基于大鼠体内代谢的壮药三七姜抗炎药效物质基础研究Δ

刘星晨[1,2,3*]，梁　洁[1,2,3#]，黄春燕[4]，陈嘉怡[1,2]，彭嘉文[1,2]，谢晶晶[1,2]，马玉明[1,2]，陈思思[1,2]，韦佳丽[1,2]（1.广西中医药大学药学院/广西壮瑶药重点实验室，南宁　530200；2.壮瑶药协同创新中心，南宁　530200；3.广西壮族自治区民族药资源与应用工程研究中心，南宁　530200；4.钦州市检验检测中心，广西 钦州　535000）

中图分类号　R917；R284　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）19-2358-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.19.07

摘　要　目的　为壮药三七姜的药效物质基础研究提供参考。**方法**　将24只雄性SD大鼠随机分为空白组（纯化水）、给药组（三七姜醇提物，以生药量计为15.75 g/kg），每组12只。每天灌胃药液/纯化水2次，每次灌胃间隔6～8 h，连续3 d。给药结束后，收集2组大鼠血液、尿液及粪便样品。利用超高效液相色谱联用四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱技术对三七姜醇提物中的化学成分及大鼠灌胃三七姜醇提物后的血清、尿液、粪便代谢物进行鉴定。采用多元统计分析方法筛选血清中差异代谢物，并使用MetaboAnalyst 5.0平台对代谢通路进行分析。**结果**　从三七姜醇提物中鉴定出了38个化合物，从尿液样品中鉴定出了14个原型成分和3个代谢产物，从粪便样品中鉴定出了9个原型成分，从血清样品中鉴定出了10个原型成分和1个代谢产物。在2组大鼠血清样本中共筛选得到71个差异代谢物，其中给药组中阿魏酸、甘草素等44个差异代谢物的水平相较于空白组上调，花生四烯酸、苯乙酰谷氨酰胺等27个差异代谢物的水平相较于空白组下调。71个差异代谢物主要富集在苯丙氨酸代谢、亚油酸代谢、花生四烯酸代谢、色氨酸代谢等11条代谢通路上。**结论**　阿魏酸、甘草素、异嗪皮啶和刺芒柄花素等成分可能是三七姜直接发挥抗炎药效作用的物质基础，三七姜可能通过影响花生四烯酸代谢和色氨酸代谢等通路发挥抗炎作用。

关键词　三七姜；化学成分；药效物质；体内代谢；炎症；UPLC-Q-Exactive-MS技术

Study on pharmacodynamic substances of anti-inflammatory effect of Zhuang medicine *Stahlianthus involucratus* based on metabolism in rats

LIU Xingchen[1,2,3], LIANG Jie[1,2,3], HUANG Chunyan[4], CHEN Jiayi[1,2], PENG Jiawen[1,2], XIE Jingjing[1,2], MA Yuming[1,2], CHEN Sisi[1,2], WEI Jiali[1,2]（1. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine/Guangxi Key Laboratory of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China; 2. Collaborative Innovation Center of Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Nanning 530200, China; 3. Guangxi Zhuang Autonomous Region Ethnic Medicine Resources and Application Engineering Research Center, Nanning 530200, China; 4. Qinzhou Inspection and Testing Center, Guangxi Qinzhou 535000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To provide reference for basic analysis of the pharmacodynamic substance in *Stahlianthus involucratus*. **METHODS** Overall 24 SD male rats were randomly divided into blank group (purified water), and administration group (ethanol extract of *S. involucratus*, 15.75 g/kg, calculated by crude drug), with 12 rats in each group. They were given drug liquid/purified water intragastrically, twice a day, every 6-8 h, for consecutive 3 days. After medication, the blood, urine and fecal samples were collected from two groups of rats. UPLC-Q-Exactive-MS technology was used to identify the chemical constituents in the ethanol extract of *S. involucratus*, and metabolites in the blood, urine and fecal of rats after intragastrical administration of the ethanol extract of *S. involucratus*. Multivariate statistical analysis was employed to screen various serum metabolites. Metabolic pathways were analyzed by MetaboAnalyst 5.0 platform. **RESULTS** A total of 38 chemical constituents were identified from the ethanol extract of *S. involucratus*, including fourteen prototype components and three metabolites identified from urine samples, nine prototype components identified from fecal samples, and ten prototype components and one metabolite identified from serum samples. A total of 71 differential metabolites were screened from two groups of rat serum samples, of which 44 differential metabolites, such as ferulic acid, glycyrrhizin, were up-regulated and 27

Δ**基金项目**　广西自然科学基金项目（No.2020GXNSFAA238026）；国家中医药管理局高水平中医药重点学科——少数民族药学（壮药学）建设项目（No.zyyzdxk-2023165）；广西壮族自治区高校黄大年式教师团队“中药学传承创新教师团队”项目（No.桂教教师〔2023〕31号）；广西高等学校千名中青年骨干教师培育计划项目（No.桂教人〔2019〕5号）；广西中医药大学“岐黄工程”高层次人才团队培育项目（No.202406）

*　**第一作者**　硕士。研究方向：中药、民族药质量分析。电话：0771-4953513。E-mail：2964708575@qq.com

#　**通信作者**　教授，博士生导师，博士。研究方向：中药药效物质基础与质量控制。电话：0771-4953513。E-mail：liangjie1101@126.com

differential metabolites, such as arachidonic acid, phenylacetylglutamine, were down-regulated. The 71 differential metabolites were mainly enriched in 11 metabolic pathways, including phenylalanine metabolism, linoleic acid metabolism, arachidonic acid metabolism, and tryptophan metabolism. **CONCLUSIONS** Ferulic acid, liquiritigenin, isofraxidin and formononetin may be the material basis that directly exert pharmacological effects of *S. involucratus*. *S. involucratus* may exert anti-inflammatory effects by affecting metabolic pathways, including arachidonic acid metabolism and tryptophan metabolism.

