

鸦胆子苷B与肠道菌群相互作用及对人肺癌A549细胞的抑制作用

石凌钰¹, 王文敏¹, 冯育林^{1,2}, 杨世林¹, 万阳¹, 陈道峰^{3*}, 温泉^{1*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330006;

2. 江西中医药大学创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 南昌 330006;

3. 复旦大学药学院, 上海 201203)

[摘要] 目的:分析鸦胆子苷B和肠道菌群相互作用,以及其代谢产物对人肺癌A549细胞的抑制活性,探讨鸦胆子苷B对非小细胞肺癌(NSCLC)治疗的价值。方法:采用肠道菌群体外温孵培养法,将鸦胆子苷B与人肠道菌群体外共孵育,通过超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)分析代谢转化产物。采用细胞增殖与活性检测法(CCK-8法)检测原型物鸦胆子苷B及其代谢产物对人肺癌A549细胞增殖的影响并计算半数抑制浓度(IC₅₀)。取健康雄性大鼠5只,经灌胃给药鸦胆子苷B药液(2 mg·kg⁻¹),连续7 d,分别采集大鼠给药前和给药后的粪便,基于16S rRNA高通量测序分析鸦胆子苷B给药前后肠道菌群变化。结果:鸦胆子苷B可被人肠道菌群经脱糖基水解代谢为鸦胆子苦醇,原型物和转化产物对A549细胞的IC₅₀分别为1 755.50、19.57 μmol·L⁻¹,代谢产物对A549细胞增殖的抑制活性显著优于鸦胆子苷B。肠道菌群分析结果显示,与给药前比较,给药后大鼠肠道菌群α多样性和β多样性未发生明显变化。物种丰度方面,门水平上,鸦胆子苷B降低了放线菌门、变形菌门的物种相对丰度,增加了厚壁菌门、髌骨菌门、蓝细菌门的物种相对丰度;属水平上,鸦胆子苷B降低了葡萄球菌属、气球菌属、嗜冷菌属的物种相对丰度,增加了罗姆布茨菌属、乳杆菌属、狭义梭菌属1、*Norank-f-norank-o-Clostridia*-UCG-014、苏黎世杆菌属、异杆菌属、糖杆菌念珠菌属的物种相对丰度。功能预测结果显示,与给药前比较,给药后大鼠肠道功能均未发生显著变化。结论:鸦胆子苷B可在肠道菌群作用下脱糖基,转化为苷元鸦胆子苦醇,抗肿瘤活性显著提高。服用鸦胆子苷B不会使肠道菌群结构和功能发生显著变化,造成肠道微生态平衡失调,且给药鸦胆子苷B后出现对NSCLC患者有益的肠道菌群变化。

[关键词] 鸦胆子; 鸦胆子苷B; 鸦胆子苦醇; 肠道菌群; 代谢转化; 人肺癌A549细胞; 非小细胞肺癌(NSCLC); 16S rRNA高通量测序

[中图分类号] R22;R256.1;R28;R969.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2024)13-0160-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240767 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240228.1618.004>

[网络出版日期] 2024-02-29 09:27:43

Interaction Between Bruceoside B and Intestinal Flora and Its Inhibitory Effect on Human Lung Cancer A549 Cells

SHI Lingyu¹, WANG Wenmin¹, FENG Yulin^{1,2}, YANG Shilin¹, WAN Yang¹,

CHEN Daofeng^{3*}, WEN Quan^{1*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

2. State Key Laboratory of Innovation Drug and Efficient Energy-saving Pharmaceutical Equipment, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China;

3. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China)

[收稿日期] 2023-12-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860684);江西省教育厅项目(GJJ190689);江西省自然科学基金项目(20212ACB206007)

[第一作者] 石凌钰,在读硕士,从事中药活性物质研究,E-mail:1163298708@qq.com

[通信作者] * 陈道峰,博士,教授,从事中药活性物质研究,Tel:0791-87119633,E-mail:dfchen@shmu.edu.cn;

