



(10) 授权公告号 CN 111912912 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 23

(21) 申请号 201910375759.0

(22) 申请日 2019.05.07

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111912912 A

(43) 申请公布日 2020.11.10

(73) 专利权人 香港理工大学深圳研究院

地址 518057 广东省深圳市南山区高新园

南区粤兴一道18号香港理工大学产学

研大楼205室

(72) 发明人 于学丽 莫锦华 黄文秀 肖辉辉

(74) 专利代理机构 深圳中一专利商标事务所

44237

专利代理师 曹小翠

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/08 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 100999754 A, 2007.07.18

CN 101773490 A, 2010.07.14

覃小丽 等. UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS分析槲皮素在大鼠肠道菌群中的代谢.《中国中药杂志》.2017,第42卷(第2期),

赵楠 等. 木脂素类化合物的代谢研究进展.《黑龙江医药》.2015,第28卷(第2期),

刘玉峰 等. 肠道菌群对中药有效成分的生物转化研究进展.《辽宁大学学报(自然科学版)》.2017,第44卷(第4期),

Rachel R. Schendel 等. Structural Transformation of 8-5-Coupled Dehydrodiferulates by Human Intestinal Microbiota.《J. Agric. Food Chem.》.2015,第63卷7975-7985.

Kati Hanhineva 等. In Vitro Microbiotic Fermentation Causes an Extensive Metabolite Turnover of Rye Bran Phytochemicals.《PLOS ONE》.2012,第7卷(第6期),1-10.

Hui-Hui Xiao 等. A Metabolomics Study on the Bone Protective Effects of a Lignan-Rich Fraction From Sambucus Williamsii Ramulus in Aged Rats.《Frontiers in Pharmacology》.2018,第9卷1-16.

(续)

审查员 罗海蔚

权利要求书2页 说明书9页 附图9页

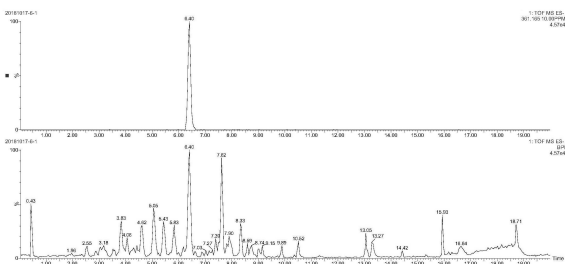
(54) 发明名称

木脂素类化合物的代谢组学研究方法

(57) 摘要

本发明属于代谢组学技术领域,具体涉及一种木脂素类化合物的代谢组学研究方法,包括如下步骤:配制木脂素类化合物溶液;将所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合进行摇床培养,采集不同培养时间的多个培养液样品;将所述培养液样品进行离心分离,取上清液进行液质联用色谱检测并进行数据分析,确定木脂素类化合物的代谢产物结构和代谢路径;验证所述木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用。该研究方法不仅可以有效分析木脂素类

化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用,而且能选择代谢产物高产的培养时间点对代谢产物进行富集,为木脂素类化合物代谢产物在治疗抗骨质疏松症方面提供很好的应用。



[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

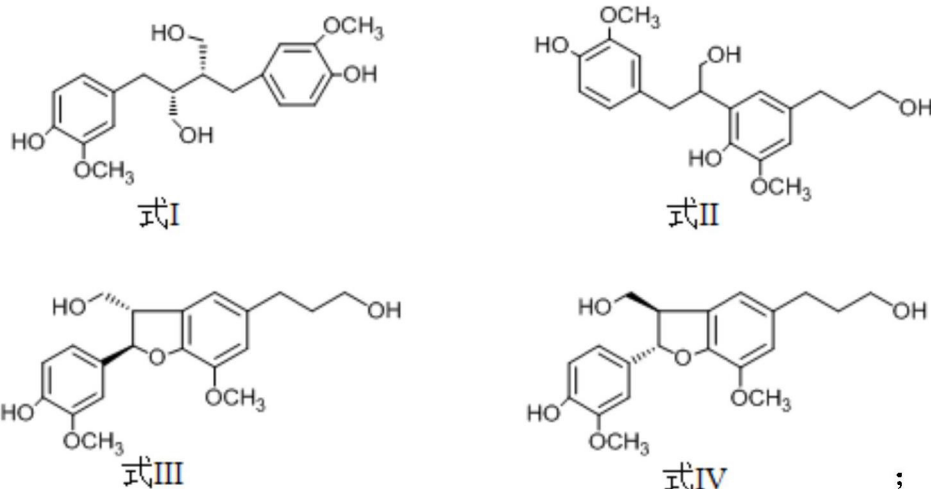
Pilar Gaya 等. Phytoestrogen

metabolism by adult human gut microbiota.