KEYWORDS *Stahlianthus involucratus*; chemical constituents; pharmacodynamic substances; internal metabolism; inflammation; UPLC-Q-Exactive-MS technology

广西民间传统的壮药三七姜收载于《广西壮族自治区壮药质量标准》（第二卷），为姜科植物姜叶三七 *Stahlianthus involucratus*（King ex Baker）Craib ex Loes. 的干燥根茎和块根[1]，又称姜田七、姜三七、竹叶三七等，多见于广西、广东、福建、云南等省份[2]。其性温、味辛，具有化瘀、镇痛、止血等功效，多用于活血散瘀、消肿止痛、跌打损伤、风湿骨痛、吐血衄血、月经过多、虫蛇咬伤、外伤出血等的治疗[1]。

研究发现，三七姜含有酚类、挥发油类、黄酮类和有机酸类等化学成分[3—5]，具有镇痛、抗炎、抗肿瘤和抗氧化等药理作用[4—8]。但目前有关其体内代谢的相关研究较少，其药效成分、作用靶点及作用机制尚未明确。中药化学成分复杂，各化学成分性质不一，而超高效液相色谱串联四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱（UPLC-Q-Exactive-MS）技术因具有高灵敏度、高选择性和高分辨率的特点，被广泛应用于天然产物成分分析、蛋白质组学和代谢物研究。因此，本研究利用UPLC-Q-Exactive-MS技术对三七姜醇提物、入血成分和代谢物进行分析，并推测其可能的代谢通路，以期为三七姜的药效物质基础研究提供理论支持。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有：Ultimate 3000型UPLC仪、Q-Exactive型高分辨质谱仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、XW-80A型涡旋仪（上海沪西分析仪器厂有限公司）、5415R型低温高速离心机（艾本德中国有限公司）、NDK200-2N型氮吹仪（杭州米欧仪器有限公司）、Milli-Q Gradient A10型超纯水纯化系统（美国Millipore公司）。

1.2 主要药品与试剂

三七姜药材于2023年2月采自广西南宁，经广西中医药大学药学院滕建北教授鉴定为姜科植物姜叶三七 *S. involucratus*（King ex Baker）Craib ex Loes. 的干燥根茎和块根。对照品汉黄芩苷、芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、柚皮素、柠檬酸、原儿茶酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、咖啡酸、尿苷、莪术二酮（批号分别为RP221114、RP221223、RP220113、RP220527、RP220605、RP210609、RP210730、RP220610、RP210525、RP190405，纯度均大于98%）均购自成都麦德生科技有限公司；甲醇和乙腈（质谱级）购自美国Merck公司；甲酸（色谱级）购自上海安谱实验科技股份有限公司；甲酸铵（色谱级）购自美国Sigma公司；2-氯苯丙氨酸（分析纯）购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 动物

本研究所用动物为雄性清洁级健康SD大鼠，共24只，体重（220±20）g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司，动物生产许可证号为SCXK（湘）2019-0004。本研究涉及的动物实验方案已获广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准，批准编号为DW20230302-015。

2 方法

2.1 三七姜醇提物的制备

称取三七姜药材适量，粉碎成粗粉，加入8倍量的80%乙醇溶液，加热回流提取3次，每次2 h；过滤，合并滤液，60 ℃减压回收乙醇，浓缩，得三七姜醇提物浸膏（得率7.0%）。

2.2 动物分组与给药

将24只雄性SD大鼠随机分为空白组（n=12）、给药组（n=12）。实验前，所有大鼠均于SPF级屏障环境中适应性喂养7 d，其间自由摄食、饮水。给药前禁食12 h（自由饮水），给药组大鼠按以生药量计为15.75 g/kg的剂量（人用剂量的10倍）灌胃三七姜醇提物药液；空白组大鼠灌胃等体积纯化水。每天灌胃药液/纯化水2次，每次灌胃间隔6～8 h，连续3 d。

2.3 生物样品的收集与处理

末次给药后1 h，取给药组大鼠6只，用戊巴比妥钠麻醉后行腹主动脉采血，于4 ℃下以3 000 r/min离心20 min，取上清液，得血清样品。将给药组剩余的6只大鼠置于代谢笼中，收集其12 h内的尿液和粪便。将收集的尿液以3 500 r/min离心10 min，取上清液，得尿液样品；将收集的粪便于50 ℃烘干，碾碎，得粪便样品。空白组大鼠同法收集血清、尿液及粪便样品。以上样品均置于－80 ℃冰箱中保存。