* 温泉,博士,副教授,从事中药活性物质研究,E-mail:qwen12@fudan.edu.cn

[Abstract] Objective: To explore the interaction between bruceoside B and gut microbiota and the inhibitory activity of its metabolites on human lung cancer A549 cells, and to explore the value of bruceoside B in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Method:** Bruceoside B was co-incubated with the human gut microbiota under anoxic conditions *in vitro*, and ultra high performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS) was used to analyze the metabolic transformation products. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was performed to determine the effects of bruceoside B and its metabolites on the proliferation of human lung cancer A549 cells and the half inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated. Five healthy male rats were gavaged with bruceoside B ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) for 7 days after adaptive feeding. The feces of rats were collected before and after administration. 16S rRNA sequencing was used to assess gut microbiota. **Result:** Bruceoside B was mainly metabolized to brusatol by human gut microbiota, the IC_{50} of bruceoside B and the conversion product to A549 cells were $1\ 755.50$, $19.57 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, and the conversion product had a better activity at inhibiting A549 cells proliferation than bruceoside B. Additionally, The results of intestinal flora analysis showed no significant differences in α diversity and β diversity of gut microbiota after administration. In terms of species abundance, at the phylum level, bruceoside B decreased the relative abundance of Actinobacteriota and Proteobacteria, increased the relative abundance of Firmicutes, Patescibacteria and Cyanobacteria. At the genus level, bruceoside B decreased the relative abundance of *Staphylococcus*, *Aerococcus* and *Psychrobacter*, increased the relative abundance of *Romboutsia*, *Lactobacillus*, *Clostridium sensu stricto 1*, *Norank-f-norank-o-Clostridia-UCG-014*, *Turcibacter*, *Allobaculum* and *Candidatus Saccharimonas*. The results of functional prediction showed that the gut microbiota functional compositions were relatively stable. **Conclusion:** Bruceoside B can be deglycosylated by intestinal flora and converted into brusatol, with a significant increase in antitumor activity. The administration of bruceoside B will not cause significant changes in the structure and function of the intestinal flora, resulting in intestinal microecological balance disorders, and the administration appears to be beneficial to the intestinal flora of NSCLC patients.

[Keywords] *Brucea javanica*; bruceoside B; brusatol; intestinal flora; metabolic transformation; human lung cancer A549 cells; non-small cell lung cancer (NSCLC); 16S rRNA high-throughput sequencing

鸦胆子是苦木科植物鸦胆子 *Brucea javanica* 的干燥成熟果实,具有清热解毒、截疟、止痢、外用腐蚀赘疣的功效^[1]。苦木素为其特征成分,对非小细胞肺癌 (NSCLC) 等多种肿瘤具有显著药理活性^[2-4]。NSCLC 是肺癌中的主要类型,占肺癌发病率的 85%^[5]。目前治疗 NSCLC 的方法主要为化疗,但 NSCLC 对化疗药物敏感性较低,治疗效果不甚理想^[6-7]。因此,寻找新的有效药物具有现实意义。

中药多为口服给药,因此不可避免地与肠道菌群接触。这些微生物可分泌多种活性酶,影响药物代谢,使药物活性和毒性发生变化^[8]。研究发现,在肠道菌群作用下中药中糖苷类化合物会发生脱糖水解反应,生成次级苷或苷元从而发挥生物学活性。如人参皂苷 Rb_1 可以在肠道菌群作用下脱糖基转化为次级苷人参皂苷 F_2 、人参皂苷 C-K 和苷元 20 (S)-原人参二醇 (PPD) 等^[9-10]。NIU 等^[11] 发现人参皂苷 F_2 、C-K 具有显著抗肺癌 LM1 细胞增殖作用,

而人参皂苷 Rb_1 不具有;JIN 等^[12] 同样发现 PPD 和人参皂苷 C-K 能够显著抑制人肺癌 A549 细胞的增殖活性。此外,毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷可在肠道菌群作用下转化为苷元,后者经肝脏葡萄糖醛酸化生成 3'-葡萄糖醛酸苷进入体循环发挥促血管新生作用,而原型物不能在肝脏中发生该反应^[13-14]。

鸦胆子苷是鸦胆子苦木素中的一大类化合物,约占目前发现的鸦胆子中苦木素类化合物的 1/3^[15],但目前关于鸦胆子苷类化合物的研究较少,研究鸦胆子苷类化合物有助于充分发挥鸦胆子价值。本课题组在前期研究中从鸦胆子中分离得到鸦胆子苷 B,通过结构分析发现鸦胆子苷 B 苷元为具有显著抗肿瘤活性的鸦胆子苦醇,且经分析药材中鸦胆子苷 B 的含量为鸦胆子苦醇的 31.67%^[16]。为进一步挖掘鸦胆子苷 B 的价值,本研究拟采用体外温孵法研究肠道菌群对鸦胆子苷 B 的代谢作用,超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法

(UPLC-Q-TOF-MS)分析转化产物,并运用细胞增殖与活性检测法(CCK-8法)比较转化前后化合物对人肺癌A549细胞的抑制活性。药物的使用影响肠道菌群,有些药物使肠道菌群产生的变化可以起到治疗疾病的作用^[17];有些则会引起肠道菌群紊乱,影响身体健康^[18]。因此本研究采用16S rRNA高通量测序技术分析鸦胆子苷B对健康大鼠肠道菌群的影响,为鸦胆子苷B的研究开发提供参考。

