

肠道细菌对阿魏酸的代谢研究

张蔚 江曙 钱大玮* 尚尔鑫 管汉亮 任浩 段金廛

(南京中医药大学, 江苏省方剂高新技术研究重点实验室, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心, 南京 210046)

摘 要 研究人体肠道细菌对阿魏酸的代谢。采集健康志愿者新鲜粪便, 称重稀释后厌氧培养, 通过反复涂布分离得到 69 种人体肠道细菌。采用超高效液相四级杆飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS) 与 MetabolynxTM 软件分析阿魏酸经人体粪便混合菌及分离的单菌作用后的代谢产物, 共鉴定出了 3 种代谢产物, 分别是氢化产物、去甲基化产物及去甲氧基化产物; 此外, 筛选出了对阿魏酸有特殊代谢活性的 2 种单菌, 其中一种为已鉴定的 *Bacillus* sp. 46; 而另一种未知的细菌则用 16S 核糖体 RNA(16S rRNA) 技术进行了鉴定, 结果表明, 此细菌为 *Enterococcus* sp. 45。本研究提示肠道细菌对阿魏酸有代谢作用且由不同细菌完成。

关键词 阿魏酸; 肠道细菌; 超高效液相四级杆飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS); 代谢产物; 16S 核糖体 RNA(16S rRNA)

1 引 言

人肠道中大约有 100 多种总数超过 10^8 的细菌栖息, 其中 99% 为厌氧菌, 这些细菌统称为“肠内细菌群”, 共同构成了肠道的微生态环境^[1,2]。肠道菌群能产生多种药物代谢酶, 主要包括水解酶、氧化还原酶、裂解酶和转移酶等^[3]。口服药物进入肠道后, 不可避免地在肠道菌群作用下发生代谢转化, 产生出具有不同生物活性的代谢产物, 因此肠道菌群在人体的药物代谢活动中起着重要作用^[4]。

阿魏酸(Ferulic acid), 化学名为 4-羟基-3-甲氧基苯丙烯酸, 是阿魏、川芎、当归、升麻、木贼等多种中药的有效成分之一。药理实验表明, 阿魏酸具有有效抗血小板凝集和血栓、抗氧化、抗肿瘤、抗突变、增加免疫力等多种作用^[5,6], 已成为临床常用的活血祛瘀药物之一。目前, 已有大量关于阿魏酸体内代谢研究的报道^[7,8], 但有关人体肠道混合菌及单种细菌对阿魏酸的生物转化研究却鲜有报道^[9]。本研究采集了健康志愿者新鲜粪便, 通过反复的涂布和培养, 最终分离得到 69 种人体肠道细菌。采用超高效液相四级杆飞行时间串联质谱技术(UPLC-Q-TOF/MS) 与 MetabolynxTM 软件^[10] 寻找阿魏酸与人体肠道混合菌及单菌培养后的代谢产物, 并用 16S 核糖体 RNA 技术(16S rRNA) 对具有特殊代谢活性的细菌进行了鉴定, 鉴定出了对阿魏酸具有代谢活性的细菌, 为全面了解肠道细菌对阿魏酸的代谢提供了依据。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

UPLC AcquityTM 系统(Waters 公司); SynaptTM Q-TOF 质谱仪(Waters 公司), 配有电喷雾离子源(ESI); Masslynx 4.1 质谱工作站软件(Waters 公司); MetaboLynxTM 分析软件(Waters 公司); MLS-3750 型高压蒸汽灭菌器(SANYO 公司); GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(上海三发科学仪器有限公司); WD-9402A 型 PCR 扩增仪(北京六一仪器公司); DYY-8C 电泳仪(北京六一仪器公司); TGL-46B 高速离心机(上海安亭科学仪器厂); XW-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂有限公司); TD2102 电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司); EPED 型超纯水系统(南京易普达易科技发展有限公司)。

阿魏酸(中国药品生物制品检定所, 批号 110773-201012); Pfu-X7(DNA 聚合酶)、Pfu buffer(聚合酶链式反应缓冲液)、dNTPs(4 种脱氧核糖核酸)、DNA 提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒(上海博亚生物技术有限公司); 乙腈与甲酸为色谱纯, 其余试剂为分析纯。