2.4 供试液和对照品溶液的制备

2.4.1 血清样品供试液的制备

常温下解冻血清样本后，取100 μL于2 mL离心管

中，加入300 μL乙腈、20 μL 300 μg/mL的2-氯苯丙氨酸（内标，下同），涡旋30 s，冰水浴超声提取20 min，然后于4 ℃下以13 000 r/min离心5 min。取300 μL上清液，以氮气吹干；加入100 μL超纯水复溶，涡旋1 min，于4 ℃下以13 000 r/min离心5 min，取80 μL上清液作为血清供试液。

2.4.2　尿液样品供试液的制备

常温下解冻尿液样本后，取500 μL于1.5 mL离心管中，在4 ℃下以13 000 r/min离心5 min，取上清液过0.22 μm水相滤膜；取80 μL滤液，加入20 μL内标（300 μg/mL），涡旋混匀，取80 μL作为尿液供试液。

2.4.3　粪便样品供试液的制备

取10 mg粪便样本，加入1 mL 1%甲酸-乙腈溶液，接着加入20 μL内标（300 μg/mL），涡旋30 s，冰水浴超声提取20 min，在4 ℃下以13 000 r/min离心5 min，取800 μL上清液以氮气吹干；用100 μL 80%乙腈溶液（含1%甲酸）复溶样本，涡旋1 min，然后在4 ℃下以13 000 r/min离心5 min，取上清液80 μL作为粪便供试液。

2.4.4　对照品溶液的制备

分别精密称取“1.2”项下各对照品适量，置于10 mL容量瓶中，加甲醇溶解并定容，混匀，经0.22 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得质量浓度均为0.1 mg/mL的单一对照品溶液。

2.4.5　三七姜醇提物供试液的制备

称取三七姜醇提物浸膏约0.1 g，置于100 mL容量瓶中，用甲醇溶解并定容，即得质量浓度为1 mg/mL的三七姜醇提物供试液，备用。

2.5　色谱及质谱条件

2.5.1　色谱条件

色谱柱为Waters HSS T3柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm）；正离子模式下采用的流动相为含0.1%甲酸的水溶液（A液）和含0.1%甲酸的甲醇溶液（B液），负离子模式下采用的流动相为含10 mmol/L甲酸铵的水溶液（A液）和含10 mmol/L甲酸铵的95%甲醇溶液（B液），2种离子检测模式均采用相同的梯度洗脱条件（0～1 min，90%A；1～13 min，90%A→2%A；13～18 min，2%A；18～18.5 min，2%A→90%A；18.5～20 min，90%A）；流速为0.3 mL/min；柱温为35 ℃；检测波长为254 nm；进样量为2 μL。

2.5.2　质谱条件

采用电喷雾离子源（ESI），选择正、负离子模式分开检测，离子源喷雾电压分别为3.8 kV（+）、3.2 kV（－）；一级分辨率为70 000（半峰全宽），二级分辨率为17 500（半峰全宽）；扫描方式为Full MS/dd-MS^{2}模式，扫描范围为质荷比（*m/z*）100～1 500；毛细管温度为300 ℃；鞘气流速为40 arb；雾化器温度为350 ℃。

2.6　样品分析及数据处理

2.6.1　三七姜醇提物化学成分及代谢成分分析

取“2.4”项下各供试液和对照品溶液，每个样品取5 μL上清液混匀后得到质控（quality control，QC）样品，每隔6个样本插入1个QC样品，分别按“2.5”项下条件进样分析。使用MS-DIAL软件对实验数据进行处理，将得到的数据结果与MassBank、京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）数据库进行比对，对各个色谱峰进行初步推测，得到化合物的准分子离子峰和二级碎片离子、分子式等信息，再结合相关文献及质谱裂解规律，进一步推断未知化合物。

2.6.2　数据处理与分析

首先运用Analysis Base File Converter软件将原始数据转化成通用（.abf）格式，并在MS-DIAL软件平台执行包括峰的识别、保留时间校正、自动积分等诸多预处理，获取代谢物编号、保留时间、*m/z*、名称、离子模式以及峰面积等信息。接下来，对样本中的feature数目进行筛选，得到一个含有样本名称、一级质谱及二级质谱的匹配库定性结果，以及基于峰面积的相对定量的可视化矩阵。在此基础上，借助MetaboAnalyst 5.0平台通过主成分分析（principal component analysis，PCA）和偏最小二乘法-判别分析（partial least squares-discriminant analysis，PLS-DA）等手段来分析代谢物，并结合变量重要性投影（variable importance in projection，VIP）值＞1、*t*检验的P＜0.05筛选血清差异代谢物；通过KEGG进行血清差异代谢物的代谢通路富集分析，以通路影响值（pathway impact）＞0.2为标准，得出主要的代谢通路。

3　结果

3.1　三七姜醇提物化学成分及代谢成分分析结果

在正、负离子模式下，三七姜醇提物的化学成分以及给药后大鼠尿液、粪便和血清样品中原型成分及其代谢产物的总离子流图详见图1、图2。根据所得化合物相关信息，结合相关文献、对照品图谱（限于篇幅，本文略）及质谱裂解规律，从三七姜醇提物中共鉴定出38个化合物，包括10个黄酮及其苷类化合物、10个有机酸类化合物、4个酚类化合物、5个萜类化合物、2个生物碱类化合物和7个其他类化合物。从大鼠的尿液、粪便和血清样品中共鉴定出21个原型成分和3个代谢产物，其中从尿液样品中鉴定出14个原型成分和3个代谢产物，从粪便样品中鉴定出9个原型成分，从血清样品中鉴定出10个原型成分和1个代谢产物，详见表1。