1 材料

Triple TOF 5600型高分辨质谱仪(美国Sciex公司),MGC-250HP-2L型人工气候培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),HC-3018R型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司),LMQ.C型立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司),BS224S型万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),JW-3401型CO₂培养箱(江西省立康科技有限公司),Infinite M200PRO型酶标仪(瑞士Tecan公司),ABI GeneAmp[®]9700型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司),DYY-6C型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

鸦胆子于2019年采收自广西省,由江西中医药大学钟国跃教授鉴定为苦木科鸦胆子属植物鸦胆子*B. javanica*的成熟果实,标本(YD20191107)保存于江西中医药大学中药固体制剂制造技术国家工程研究中心。鸦胆子苷B及鸦胆子苦醇由本实验室分离制得,纯度均>90%。

人肺癌A549细胞株(上海富衡生物科技有限公司,货号FH0045),CCK-8检测试剂盒(大连美伦生物技术有限公司,批号MA0218),胎牛血清(以色列Biological Industries公司,批号F2442),DMEM高糖培养基、磷酸缓冲盐溶液(PBS)、乙二胺四乙酸(EDTA)-胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20211014、20210922、20211019),厌氧培养袋、厌氧产气包(日本三菱瓦斯化学株式会社,批号分别为C-43、C-1),乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

SPF级雄性SD大鼠5只,体质量(200±10)g,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0019。动物实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会批准,批号JZLLSC20220337。

2 方法

2.1 鸦胆子苷B的肠道菌群转化分析

2.1.1 鸦胆子苦醇对照品溶液的制备

精密称取 5 mg,置于 5 mL 量瓶,甲醇定容备用。

2.1.2 普通厌氧培养基(GAM)的制备 称取豚豚 10.0 g、大豆胨 3.0 g、酵母浸粉 5.0 g、牛肉粉 2.2 g、消化血清粉 13.5 g、牛肝浸粉 1.2 g、葡萄糖 3.0 g、氯化钠 3.0 g、可溶性淀粉 5.0 g、L-半胱氨酸 0.3 g、磷酸二氢钾 2.5 g、硫乙醇酸钠 0.3 g 和氯化血红素 6.0 μg,加入适量蒸馏水加热溶解,量取维生素 K 1.0 μL 加入混合,加入蒸馏水至 1 000 mL,趁热过滤除去不溶物。将培养基分装于具塞锥形瓶,牛皮纸封口,121 °C 高温高压灭菌 0.5 h,自然冷却后即得。

2.1.3 人肠道菌群的采集与制备 收集 3 名健康青年志愿者(3 个月内未服用任何药物和益生菌)新鲜粪便于充满氮气的自封袋,挤压使粪便均质化。以 1 g:25 mL 比例将新鲜粪便与 GAM 培养基混合,震荡摇匀,4 层纱布过滤得肠道菌群悬液,置于厌氧袋,加入厌氧产气包保证厌氧环境,37 °C 培养 24 h。取菌液 0.5 mL 接种于装有 GAM 培养基 9.5 mL 的试管中,37 °C 厌氧培养 24 h,即得人肠道混合菌丛,4 °C 冰箱保存备用。从人肠道混合菌丛中取出菌液 0.5 mL,接种于装有 GAM 培养基 9.5 mL 的试管中,37 °C 厌氧培养 24 h,分别在 0、1、2、3、4、5、7、9、12、24 h 取样,监测肠道菌群增殖情况^[19]。

2.1.4 鸦胆子苷B的人肠道菌群转化样品的制备

分别设置实验组(药物+人肠道菌液)、对照组(药物+不含肠道菌群的GAM培养基)和空白组(只含人肠道菌液),每组3个平行。向实验组和对照组分别加入鸦胆子苷B,使鸦胆子苷B的质量浓度为0.1 g·L⁻¹,37 °C 厌氧环境培养 24 h。分别于转化进行 0、6、24 h 时取反应液 2.0 mL 于无菌离心管,迅速放于-40 °C 冰箱终止转化。采用液-液萃取法对样品进行前处理,使用等量水饱和正丁醇溶剂萃取 3 次,60 °C 减压蒸干,残留物以甲醇 1.0 mL 溶解,4 °C、14 000 r·min⁻¹ 离心 15 min(离心半径 10 cm),上清液过 0.22 μm 微孔滤膜,用于 UPLC-Q-TOF-MS 分析。