《Molecules》.2016,第21卷

1. 一种木脂素类化合物的代谢组学研究方法,其特征在于,包括如下步骤:

配制木脂素类化合物溶液;其中,所述木脂素类化合物溶液中的木脂素类化合物包括如下式I至式IV所示的化合物中的至少一种:



将所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合进行摇床培养,采集不同培养时间的多个培养液样品;其中,所述肠道菌群液中的肠道菌群包括完全厌氧菌或微需氧菌;

将所述培养液样品进行离心分离,取上清液进行液质联用色谱检测并进行数据分析,确定木脂素类化合物的代谢产物结构和代谢路径;其中,所述离心分离前先在所述培养液样品中加入甲醇混合均匀;所述液质联用色谱检测的色谱条件包括:C18色谱柱,流动相A为甲酸水溶液,流动相B为甲酸乙腈溶液,梯度洗脱顺序为:15%-15%流动相B,0-2min,15%-17%流动相B,2-4min,17%-20%流动相B,4-6min,20%-45%流动相B,6-12min,45%-70%流动相B,12-14min,70%-95%流动相B,14-16min,95%流动相B,16-18min,15%流动相B,18-20min,离子模式选择正离子模式和负离子模式均进行分析;

验证所述木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用。

2. 如权利要求1所述的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,其特征在于,所述木脂素类化合物溶液中的木脂素类化合物浓度为50-100mg/ml;和/或,

所述木脂素类化合物溶液中的溶剂为甲醇或二甲基亚砜;和/或,

所述木脂素类化合物溶液中的木脂素类化合物来自接骨木。

3. 如权利要求1所述的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,其特征在于,将所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合进行摇床培养的步骤中:所述木脂素类化合物溶液与所述肠道菌群液的体积比为1:100;和/或,

所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合后,所述木脂素类化合物溶液中的溶剂不超过肠道菌群液体积的2%。

4. 如权利要求1所述的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,其特征在于,所述摇床培养的时间为大于或等于7天,且在摇床培养的过程中,采集不同培养时间的9个培养液样品。

5. 如权利要求4所述的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,其特征在于,9个培养液样品为:摇床培养时间分别为0小时、8小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天采集到的培养液样品。

6. 如权利要求1所述的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,其特征在于,所述液质联

用色谱检测后的数据分析的步骤包括：用Markerlynx软件对检测数据进行归一化处理，然后用OPLS-DA模型在单一变量水平下通过t-检验进行验证，再根据分子式检索数据库确定木脂素类化合物的代谢产物结构和代谢路径。

7.如权利要求6所述的木脂素类化合物的代谢组学研究方法，其特征在于，在所述液质联用色谱检测后的数据分析的步骤中确定具体代谢产物相对含量最大的培养时间点，利用该培养时间点对所选择代谢产物进行富集培养。

8.如权利要求1-7任一项所述的木脂素类化合物的代谢组学研究方法，其特征在于，采用细胞模型实验验证所述木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用。

## 木脂素类化合物的代谢组学研究方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于代谢组学技术领域,具体涉及一种木脂素类化合物的代谢组学研究方法。

### 背景技术

[0002] 由于传统中药材具有成分复杂多样的特性,导致其治疗疾病过程中产生起效时间缓慢、治愈时程漫长、具体活性成分不清晰、具体作用机制不明朗、副作用不明确等弊端,但不可否认的是,作为中国文化的瑰宝之一,传统中药材是疾病治疗研究的无限物质源泉。目前关于肠道菌群对药物的代谢组学研究已经成为药物活性与机制研究的热点,尤其是其对天然产物的代谢研究更引起了广泛关注,传统中药材作为天然药物的瑰宝,一般均为汤剂口服式给药的特定给药形式,导致其在发挥药效是无法避免的将于胃肠道向接触,肠道菌群作为胃肠道的重要组成部分,在这个过程中发挥了怎样的作用就成为了目前研究的重点。活性化合物在体内外代谢组学研究一直是目前药物代谢研究的中心内容,体内模型一般为动物模型,而体外一般为相关细胞或肠道菌群的体外培养作为模型。