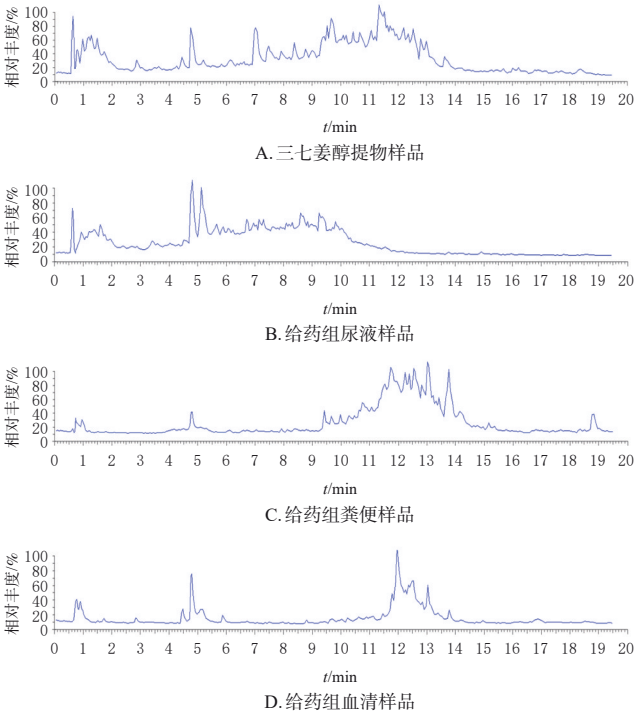


图1　正离子模式下三七姜醇提物及给药组大鼠尿液、粪便、血清样品的总离子流图

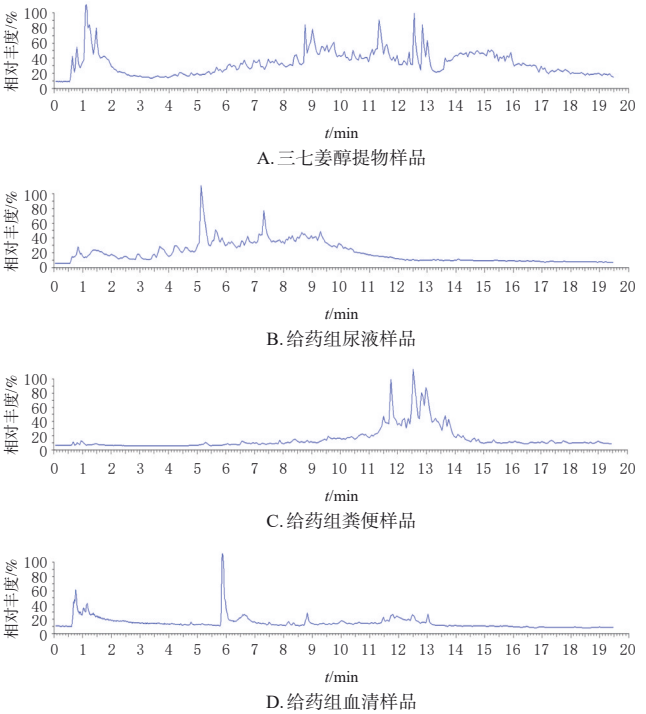


图2　负离子模式下三七姜醇提物及给药组大鼠尿液、粪便、血清样品的总离子流图

表1　三七姜醇提物化学成分及代谢成分鉴定结果

序号	加合离子种类	保留时间/min	质量偏差/ppm	碎片离子(*m/z*)	分子式	来源	鉴定成分
1	$[M+H]^+$	7.439	−1.1	271.058 1、227.070 0、177.126 7、151.111 8、113.023 4	$C_{21}H_{18}O_{11}$	三七姜醇提物	芹菜素-7-*O*-葡萄糖醛酸苷(apigenin-7-*O*-glucuronide)
2	$[M-H]^-$	7.788	−0.5	135.006 9、119.049 2、91.017 8	$C_{15}H_{12}O_4$	三七姜醇提物	甘草素/异甘草素(liquiritigenin/isoliquiritigenin)
3	$[M+H]^+$	8.203	−0.3	237.052 3、199.074 7、153.068 7、128.062 2	$C_{15}H_{10}O_4$	三七姜醇提物	大豆苷元(daidzein)
4	$[M+H]^+$	8.340	−0.5	269.042 0、241.048 3	$C_{16}H_{12}O_5$	三七姜醇提物	黄豆黄素(glycitein)
5	$[M+H]^+$	10.579	−1.5	411.229 6、327.136 9	$C_{20}H_{30}O_6$	三七姜醇提物	异苦参酮(isokurarinone)
6	$[M-H]^-$	1.061	−0.8	97.027 3、71.011 9	$C_4H_4O_4$	三七姜醇提物	富马酸(fumaric acid)
7	$[M-H]^-$	3.827	−2.4	109.027 9	$C_7H_6O_4$	三七姜醇提物	原儿茶酸(protocatechuic acid)
8	$[M-H]^-$	5.384	−4.7	115.038 6、113.059 7、85.064 7	$C_7H_{12}O_5$	三七姜醇提物	2-异丙基苹果酸(2-isopropylmalic acid)
9	$[M-H]^-$	6.503	−4.4	151.038 9、136.051 7、121.027 8	$C_{10}H_{12}O_4$	三七姜醇提物	二氢阿魏酸(dihydroferulic acid)
10	$[M+H]^+$	2.268	1.6	109.028 7	$C_6H_6O_3$	三七姜醇提物	麦芽酚(maltol)
11	$[M+H]^+$	8.446	0.9	105.044 7、95.049 1、67.055 0	$C_7H_6O_2$	三七姜醇提物	对羟基苯甲醛(4-hydroxybenzaldehyde)
12	$[M+H]^+$	9.033	−1.9	191.105 7	$C_{15}H_{20}O_4$	三七姜醇提物	脱落酸(abscisic acid)
13	$[M+H]^+$	1.052	−1.7	94.065 4	$C_7H_7NO_2$	三七姜醇提物	葫芦巴碱(trigonelline)
14	$[M+H]^+$	8.602	0.7	121.064 7、103.054 7	$C_{10}H_{15}NO$	三七姜醇提物	大麦芽碱(hordenine)