2.1.5 转化产物检测 色谱条件,采用 HALO 90Å C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,2.7 μm),柱温 40 °C,流速 0.3 mL·min⁻¹,进样量 3 μL,流动相 0.1% 甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~20 min,5%~95%B;20~25 min,95%~5%B;25~28 min,5%B)。质谱条件,采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式检测,离子化温度 550 °C,气帘气压力 25 psi(1 psi≈6.895 kPa),雾化气压力 50 psi,辅助加热(N₂)50 psi,喷雾电压 5.5 kV,锥孔电压 100 V,碰撞能量 70 eV,质量扫描范围 *m/z* 50~1 250。取 2.1.4 项下制备样

品,以及2.1.1项下鸦胆子苦醇对照品溶液,按上述检测条件进样分析。

2.2 CCK-8法检测A549细胞的存活率 A549细胞培养于含10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和100 U·mL⁻¹链霉素的DMEM培养基中,于37℃、5%CO₂条件下培养,细胞生长至培养皿面积的80%左右时,用EDTA-胰蛋白酶消化传代。收集对数生长期A549细胞稀释为细胞悬液,以5×10⁴个/孔接种于96孔板,置于培养箱中培养24 h。待细胞完全贴壁后,PBS冲洗,设置基培组(无细胞)、空白组、鸦胆子苷B组及鸦胆子苦醇组,每组设5个复孔,给药组分别加入不同浓度培养基溶解的鸦胆子苷B和鸦胆子苦醇,继续培养24 h后,吸弃孔内培养液,每孔加入10% CCK-8溶液100 μL,培养箱孵育2 h,酶标仪450 nm处测定各孔吸光度A,计算二者对A549细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 16S rRNA肠道菌群分析

2.3.1 动物给药及粪便样本采集 5只SD大鼠适应性饲养1周后,每只大鼠分别采集粪便2粒于无菌离心管,置于-80℃冰箱保存,为给药前样本;用蒸馏水配制质量浓度为2 g·L⁻¹的鸦胆子苷B药液,每天同时间按2 mg·kg⁻¹灌胃鸦胆子苷B药液,药液经37℃水浴加热,连续7 d,末次给药后,次日以采集给药后大鼠粪便,为给药后样本。

2.3.2 16S rRNA法测序 按照DNA抽提试剂盒说明书提取粪便菌群DNA;使用上游引物338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3',长度19 bp)和下游引物806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3',长度20 bp)对V3~V4区域进行PCR扩增,扩增程序为95℃预变性3 min,95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共27个循环,72℃延伸10 min,4℃保存,2%琼脂糖凝胶电泳回收PCR产物,使用NEXTFLEX® Rapid DNA-Seq Kit对PCR产物进行建库,PCR扩增产物汇集到Illumina MiSeq PE300平台进行高通量测序。大鼠粪便菌群的16S rRNA测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

2.3.3 生物信息学分析 通过美吉生物信息云(<https://cloud.majorbio.com/>)对16S rRNA测序数据进行处理。UParse 11软件进行操作分类单元(OTU)聚类分析;基于Silva数据库(Release138)采用Qiime 1.9.1平台进行分类学分析,得到物种分类信息;利用mothur 1.30.2计算α多样性指数和稀释曲线;通过R语言(version 3.3.1)分析β多样性;线性判别分析(LEfSe)软件([\[harvard.edu/galaxy/root?tool_id=lefse_upload\]\(http://harvard.edu/galaxy/root?tool_id=lefse_upload\)\)分析样本划分产生显著差异的群落或物种;基于COG数据库\(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>\),通过PICRUST2 2.2.0进行肠道菌群功能预测。](http://huttenhower.sph.</p></div><div data-bbox=)