2013-06-20 收稿; 2013-10-12 接受

本文系江苏省高校自然科学基金重大项目(No. 10KJA360039) 和江苏省方剂高新技术研究重点实验室建设项目(No. BM2010576) 资助

* E-mail: qiandwnj@126.com

准确称取阿魏酸对照品适量,用超纯水超声溶解,配制成 2.0 g/L 标准溶液,4 ℃ 中保存备用。

2.2 普通厌氧培养液(GAM)的配制、灭菌

称取胰蛋白胨 10.00 g,大豆蛋白胨 3.00 g,胨 10.00 g,酵母浸膏 5.00 g,血清消化粉 13.50 g,牛肝浸出粉 1.20 g,牛肉膏 2.20 g,葡萄糖 3.00 g, KH_2PO_4 2.50 g,NaCl 3.00 g,可溶性淀粉 5.00 g,L-半胱氨酸盐 0.30 g,硫代乙醇酸钠 0.30 g,用超纯水加热溶解,调节至 pH 7.2 并最终定容至 1000 mL。准确称取 2.70 g NaCl,用超纯水定容至 300 mL。将厌氧培养液及生理盐水在 121 ℃ 的高压蒸汽灭菌锅中灭菌 20 min,冷却备用^[1]。

2.3 人体肠道菌液的制备及细菌的分离、培养

收集健康女性志愿者(受试者无肠道疾病或代谢性疾病史,且在采样前 3 个月内未服用过任何抗生素或益生菌)的新鲜粪便 5.0 g,与生理盐水按比例 1:4 (g/mL) 比例混合,涡旋 2 min 制成混悬液,再 1000 r/min 离心 10 min 得上清液,即为肠道菌液^[2]。将肠道菌液加到生理盐水中连续稀释,吸取 0.1 mL 适当浓度的稀释液接种在 GAM 琼脂平板上,均匀涂布,并在 37 ℃ 厌氧培养。经过传代驯化和反复平板涂布,分离出 69 种细菌,标号为 sp. 1 ~ sp. 69 并冷冻保存在 4 ℃ 冰箱中,以便后面研究使用^[3]。

2.4 含药肠道菌液的厌氧共培养及细菌供试液的制备

将混合菌及各单菌分别接种在含有 1.0 mL 厌氧培养液的离心管中,37 ℃ 条件下厌氧培养 24 h,即得到细菌种子液。取出涡旋 1 min,用生理盐水连续 10 倍稀释两次,从最终稀释液中吸取 0.1 mL 加到 0.9 mL 厌氧培养液中(每份培养液均含 9.7 μL 阿魏酸标准品溶液)。每种细菌平行做 3 份,并在 37 ℃ 厌氧条件下培养 48 h。同时做空白对照实验。

48 h 后取出含药肠道菌液,将每种细菌的 3 份平行培养液合并,以 1 ~ 1.5 倍的乙酸乙酯反复萃取 3 次,且合并各自萃取后的上清液。上清液在 50 ℃ 烘箱中烘干,再用 0.3 mL 甲醇超声复溶,13000 r/min 离心 10 min 后吸取上清液,作为细菌样品的供试液。

2.5 色谱-质谱条件

Acquity UPLCBEH C_{18} 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm);流动相:乙腈(A)和 0.1% 甲酸(B),梯度洗脱(0 ~ 7.5 min, 10% ~ 40% A; 7.5 ~ 9 min, 40% ~ 90% A; 9 ~ 10 min, 90% A; 10 ~ 12 min, 10% A),柱温 35 ℃,流速 0.4 mL/min,进样量 5 μL。

ESI⁻ 模式;毛细管电压:2 kV;锥孔电压:40 V;离子源温度:120 ℃;脱溶剂气温度:350 ℃;锥孔气流量:50 L/h;脱溶剂气流量:600 L/h;碰撞能量(6 ~ 40 V);质量扫描范围: m/z 100 ~ 1000;采用芦丁溶液为锁定质量溶液;数据采集模式:碰撞能量梯度(MS^E);数据分析:质量亏损过滤(MDF)。

2.6 代谢产物的鉴定与分析

将阿魏酸可能的 I 相代谢途径如:还原、氧化、羟化、羟化甲基化等;可能的 II 相代谢途径如:甲基化、乙酰化、磺酸化、羟化再磺酸化、葡萄糖醛酸化、羟化再葡萄糖醛酸化、磺酸化葡萄糖醛酸化、双葡萄糖醛酸化等输入 Metabolynx 软件 Metabolite List 窗口中,质谱数据检测误差范围 < 10 mDa,软件自动根据采集的数据及设置的处理方法进行分析。