15	$[M+H]^+$	1.150	1.2	107.016 3、78.034 8	$C_6H_5NO_2$	三七姜醇提物	烟酸(nicotinic acid)
16	$[M+H]^+$	1.308	1.7	106.029 2、96.044 7、80.050 0	$C_6H_6N_2O$	三七姜醇提物	烟酰胺(nicotinamide)
17	$[M-H]^-$	4.456	−3.3	159.092 3、142.064 7、116.049 3	$C_{11}H_{12}N_2O_2$	三七姜醇提物	色氨酸(tryptophan)
Y1	$[M-H]^-$	1.336	−2.7	200.055 6、152.034 9、140.033 9、110.023 8	$C_9H_{12}N_2O_6$	三七姜醇提物、尿液	尿苷(uridine)
Y2	$[M+H]^+$	1.496	−0.1	165.054 6、136.075 8、123.043 9	$C_9H_{11}NO_3$	三七姜醇提物、血清	酪氨酸(tyrosine)
Y3	$[M-H]^-$	1.611	−5.0	173.008 6、154.997 1、129.018 1、111.006 8、87.007 3、85.027 9	$C_6H_8O_7$	三七姜醇提物、血清	柠檬酸(citric acid)
Y4	$[M+H]^+$	1.728	−2.4	86.096 7、69.070 4	$C_6H_{13}NO_2$	三七姜醇提物、尿液、血清	亮氨酸(leucine)
Y5	$[M-H]^-$	4.710	−1.4	93.033 1、65.038 0	$C_7H_6O_3$	三七姜醇提物、尿液、血清	对羟基苯甲酸(4-hydroxybenzoic acid)
Y6	$[M-H]^-$	5.234	−4.8	178.025 1、149.059 8、137.023 1、134.036 1	$C_{10}H_{10}O_4$	三七姜醇提物、尿液	阿魏酸(ferulic acid)
Y7	$[M-H]^-$	6.432	0.5	283.059 7、268.038 1、175.024 2	$C_{22}H_{20}O_{11}$	三七姜醇提物、尿液	汉黄芩苷(oroxindin)
Y8	$[M+H]^+$	6.625	2.2	149.096 2、123.044 1、95.049 3	$C_9H_{10}O_3$	三七姜醇提物、尿液、粪便	丹皮酚(paeonol)
Y9	$[M-H]^-$	6.754	−4.5	135.044 1	$C_9H_8O_4$	三七姜醇提物、尿液、粪便、血清	咖啡酸(caffeic acid)
Y10	$[M-H]^-$	6.886	0.4	341.065 8、311.056 1、283.063 0、239.072 3	$C_{21}H_{20}O_{10}$	三七姜醇提物、尿液	牡荆素(vitexin)
Y11	$[M+H]^+$	7.775	1.2	137.023 1、121.065 3	$C_{15}H_{12}O_4$	三七姜醇提物、尿液	甘草素/异甘草素(liquiritigenin/isoliquiritigenin)
Y12	$[M-H]^-$	7.874	−3.5	169.084 9、125.095 4、97.064 5	$C_9H_{16}O_4$	三七姜醇提物、尿液、粪便	壬二酸(azelaic acid)
Y13	$[M-H]^-$	8.221	−0.2	165.018 1、151.001 4	$C_{15}H_{12}O_5$	三七姜醇提物、尿液、血清	柚皮素(naringenin)