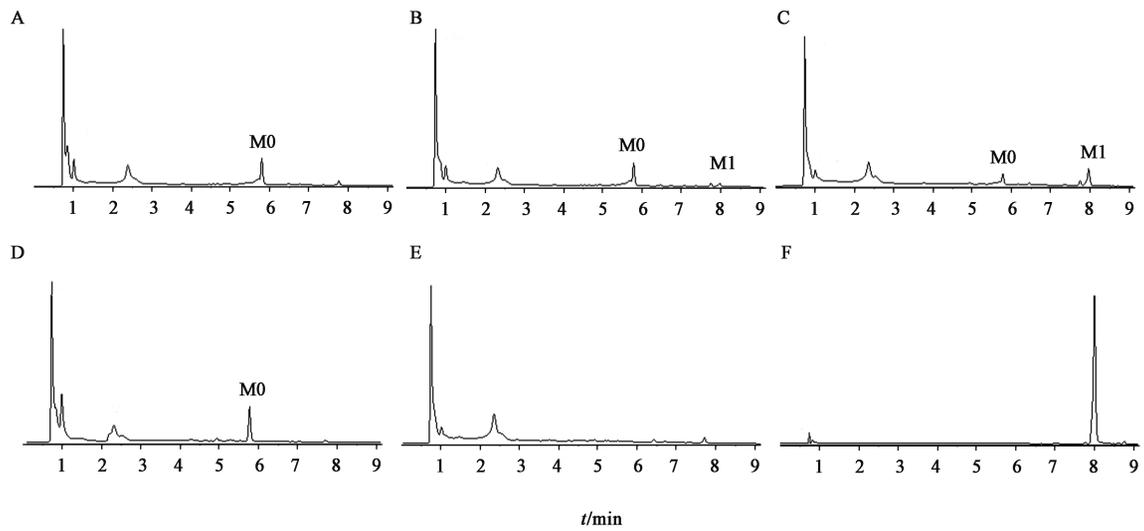
2.4 统计学分析 采用SPSS 26.0统计软件分析结果,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用配对t检验,以P<0.05认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 鸦胆子苷B的肠道菌群转化分析 将实验组与空白组、对照组进行比较,根据UPLC色谱图及质谱数据鉴别转化产物。其中化合物M0,在对照组和实验组被检测到,准分子离子峰为m/z 705.235 9 [M+Na]⁺,分子式为C₃₂H₄₂O₁₆,主要碎片离子包括m/z 605.183 3 [M+Na-C₅H₈O₂]⁺、m/z 543.182 9 [M+Na-Glu]⁺、m/z 461.141 0 [M+Na-Glu-C₅H₆O]⁺、m/z 443.130 6 [M+Na-Glu-C₅H₈O₂]⁺、m/z 185.041 56 [M+Na-Glu-C₂₀H₂₂O₆]⁺,确定为鸦胆子苷B。代谢产物M1与鸦胆子苦醇对照品保留时间一致,其准分子离子峰为m/z 543.183 4 [M+Na]⁺,分子式为C₂₆H₃₂O₁₁,比化合物M0减少162 Da,主要碎片离子包括m/z 461.141 7 [M+Na-C₅H₆O]⁺、m/z 443.133 0 [M+Na-C₅H₈O₂]⁺、m/z 165.069 4 [M+Na-C₁₉H₂₂O₈]⁺、m/z 83.049 4 [M+Na-C₂₄H₂₈O₉]⁺,推测M1为M0失去一分子葡萄糖的产物,结合对照品,鉴定为鸦胆子苦醇。色谱图见图1。

3.2 鸦胆子苷B与鸦胆子苦醇对A549细胞的增殖抑制活性比较 CCK-8结果显示,鸦胆子苷B和鸦胆子苦醇对A549细胞的IC₅₀分别为1 755.50、19.57 μmol·L⁻¹,鸦胆子苷脱葡萄糖后对A549细胞的增殖抑制能力明显提高,约为鸦胆子苷B的89.7倍。

3.3 α多样性分析 通过Illumina Miseq测序去噪,按97%相似性进行聚类,共得到199条操作分类单元(OTU),其中共有OTU 192条。以sobs指数计算测序稀释性曲线,结果显示,随测序量增加,曲线趋于平坦,表明测序深度充分。见增强出版附加材料。α多样性反映大鼠肠道菌群的多样性和丰富度,Shannon和Simpson指数用于评价群落分布多样性,Ace和Chao1指数用于评价群落分布丰富度。与给药前比较,给药后大鼠肠道菌群Shannon指数下降Simpson指数上升,大鼠肠道菌群多样性下降,但差异无统计学意义;丰富度指数Ace和Chao1均上升,大鼠肠道菌群丰富度增加,但也均无统计学意义。说明鸦胆子苷B对大鼠肠道菌群总体的多样性和丰富度无明显影响,见表1。



注:A.实验组0 h;B.实验组6 h;C.实验组24 h;D.对照组24 h;E.空白组24 h;F.鸦胆子苦醇对照品

图1 鸦胆子苷B经人肠道菌群转化的UPLC

Fig. 1 UPLC of biotransformation of bruceoside B by human gut microbiota

表1 鸦胆子苷B对肠道菌群 α 多样性指数影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Effect of bruceoside B on α diversity index of gut microbiota ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	多样性指数		丰富度指数	
	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao1 指数
给药前	2.80±0.28	0.12±0.01	160.48±11.31	163.45±12.30
给药后	2.56±0.46	0.15±0.06	167.15±12.61	168.15±13.77

3.4 β 多样性分析 β 多样性反映了样本间群落组成的相似性和差异性。采用主坐标分析(PCoA)考察大鼠肠道菌群 β 多样性的差异,第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)分别解释了总变量的36.51%和21.35%,结果显示大鼠口服鸦胆子苷B对肠道菌群结构有影响,各分组有区分,但差异无统计学意义,表明鸦胆子苷B没有明显改变大鼠肠道菌群的总体结构,见增强出版附加材料。