2.7 有代谢活性细菌的鉴定

经分析,细菌 sp. 45、sp. 46 对阿魏酸具有特殊代谢能力,其中 sp. 46 细菌已经鉴定为 *Bacillus* sp. 46。故将另一种未知的细菌进行 16S rRNA 鉴定。鉴定步骤如下:首先将 sp. 45 细菌接种在培养液中,厌氧培养 24 h 后取出,13000 r/min 离心 1 min,弃上清液后用 DNA 提取试剂盒提取细菌的 DNA。再以提取的细菌 DNA 为模板,通过 PCR 反应扩增菌株的 16S rDNA 基因序列。扩增反应用到的通用引物为 16S-1F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 和 16S-1R (5'-AGA AAG GAG GTG ATC C-3')。PCR 扩增的 30 μL 反应体系:DNA 模板 0.3 μL,Pfu-X7 (DNA 聚合酶) 0.5 μL,10 × Pfu buffer 3 μL,4 × dNTP 2.4 μL,上下游引物各 1.5 μL,ddH₂O 加至 30 μL。PCR 扩增条件为:94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,共 30 个循环^[4];最后以 72 ℃ 延伸 10 min 结束。扩增的 PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离后,用 DNA 纯化试剂盒回收目的 DNA 片段。

将纯化后得到的 DNA 进行基因序列测定(上海美吉生物医药科技有限公司)。采用 Mega 5.0 的软件对多序列比对结果进行系统发育进化分析,用 N-J 法(连接近邻法)构建系统进化树,鉴定细菌的种类^[3]。

3 结果与讨论

3.1 阿魏酸代谢物的鉴定

采用 Metabolynx 软件将 UPLC-Q-TOF/MS 采集的 MS 数据进行处理,该软件以质量丢失滤过(MDF)处理为基础,用于复杂生物基质中快速检测药物代谢物。经 MetabolynxTM 软件处理后,检测到的经人体肠道细菌作用后的阿魏酸的代谢产物见表 1。

表 1 阿魏酸原型及其 3 种代谢产物的保留时间、分子式、离子碎片等信息

Table 1 UPLC/ESI-MS, retention time (RT) and fragment ions of ferulic acid and its metabolites

序号 No.	保留时间 RT (min)	分子式 Formula	二级质谱碎片 MS/MS	鉴定 Identification	细菌 Strain
M0	3.20	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	193, 178, 163, 149, 135	原型 Parent	sp. 45 / sp. 46
M1	3.09	C ₁₀ H ₁₂ O ₄	195, 151, 135, 121	氢化的阿魏酸 Hydrogenated FA	sp. 45
M2	2.89	C ₉ H ₈ O ₄	179, 135, 119	咖啡酸 Caffeic acid	sp. 46
M3	5.73	C ₉ H ₈ O ₃	163, 147, 119, 103	去甲氧基化的阿魏酸 Demethoxylated FA	sp. 46

3.1.1 原形化合物 M0 在 45、46 号细菌的样品中存在准分子离子峰 $[M-H]^{-}$ (m/z 193) 的化合物 M0 ($t_R = 3.20$ min), 在二级质谱中有 $[M-CH_3]^{-}$ (m/z 178)、 $[M-CH_2O]^{-}$ (m/z 163)、 $[M-CO_2]^{-}$ (m/z 149)、 $[M-CO_2-CH_3]^{-}$ (m/z 134) 等主要碎片离子峰, 与阿魏酸对照品相同, 由此确定为阿魏酸。

3.1.2 氢化产物 M1 在 45 号样品的一级全扫描质谱中, 代谢产物 M1 ($t_R = 3.09$ min) 的准分子离子峰为 $[M-H]^{-}$ (m/z 195), 阿魏酸的准分子离子为 $[M-H]^{-}$ (m/z 193), 说明 M1 可能为阿魏酸的氢化还原产物。对 M1 进行二级质谱分析, 主要有 $[M+H_2]^{-}$ (m/z 195)、 $[M+H_2-CO_2]^{-}$ (m/z 151)、 $[M+H_2-CO_2-O]^{-}$ (m/z 135)、 $[M+H_2-CO_2-CH_2O]^{-}$ (m/z 121) 等碎片离子峰, 其质谱断裂特征规律与阿魏酸相似, 故推测发生了氢化反应。