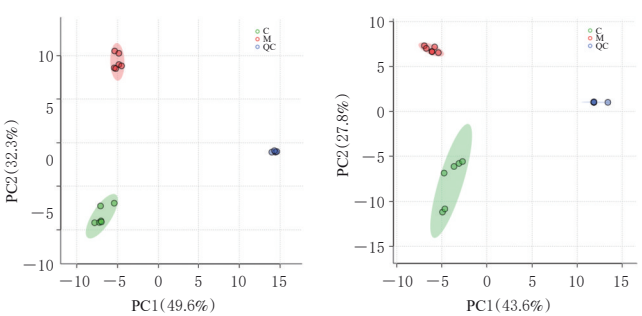
注：“序号”下的Y表示原型成分，M表示代谢物。

续表1

序号	加合离子种类	保留时间/min	质量偏差/ppm	碎片离子(*m/z*)	分子式	来源	鉴定成分
Y14	$[M+H]^+$	8.381	−1.0	201.090 6、187.074 6、145.101 0、119.086 2	$C_{14}H_{12}O_3$	三七姜醇提物、尿液	白藜芦醇(resveratrol)
Y15	$[M+H]^+$	8.754	−1.1	253.084 4、243.066 3、215.069 9、153.070 4	$C_{15}H_{10}O_5$	三七姜醇提物、尿液、血清	染料木素(genistein)
Y16	$[M-H]^-$	9.684	−2.7	232.110 5、217.086 5	$C_{15}H_{20}O_3$	三七姜醇提物、粪便	白术内酯Ⅲ(atractylenolide Ⅲ)
Y17	$[M+H]^+$	10.083	−1.8	121.064 1、95.049 1、67.054 9	$C_9H_8O_3$	三七姜醇提物、尿液、粪便、血清	对香豆酸(*p*-coumaric acid)
Y18	$[M+H]^+$	10.688	−2.3	259.097 0、177.093 2、137.059 7	$C_{17}H_{24}O_3$	三七姜醇提物、粪便、血清	6-姜烯酚(6-shogaol)
Y19	$[M+H]^+$	10.757	−1.8	317.209 5、299.233 6	$C_{20}H_{30}O_4$	三七姜醇提物、粪便	14-去氧穿心莲内酯(14-deoxyandrographolide)
Y20	$[M-H]^-$	10.954	−1.6	483.314 6、457.330 5、439.317 4、421.313 8、413.221 4	$C_{30}H_{46}O_6$	三七姜醇提物、粪便	苜蓿酸(medicagenic acid)
Y21	$[M+H]^+$	11.458	2.4	219.174 9、201.163 5、81.070 4、69.070 4、67.055 0	$C_{15}H_{24}O_2$	三七姜醇提物、粪便、血清	莪术二酮(curdione)
M1	$[M-H]^-$	8.358	−2.0	268.037 9、239.034 7、212.045 7	$C_{16}H_{12}O_5$	尿液、血清	汉黄芩苷水解产物(汉黄芩素)
M2	$[M-H]^-$	8.759	1.0	251.043 9、241.051 5、223.048 4、195.050 7	$C_{15}H_{10}O_5$	尿液	汉黄芩素去甲基化产物
M3	$[M-H]^-$	6.904	−0.3	269.043 8	$C_{21}H_{18}O_{11}$	尿液	汉黄芩素去甲基后葡萄糖醛酸化产物

3.2 血清差异代谢物的筛选结果

根据PCA得分图(图3)可知,所有QC样本聚在一起,说明样本及分析过程中仪器的稳定性良好、模型可靠,所得差异代谢物能够反映样本之间的生物学差异;给药组和空白组的血清样本之间表现出明显的分离现象。PLS-DA结果(图4)显示,2组样本之间的差异十分明显,并且PLS-DA模型在正离子模式下的R^2(表示模型的解释率,数值越接近1表示模型的差异性越大)为0.999 5、Q^2(表示模型的预测能力,数值越接近1表示模型的可靠性越强)为0.982 7,在负离子模式下的R^2=0.997 9、Q^2=0.925 4,均接近1,表明该模型在正、负离子模式下均展现出了良好的解释率和预测能力。根据VIP值>1及P<0.05的标准,共筛选出2组大鼠血清样本中71个差异代谢物(正、负离子模式下分别筛选出39、32个)。其中,与空白组相比,给药组中阿魏酸、甘草素、异嗪皮啶和刺芒柄花素等44个差异代谢物的水平上调,花生四烯酸和苯乙酰谷氨酰胺等27个差异代谢物的水平下调。