3.5 物种组成分析与差异性分析 门水平上,以丰度占比排序,给药前后大鼠肠道菌群组成相似,主要为厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteriota)、变形菌门(Proteobacteria)、酸杆菌门(Patescibacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)。胆甙B给药后厚壁菌门、酸杆菌门、蓝细菌门丰度有所上升,放线菌门、变形菌门丰度有所下降。属水平上,大鼠肠道菌群组成主要为罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、狭义梭菌属1(*Clostridium sensu stricto* 1)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、气球菌属(*Aerococcus*)、*Norank-f-norank-o-Clostridia*-UCG-014、苏黎世杆菌属(*Turicibacter*)、异杆菌属(*Allobaculum*)、嗜冷菌属

(*Psychrobacter*)、糖杆菌念珠菌属(*Candidatus Saccharimonas*)。给药后乳杆菌属、罗姆布茨菌属、狭义梭菌属1、*norank-f-norank-o-Clostridia*-UCG-014、苏黎世杆菌属、异杆菌属、糖杆菌念珠菌属丰度上升;葡萄球菌属、气球菌属、嗜冷菌属的丰度下降。见增强出版附加材料。

3.6 大鼠肠道菌群物种差异分析 采用wilcoxon秩和检验分析给药前后大鼠肠道菌群属水平差异菌属,对比发现,给药后大鼠肠道中葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、库特氏菌属(*Kurthia*)、耐盐咸海球菌属(*Jeotgalicoccus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、*Unclassified-f-Oscillospiraceae*明显减少($P<0.05$)*Jeotgalibaca*($P<0.01$)显著减少,普雷沃氏菌属UCG-003(*Prevotellaceae*-UCG-003)明显增加($P<0.05$),见增强出版附加材料。LEfSe分析以LDA>2作为筛选标准,结果显示,给药前后在5目8科11属的相对丰度有明显差异。在属水平上,给药前的生物标志物为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、*Lachnospiraceae*-UCG-006、库特氏菌属(*Kurthia*)、*Jeotgalibaca*、*Jeotgalicoccus*、肠球菌属(*Enterococcus*)、*unclassified-f-Oscillospiraceae*,给药后的生物标志物为罗姆布茨菌属(*Romboutsia*)、*norank-f-norank-o-Clostridia*-UCG-014、普雷沃氏菌属UCG-003(*Prevotellaceae* UCG-003),见增强出版附加材料。

3.7 大鼠肠道菌群功能预测分析 与给药前比较,在丰度排行前10的信号通路中,给药后相对丰度上升的有核苷酸转运代谢,碳水化合物转运代谢,翻

译、核糖体结构和生物合成,转录,复制、重组和修复,细胞壁/膜/被膜的生物合成;相对丰度下降的为能量生成和转换,氨基酸转运代谢,辅酶转运和代谢,无机离子转运代谢。但差异均无统计学意义,表明鸦胆子苷B对大鼠肠道菌群功能无明显影响。见增强出版附加材料。

4 讨论

研究发现中药中有些化学成分尤其葡糖苷类化合物能够经肠道菌群代谢产生具有较强药理活性的产物^[20]。这类前体活性较小,但经肠菌代谢生成苷元从而具有良好药理活性的化合物被称为“天然前体药物”。经结构分析发现鸦胆子苷B为鸦胆子苦醇连接一个葡萄糖形成,研究表明鸦胆子苦醇可以通过多条信号通路表现出良好的抗肿瘤活性^[21]。本研究通过体外温孵法证实鸦胆子苷B能否在肠菌作用下发生脱糖基反应,转化为活性更强的鸦胆子苦醇。结果显示,肠道菌群活化24 h后数量基本稳定,可以模拟稳定的肠内菌群,更好反映化合物在稳定肠内环境下的代谢情况。代谢产物经UPLC-Q-TOF-MS检测,确定鸦胆子苷B在人肠道菌群作用下发生脱糖基水解反应,生成苷元鸦胆子苦醇,实验进行24 h后主要产物仍为苷元,说明苷元较为稳定,不易被肠道菌群进一步代谢。鸦胆子苦醇表现出显著的体外抗人肺癌A549细胞增殖活性,约为其前体化合物鸦胆子苦醇的89.7倍,数据表明鸦胆子苷B能够经肠道菌群代谢为具有广谱抗肿瘤活性的鸦胆子苦醇^[22],具有抗肿瘤药物潜力。