3.1.3 去甲基产物 M2 在 46 号样品的一级全扫描质谱中, 代谢产物 M2 ($t_R = 2.89$ min) 的准分子离子峰为 $[M-H]^{-}$ (m/z 179), 推测由阿魏酸结构中脱去一分子甲基而形成。对 M2 进行二级质谱分析, 其主要碎片离子峰有 $[M-CO_2]^{-}$ (m/z 135)、 $[M-CO_2-O]^{-}$ (m/z 119), 由此推断 M2 为阿魏酸经 46 号细菌作用后的去甲基化产物。

3.1.4 去甲氧基产物 M3 在 46 号样品的一级全扫描质谱中, 代谢产物 M3 ($t_R = 5.73$ min) 的准分子离子峰为 $[M-H]^{-}$ (m/z 163), 阿魏酸的准分子离子为 $[M-H]^{-}$ (m/z 193), 推测 M3 可能为阿魏酸的去甲氧基化产物。对 M3 进行二级质谱分析发现有 $[M-O]^{-}$ (m/z 147), $[M-CO_2]^{-}$ (m/z 119), $[M-CO_2-O]^{-}$ (m/z 103) 等主要碎片离子峰, 故推测 M3 是阿魏酸的去甲氧基化产物。

上述各代谢物在 45 号和 46 号细菌孵育样品的液相色谱图如图 1, 各成分的二级质谱如图 2。

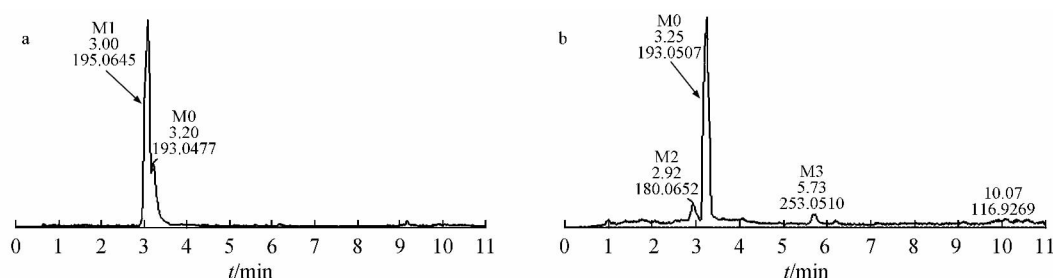


图 1 阿魏酸及其代谢产物的色谱图: (a) 为 45 号细菌孵育液的色谱图, (b) 为 46 号细菌孵育液的色谱图

Fig. 1 UPLC/MS chromatograms of ferulic acid and its metabolites, (a) strain 45 sample, (b) strain 46 sample