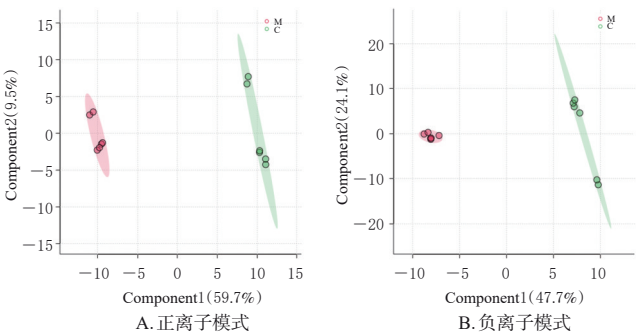
A.正离子模式　　B.负离子模式

M:给药组;C:空白组。

图3　各样本在正、负离子模式下的PCA得分图

3.3 血清差异代谢物的代谢通路分析结果

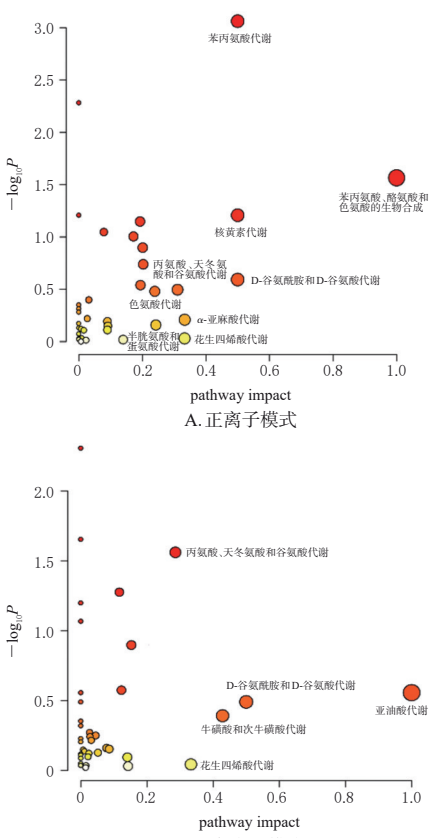
将“3.2”项下鉴定得到的差异代谢物导入MetaboAnalyst 5.0软件,在通路富集分析和拓扑分析的基础上,得到代谢通路富集图(图5)。pathway impact的大小能够反映代谢通路的重要程度,$-\log_{10}P$值被用于评估代谢通路富集分析的显著性。以pathway impact>0.2为筛选标准,发现差异代谢物主要富集在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,亚油酸代谢,苯丙氨酸代谢,核黄素代谢,D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢,牛磺酸和次牛磺酸代谢,α-亚麻酸代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢,色氨酸代谢等11条通路上。



A.正离子模式　　B.负离子模式

M:给药组;C:空白组。

图4　2组血清样品在正、负离子模式下的PLS-DA得分图



A.正离子模式

B.负离子模式

图5　血清差异代谢物的代谢通路富集图

4 讨论

研究表明，三七姜具有一定的抗炎作用，但其相关药效物质基础还未阐明。本研究采用UPLC-Q-Exactive-MS技术，通过与三七姜醇提物对比，从大鼠的尿液、粪便和血清样品中鉴定出21个原型成分及3个代谢产物。其中，从尿液样品中鉴定得到14个原型成分，从粪便样品中鉴定得到9个原型成分，从血清样品中鉴定得到10个原型成分；大部分成分为原型成分，代谢产物较少。笔者推测这可能是因为代谢产物的含量太低、响应值较小，或者是代谢产物的量太少，从而无法检测到。同时，在尿液样品中发现的原型产物和代谢产物数量相对较多，推测三七姜主要通过肾脏代谢排泄。

经统计学分析发现，大鼠给予三七姜醇提物后获得包括去甲亮氨酸、茶碱和甘草素等在内的71个血清差异代谢物，其中阿魏酸、甘草素、异嗪皮啶和刺芒柄花素等差异代谢物的水平较空白组明显上调，花生四烯酸和苯乙酰谷氨酰胺等差异代谢物的水平较空白组明显下调。研究表明，阿魏酸可通过降低白细胞介素1β（interleukin-1β，IL-1β）、IL-6和IL-12等细胞因子的浓度，下调胱天蛋白酶1（caspase-1）、caspase-3、硫氧还蛋白互作蛋白、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3（nucleotide binding oligomerization domain-like receptor pyrin domain containing protein 3，NLRP3）等蛋白的表达，上调B淋巴细胞瘤-2蛋白的表达，进而改善人肠微血管内皮细胞的炎症损伤[9]。甘草素可通过抑制核转录因子κB和NLRP3炎症小体信号通路，减轻高糖介导的炎症；并可通过促进环磷酸腺苷的产生，减轻树突状细胞的炎症[10-11]。异嗪皮啶可通过激活核因子E2相关因子2信号通路，降低细胞内产生的活性氧化物质水平，减轻葡聚糖硫酸钠所诱导的溃疡性结肠炎[12]。刺芒柄花素可通过降低IL-6、肿瘤坏死因子α、IL-1β和NLRP3的表达水平以及角膜上皮细胞中烟曲霉诱导的活性氧水平，进而缓解小鼠烟曲霉角膜炎[13]。因此，本研究初步推断阿魏酸、甘草素、异嗪皮啶和刺芒柄花素等成分可能是三七姜直接发挥抗炎药效作用的物质基础。

通过代谢通路分析发现，三七姜血清差异代谢物主要富集在包括花生四烯酸代谢、色氨酸代谢等在内的11条代谢通路上。花生四烯酸是一种二十碳不饱和脂肪酸，当细胞受到刺激后，细胞膜的磷脂酶被激活，裂解膜磷脂，释放出花生四烯酸，后者经环加氧酶和脂质加氧酶作用生成前列腺素和白三烯等炎症介质，从而导致炎症反应发生[14]。色氨酸是一种必需氨基酸，其对减轻炎症、改善睡眠、调节情绪有很好的作用，且其还是唯一与白蛋白结合运输的氨基酸[15]。Islam等[16]研究表明，色氨酸可以改善葡聚糖硫酸钠诱发的急性结肠炎。因此，笔者认为三七姜回调血清中的花生四烯酸、色氨酸水平可能与其抗炎作用相关。

综上所述，阿魏酸、甘草素、异嗪皮啶和刺芒柄花素等成分可能是三七姜直接发挥抗炎药效作用的物质基础，三七姜可能是通过调节花生四烯酸代谢、色氨酸代谢等通路发挥的抗炎作用。然而，在正常状态和病理状态下，大鼠对药物的吸收可能不同，本研究仍需进行三七姜在病理状态大鼠中的代谢组学研究，并进行体外细胞实验验证，以进一步明确三七姜发挥抗炎作用的药效物质。

参考文献

[1] 广西壮族自治区食品药品监督管理局. 广西壮族自治区壮药质量标准：第二卷：2011年版[M]. 南宁：广西科学技术出版社，2011：12.
Guangxi Zhuang Autonomous Region Food and Drug Administration. Guangxi Zhuang Autonomous Region Zhuang medicine quality standards: volume 2: 2011 edition [M]. Nanning: Guangxi Science and Technology Press, 2011: 12.