[0003] 中药接骨木是一种被中国药典收录的传统中药,广泛应用于治疗骨相关性疾病,对接骨木主要活性部位的成分分析发现,其主要成分为木脂素(Lignans)类化合物,但在活性部位的动物实验中发现,在给药组动物体内,并未检测到任何相关木脂素类化合物原型,所以,木脂素类化合物其发挥活性作用的分子机理不确定,以致不能筛选确定更有效的活性化合物。目前也没有一种有效的木脂素类化合物的代谢组学研究方法分析木脂素类化合物代谢产物抗骨质疏松活性。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种木脂素类化合物的代谢组学研究方法,旨在解决目前不能有效分析木脂素类化合物代谢产物抗骨质疏松活性的技术问题。

[0005] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案如下:

[0006] 本发明提供一种木脂素类化合物的代谢组学研究方法,包括如下步骤:

[0007] 配制木脂素类化合物溶液;

[0008] 将所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合进行摇床培养,采集不同培养时间的多个培养液样品;

[0009] 将所述培养液样品进行离心分离,取上清液进行液质联用色谱检测并进行数据分析,确定木脂素类化合物的代谢产物结构和代谢路径;

[0010] 验证所述木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用。

[0011] 本发明提供的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,通过将木脂素类化合物溶液加入到肠道菌群中进行摇床培养,然后采集不同时间点的培养液样品,利用液质联用色谱检测分析技术进行代谢产物分析,确定代谢产物结构和代谢谱图,再针对具体代谢产物进行相关抗骨质疏松症活性验证确定其活性,从而更全面充分且更深刻阐释木脂素类化合物

的代谢产物抗骨质疏松活性,从而确定木脂素类化合物在疾病治疗过程中肠道菌群占据的无法替代作用,该研究方法不仅可以有效分析木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用,而且能选择代谢产物高产的培养时间点对代谢产物进行富集,为木脂素类化合物代谢产物在治疗抗骨质疏松症方面提供很好的应用。

### 附图说明

[0012] 图1为本发明中接骨木活性部位以及木脂素类化合物TET总离子流程图;

[0013] 图2为本发明中体外木脂素类化合物SEC0代谢数据分析图;其中,A为PCA分析图,B为VIP分析图;

[0014] 图3为本发明中体外木脂素类化合物SEC0代谢路径图;

[0015] 图4为本发明中体外木脂素类化合物SEC0优势菌群选择数据图;其中,A为在完全厌氧菌和微需氧菌中肠二醇相对含量变化趋势图,B为在完全厌氧菌和微需氧菌群中肠内脂相对含量变化趋势图;

[0016] 图5为本发明中体内木脂素类化合物SEC0代谢产物含量检测图;

[0017] 图6为本发明中体外木脂素类化合物TET代谢数据分析图;其中,A为PCA分析图,B为VIP分析图;

[0018] 图7为本发明中体外木脂素类化合物TET代谢路径图;

[0019] 图8为本发明中体外木脂素类化合物DDA代谢数据分析图;其中,A为PCA分析图,B为VIP分析图;

[0020] 图9为本发明中体外木脂素类化合物DDDA代谢数据分析图;其中,A为PCA分析图,B为VIP分析图;

[0021] 图10为本发明中体外木脂素类化合物DDA和DDDA代谢路径图。

### 具体实施方式

[0022] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0023] 本发明实施例提供了一种木脂素类化合物的代谢组学研究方法,包括如下步骤:

[0024] S01:配制木脂素类化合物溶液;

[0025] S02:将所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合进行摇床培养,采集不同培养时间的多个培养液样品;