3.2 对阿魏酸有特殊代谢能力细菌的鉴定

对阿魏酸有较强代谢能力的 45 号细菌的基因登录号为 KC41732, 此细菌的基因进化树如图 3, 经

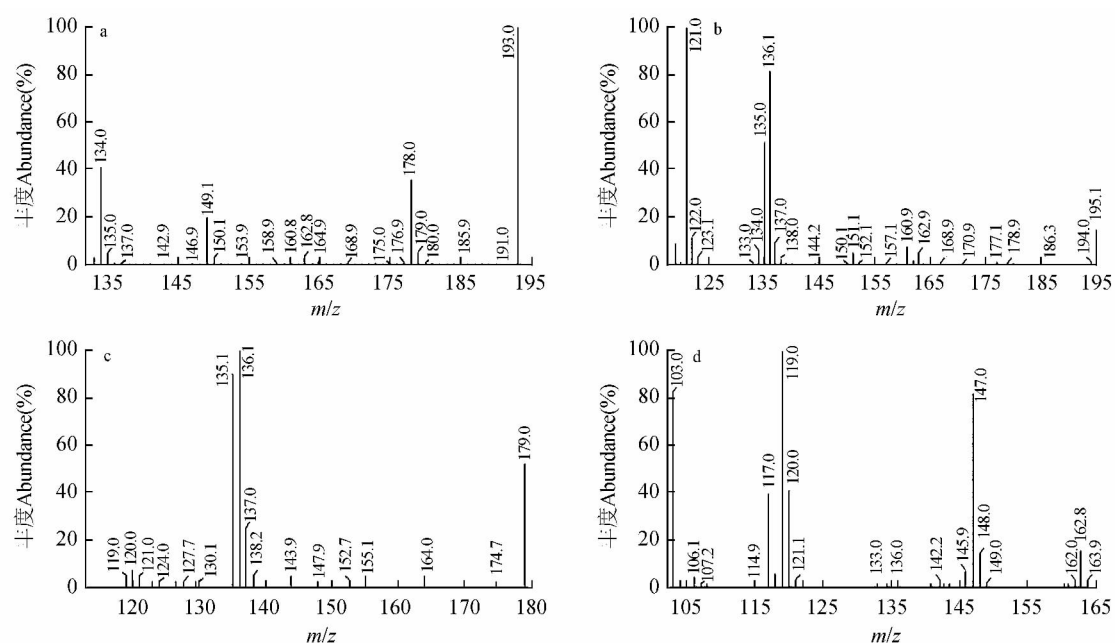


图2 阿魏酸及其代谢物的二级质谱裂解图: (a) M0 (m/z 193), (b) M1 (m/z 195), (c) M2 (m/z 179), (d) M3 (m/z 163)

Fig.2 UPLC-MS/MS spectra of ferulic acid and its metabolites: (a) M0 (m/z 193), (b) M1 (m/z 195), (c) M2 (m/z 179), (d) M3 (m/z 163)

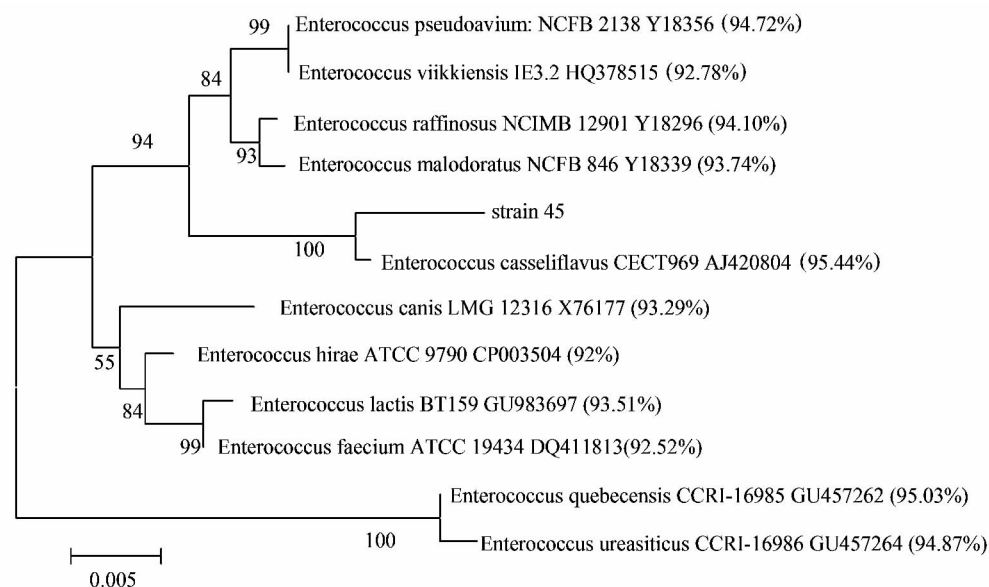


图3 45号细菌的基因进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of bacterium sp. 45

鉴定为 *Enterococcus* sp. 45。

本实验通过体外粪便温孵法及超高效液相四级杆飞行时间串联质谱手段检测到了阿魏酸经人体肠道细菌作用后的3个代谢产物。结果表明,阿魏酸在不同种的细菌作用下会发生不同类型的代谢转化,推测可能与细菌生长过程中产生的多种不同种类的代谢酶有关。本研究还通过16S rRNA技术鉴定了一株可将阿魏酸特异性的转化为其氢化产物的细菌,结果表明,细菌 sp. 45 的同源性与肠球菌属最为接近,故将其命名为 *Enterococcus* sp. 45。本研究结果提示 *Enterococcus* sp. 45 会产生氢化还原酶, *Bacillus* sp. 46 会产生脱甲基酶和脱甲氧基酶。综上,本研究为全面了解肠道细菌对阿魏酸的代谢提供了依据,也为活性代谢物的生物转化产业化奠定基础。本方法还可用于其它多种复杂化合物的细菌代谢分析。