[2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志：第四十六卷[M]. 北京：科学出版社，1981：44.
Editorial Committee of the Flora of China, Chinese Academy of Sciences. Flora of China: volume 46[M]. Beijing: Science Press, 1981: 44.

[3] 谢珍珍，杨颖欣，梁洁，等. 壮药姜叶三七的化学成分鉴别研究[J]. 广西中医药大学学报，2015，18(3)：49-51.
XIE Z Z, YANG Y X, LIANG J, et al. Identification of chemical constituents of Zhuang medicine *Stahlianthus involucratus*[J]. J Guangxi Univ Chin Med, 2015, 18(3): 49-51.

[4] 曾立威，唐春燕，徐勤. 三七姜挥发油成分的GC-MS分析与体外抗肿瘤活性研究[J]. 华夏医学，2017，30(4)：33-38.
ZENG L W, TANG C Y, XU Q. GC-MS analysis of components of essential oil of *Stahlianthus involucratus* and its *in vitro* antitumor activity[J]. Acta Med Sin, 2017, 30(4): 33-38.

[5] LI W K, WU B M, WANG Y G, et al. The potential antioxidant activity and characterization of bioactive compounds of *Stahlianthus involucratus*[J]. Biomed Res Int, 2021, 2021: 9490162.

[6] 陈成，刘毅，许汉林. 土田七醇提物抑制肝癌细胞增殖活性部位筛选及其对肝癌细胞侵袭迁移的影响[J]. 湖南中

医药大学学报，2022，42(6)：930-933.
CHEN C，LIU Y，XU H L. Screening of active fractions from the alcohol extract of *Stahlianthus involucratus* and its effect on invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. J Hunan Univ Chin Med，2022，42(6)：930-933.

[7] 陈成，李锦周，刘毅，等. 土田七醇提物对实验性糖尿病小鼠血糖、血脂的影响及安全性研究[J]. 湖北中医药大学学报，2022，24(3)：5-8.
CHEN C，LI J Z，LIU Y，et al. Effects of ethanolic extract from *Stahlianthus involucratus* serum glucose and lipids of experimental diabetic mice and its safety evaluation[J]. J Hubei Univ Chin Med，2022，24(3)：5-8.

[8] 刘新燕，王羽，尚峰，等. 基于Nrf2/ARE信号通路研究姜叶三七挥发油对氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 环球中医药，2022，15(4)：566-576.
LIU X Y，WANG Y，SHANG F，et al. The protective effect of essential oil of rhizome from *Stahlianthus involucratus* on ox-LDL-induced HUVECs damage based on Nrf2/ARE signaling pathway[J]. Glob Tradit Chin Med，2022，15(4)：566-576.

[9] 余胜. 基于TXNIP/NLRP3通路对透脓散及其单体阿魏酸抑制溃疡性结肠炎的实验和临床研究[D]. 南京：南京中医药大学，2022.
YU S. Experimental and clinical study on the inhibition of ulcerative colitis by Tounong san and its monomer ferulic acid based on TXNIP/NLRP3 pathway[D]. Nanjing：Nanjing University of Chinese Medicine，2022.

[10] ZHU X G，SHI J，LI H C. Liquiritigenin attenuates high glucose-induced mesangial matrix accumulation，oxidative stress，and inflammation by suppression of the NF-κB and NLRP3 inflammasome pathways[J]. Biomed Pharmacother，2018，106：976-982.

[11] QIN M M，GUO A L，LI F，et al. Liquiritigenin enhances cyclic adenosine monophosphate production to mitigate inflammation in dendritic cells[J]. Int J Immunopathol Pharmacol，2021，35：20587384211038098.

[12] HE S，ZHANG T，WANG Y Y，et al. Isofraxidin attenuates dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis through inhibiting pyroptosis by upregulating Nrf2 and reducing reactive oxidative species[J]. Int Immunopharmacol，2024，128：111570.

[13] FENG Z H，GU L W，LIN J，et al. Formononetin protects against *Aspergillus fumigatus* keratitis：targeting inflammation and fungal load[J]. Int Immunopharmacol，2024，132：112046.

[14] KIKUT J，KOMORNIAK N，ZIĘTEK M，et al. Inflammation with the participation of arachidonic（AA）and linoleic acid（LA）derivatives（HETEs and HODEs）is necessary in the course of a normal reproductive cycle and pregnancy[J]. J Reprod Immunol，2020，141：103177.

[15] CERVENKA I，AGUDELO L Z，RUAS J L. Kynurenines：tryptophan's metabolites in exercise，inflammation，and mental health[J]. Science，2017，357(6349)：eaaf9794.

[16] ISLAM J，SATO S，WATANABE K，et al. Dietary tryptophan alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis through aryl hydrocarbon receptor in mice[J]. 2017，42：43-50.

（收稿日期：2024-04-05　修回日期：2024-08-12）
（编辑：林　静）