有些药物的使用会对肠道菌群的组成产生负面影响^[23],从而引起肠道微生态平衡失调。失衡的肠道菌群通过有害代谢物,全身炎症等多种机制危害寄主健康,加剧疾病进程^[24]。为了解鸦胆子苷B对肠道菌群的影响,探讨菌群变化对NSCLC患者的作用,本研究通过16S rRNA法分析大鼠连续灌胃鸦胆子苷B后的肠道菌群变化。 α 多样性和 β 多样性数据显示给药后大鼠肠道菌群多样性和丰富度,群落相似性和差异性均未发生显著变化;高丰度变形菌门被认为是肠道菌群失调的微生物标志物^[25],本研究数据显示灌胃给药鸦胆子苷B能降低大鼠变形菌门丰度。此外,大鼠肠道菌群功能未受鸦胆子苷B的显著影响。因此,推测连续灌胃给药鸦胆子苷B不会引起大鼠肠道菌群结构和功能的显著变化,造成微生态平衡失调。

肠道菌群丰度的变化与癌症的发生发展密切

相关^[26]。一项关于NSCLC患者肠道菌群的研究发现 *norank-f-norank-o-Clostridia*-UCG-014 低丰度患者死亡风险更高^[27],另有研究报道肺癌患者放线菌门丰度下降^[28],在本研究中给药鸦胆子苷B后大鼠肠道菌群 *norank-f-norank-o-Clostridia*-UCG-014 和放线菌门丰度上升,推测鸦胆子苷B有助于降低患者死亡风险,恢复放线菌门菌群数量。厚壁菌门中含有许多产丁酸细菌,产丁酸菌可以提高癌症患者抗肿瘤能力^[29],NSCLC患者肠道中存在产丁酸菌减少的现象^[30],本研究发现大鼠灌胃鸦胆子苷B后厚壁菌门丰度占比上升,推测口服鸦胆子苷B可能对NSCLC患者产丁酸菌数量增加有一定作用。变形菌门包括许多致病微生物,肠道中的致病菌可以产生内毒素引起炎症反应^[31-32],研究发现NSCLC患者肠道变形菌门丰度上升^[33],本研究数据显示给药鸦胆子苷B后大鼠肠道菌群变形菌门丰度下降,此外,给药鸦胆子苷B还可以降低葡萄球菌属等致病菌的丰度。综上,给药鸦胆子苷B后出现部分对NSCLC患者有益菌的增加,以及部分有害菌的减少。

本次实验通过体外实验,初步研究肠道菌群对鸦胆子苷B的代谢转化,但体外培养肠道菌群易受环境影响,后续将通过正常动物与无菌动物体内对比实验,进一步探究药物与菌群的相互作用。此外,在研究鸦胆子苷B对肠道菌群的作用时,以健康大鼠为实验对象,结果发现鸦胆子苷B不会造成健康大鼠肠道微生态平衡紊乱,并且可以提高对NSCLC患者有益菌的相对丰度,后续实验将通过NSCLC动物模型,进一步探究鸦胆子苷B引起的菌群变化与NSCLC的关系。综上,鸦胆子苷B可以经肠道菌群作用转化为苷元鸦胆子苦醇,抑制人肺癌A549细胞增殖活性显著提高;同时,连续给药鸦胆子苷B不会破坏健康大鼠肠道微生态平衡,并且出现对NSCLC患者有益菌丰度提高,可为鸦胆子苷B的开发利用提供参考。

[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,2020:399.
- [2] 傅丽霞,黄崇刚,林明宝,等. 鸦胆子苦木内酯类成分及其药理活性研究进展[J]. 中国药理学通报,2016,32(11):1481-1486.
- [3] 黄晓伟,李森,胡兵. 鸦胆子抗肿瘤作用机制研究进展[J]. 上海中医药杂志,2019,53(1):111-113.
- [4] 郭琪,孙薇,王力玄,等. 鸦胆子中苦木素类化学成分