References

- 1 TAO Jin-Hua, DI Liu-Qing, SHAN Jin-Jun, BI Xiao-Lin, ZHAO Xiao-Li. *Chin Tradit Herb Drugs*, **2008**, 39(12) : 1902 – 1904
陶金华, 狄留庆, 单进军, 毕肖林, 赵晓莉. *中草药*, **2008**, 39(12) : 1902 – 1904
- 2 Durbán A, Abellán J, Jiménez-Hernández N, Ponce M, Ponce J, Sala T, D'Auria G, Latorre A, Moya A. *Microb. Ecol.*, **2011**, 61(1) : 123 – 133
- 3 SUN Yan, LI Xue-Tuo, YIN Su-Lan. *Chin. Tradit Herb Drugs*, **2001**, 32(4) : 375 – 377
孙 艳, 李雪驼, 殷素兰. *中成药*, **2001**, 32(4) : 375 – 377
- 4 Xue C F, Jiang S, Guo J M, Qian D W, Shang E X, Duan J A. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879(32) : 3901 – 3908
- 5 HU Yi-Yong, XU Xiao-Yu. *Chin. Tradit. Herb. Drugs*, **2006**, 28(2) : 253 – 255
胡益勇, 徐晓玉. *中成药*, **2006**, 28(2) : 253 – 255
- 6 Laure P, Michael N. C, Gary W. *Drug Metab. Dispos.*, **2008**, 36(1) : 190 – 197
- 7 Zhang Z C, Xu M, Sun S F, Qiao X, Wang B R, Han J, Guo D A. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 871(1) : 7 – 14
- 8 Ni S M, Qian D W, Duan J A, Guo J M, Shang E X, Shu Y, Xue C F. *J. Chromatogr. B*, **2010**, 878(28) : 2741 – 2750
- 9 Dominik S, Anna J. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment*, **2010**, 9(1) : 45 – 59
- 10 Zhu M, Ma L, Zhang D, Ray K, Zhao W, Humphreys W G, Skiles G, Sanders M, Zhang H. *Drug Metab. Dispos.*, **2006**, 34(10) : 1722 – 1733
- 11 Zhang Y S, Que S, Yang X W, Wang B, Qiao L, Zhao Y Y. *Magn. Reson. Chem.*, **2007**, 45(11) : 909 – 916
- 12 Matthies A, Blaut M, Braune A. *Appl. Environ. Microb.*, **2009**, 75(6) : 1740 – 1744
- 13 Hur H G, Lay J J, Beger R D, Freeman J P, Rafii F. *Arch. Microbiol.*, **2000**, 174(6) : 422 – 428
- 14 Patrizia B, Erwin S, Beatrice V, Maddalena R, Diego M. *Int. J. Food Microbiol.*, **2003**, 81(3) : 203 – 209
- 15 NIE Zhi-Juan, GU Xie-Jun, CAI Shu, XIE Xiang-Ting, HE Jian, ZHENG Jin-Wei, LI Shun-Peng. *Chin. J. Appl. Environ.*, **2011**, 17(6) : 869 – 875
聂志娟, 顾谢军, 蔡 舒, 谢香婷, 何 健, 郑金伟, 李顺鹏. *应用与环境生物学报*, **2011**, 17(6) : 869 – 875

Study on Metabolism of Ferulic Acid Produced by Intestinal Bacteria

ZHANG Wei, JIANG Shu, QIAN Da-Wei*, SHANG Er-Xin, GUAN Han-Liang, REN Hao, DUAN Jin-Ao

(Jiangsu Key Laboratory for High Technology Research of Traditional Chinese Medicine Formulae,

Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization,

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract The investigation on the metabolism of ferulic acid by incubating ferulic acid with different isolated bacteria from human feces *in vitro* was carried out. Fresh human fecal sample was obtained from a healthy volunteer, diluted serially in sterile water and sixty-nine different bacterial colonies were picked out ultimately. Ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) with automated data analysis software (MetaboLynxTM) was applied to fast analysis of ferulic acid metabolites. The results indicated that hydrogenation, demethylation and demethoxylation were the major metabolic pathways of ferulic acid by human intestinal bacteria *in vitro*. Two strain bacteria were found to metabolize ferulic acid and one of them had been identified as *Bacillus* sp. 46. The 16S rRNA gene of the other isolated bacterium sp. 45 was base pair sequences and its nucleotide sequence has registered in GenBank under accession no. KC41732. Finally, this strain was identified as *Enterococcus* sp. 45 by phylogenetic affiliation. This study suggested that intestinal bacteria had the metabolic effects of ferulic acid and the biotransformation was completed by different bacteria.

Keywords Ferulic acid; Intestinal bacteria; Ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; Metabolites; 16S Rrna

(Received 20 June 2013; accepted 12 October 2013)

This work was supported by the Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China (No. 10KJA360039)