 71,245.2271,161.1321,	1.99 ↑*	0.63 ↓*	12.33 ↑*	5.44 ↑*

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/388002004063006127>