- 及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2021, 52(20): 6431-6441.
- [5] GRIDELLI C, ROSSI A, CARBONE D P, et al. Non-small-cell lung cancer[J]. Nat Rev Dis Primers, 2015, 1: 15009.
- [6] 焦建玮, 白玉杰, 白玉莲, 等. 葶苈大枣泻肺汤通过 Caspase-1 诱导 A549 细胞焦亡与凋亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 54-61.
- [7] 吴心语, 李和根, 廉杰, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路在六君子汤含药血清诱导人肺癌细胞 A549 氧化损伤中作用研究[J]. 中药材, 2022, 45(9): 2223-2227.
- [8] SOUSA T, PATERSON R, MOORE V, et al. The gastrointestinal microbiota as a site for the biotransformation of drugs[J]. Int J Pharm, 2008, 363(1/2): 1-25.
- [9] 李寒冰, 董贝贝, 吴宿慧, 等. 人参与大鼠及人源肠道菌相互作用的差异研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 3113-3118.
- [10] 钱静, 康安, 狄留庆, 等. 人参皂苷 Rb₁ 在体外肠道菌群模型中的代谢研究[J]. 南京中医药大学学报, 2015, 31(6): 567-570.
- [11] NIU T, SMITH D L, YANG Z, et al. Bioactivity and bioavailability of ginsenosides are dependent on the glycosidase activities of the A/J mouse intestinal microbiome defined by pyrosequencing [J]. Pharm Res, 2013, 30(3): 836-846.
- [12] JIN Y, JUNG S Y, KIM Y J, et al. Microbial deglycosylation and ketonization of ginsenoside by *Cladosporium cladosporioides* and their anticancer activity [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2016, 109(2): 179-185.
- [13] RUAN J Q, YAN R. Regioselective glucuronidation of the isoflavone calycosin by human liver microsomes and recombinant human UDP-glucuronosyltransferases [J]. Chem Biol Interact, 2014, 220: 231-240.
- [14] RUAN J Q, LI S, LI Y P, et al. The presystemic interplay between gut microbiota and orally administered calycosin-7-O- β -D-glucoside [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(10): 1601-1611.
- [15] 范欣悦, 杨璐铭, 扶佳俐, 等. 鸦胆子化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(14): 1137-1145.
- [16] 何潇. 鸦胆子化学成分及苦木素抗炎活性研究[D]. 南昌: 江西中医药大学, 2021.
- [17] MONTANDON S A, JORNAYVAZ F R. Effects of antidiabetic drugs on gut microbiota composition [J]. Genes (Basel), 2017, 8(10): 250.
- [18] LI X, YUAN X, PANG L, et al. Gut microbiota markers for antipsychotics induced metabolic disturbance in drug naïve patients with first episode schizophrenia-A 24 weeks follow-up study [J]. medRxiv, 2021, doi:10.1101/2020.12.26.20248886
- [19] 郭丽娜, 郑时奇, 王腾宇, 等. 藜芦酸葡萄糖酯的人肠内菌转化研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(12): 2921-2924.
- [20] 左凤, 严梅楨, 周钟鸣. 肠道菌群对中药有效成分代谢作用的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(8): 568-572, 616.
- [21] GUO S B, HUANG W J, TIAN X P. Brusatol modulates diverse cancer hallmarks and signaling pathways as a potential cancer therapeutic [J]. Acta Materia Medica, 2022, 1(3): 278-301.
- [22] YU X Q, SHANG X Y, HUANG X X, et al. Brusatol: A potential anti-tumor quassinoid from *Brucea javanica* [J]. Chin Herb Med, 2020, 12(4): 359-366.
- [23] FORSLUND S K, CHAKAROUN R, ZIMMERMANN KOGADEEVA M, et al. Combinatorial, additive and dose-dependent drug-microbiome associations [J]. Nature, 2021, 600(7889): 500-505.
- [24] XU K, GAO X, XIA G, et al. Rapid gut dysbiosis induced by stroke exacerbates brain infarction in turn [J]. Gut, 2021, 70(8): 1486-1494.
- [25] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. Trends Biotechnol, 2015, 33(9): 496-503.
- [26] SCHWABE R F, JOBIN C. The microbiome and cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2013, 13(11): 800-812.
- [27] GREINDA A, IWAN E, KRAWCZYK P, et al. Attempting to identify bacterial allies in immunotherapy of NSCLC patients [J]. Cancers (Basel), 2022, 14(24): 6250.
- [28] LIU X, CHENG Y, ZANG D, et al. The role of gut microbiota in lung cancer: From carcinogenesis to immunotherapy [J]. Front Oncol, 2021, 11: 720842.
- [29] MARTINI G, CIARDIELLO D, DALLIO M, et al. Gut microbiota correlates with antitumor activity in patients with mCRC and NSCLC treated with cetuximab plus avelumab [J]. Int J Cancer, 2022, 151(3): 473-480.
- [30] 归崎峰, 王安鸽, 谭中菊, 等. 老年非小细胞肺癌患者肠道微生态分析[J]. 慢性病学杂志, 2020, 21(1): 21-23.
- [31] 杨家霖, 蔡冰洁, 戴玉豪, 等. 基于微生物-脑-肠轴探讨益气解毒方抗缺血性脑卒中作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(6): 91-100.
- [32] 黄红侠, 卢雪凤, 周权, 等. 脾阴虚证大鼠模型中水通道蛋白及肠道菌群的变化分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(23): 131-139.
- [33] ZHENG Y, FANG Z, XUE Y, et al. Specific gut microbiome signature predicts the early-stage lung cancer [J]. Gut Microbes, 2020, 11(4): 1030-1042.

[责任编辑 李嘉麟]