[0026] S03:将所述培养液样品进行离心分离,取上清液进行液质联用色谱检测并进行数据分析,确定木脂素类化合物的代谢产物结构和代谢路径;

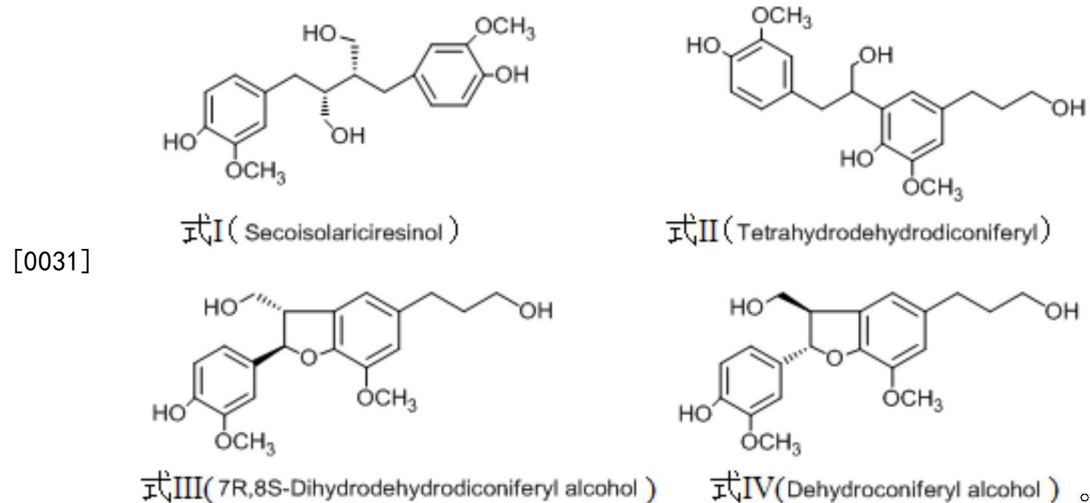
[0027] S04:验证所述木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用。

[0028] 本发明实施例提供的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,通过将木脂素类化合物溶液加入到肠道菌群中进行摇床培养,然后采集不同时间点的培养液样品,利用液质联用色谱检测分析技术进行代谢产物分析,确定代谢产物结构和代谢谱图,再针对具体代谢产物进行相关抗骨质疏松症活性验证确定其活性,从而更全面充分且更深刻阐释木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性,该研究方法不仅可以有效分析木脂素类化合物的代谢

产物抗骨质疏松活性作用,而且能选择代谢产物高产生的培养时间点对代谢产物进行富集,为木脂素类化合物代谢产物在治疗抗骨质疏松症方面提供很好的应用。

[0029] 本发明实施例提供的木脂素类化合物的代谢组学研究方法,通过肠道菌群对木脂素类化合物代谢的研究,不仅能够证明肠道菌群在木脂素类化合物药物对疾病的治疗中具有重要作用,还能通过对具体代谢产物的研究得到更有效的活性物质基础,从而探讨木脂素类化合物防治疾病的物质基础与作用机制,为后续具体代谢产物进行成药性研究、对骨质疏松症的防治与相关药物的应用提供基础。

[0030] 在步骤S01中:配制的木脂素类化合物溶液中的木脂素类化合物来自接骨木。接骨木主要活性部位的成分主要为木脂素类化合物,具体地,所述木脂素类化合物溶液中的木脂素类化合物包括如下式I至式IV所示的化合物中的至少一种:



[0032] 接骨木60%乙醇提取物是已经被证实的接骨木治疗原发性骨质疏松症的活性部位,针对该部位进行分离纯化与结构鉴定,最终确定十余个木脂素类化合物,且通过含量分析可知上述四种均为含量较大的木脂素类化合物,尤其以式II(缩写TET)为首,总离子流程图如图1所示:分别为TET化合物以及接骨木活性部位总离子流程图。上述四种化合物为接骨木中主要木脂素类化合物,式I所示的化合物简写为SECO,式II所示的化合物简写为TET,式III所示的化合物简写为DDDA,式IV所示的化合物简写为DDA。上述化合物均可以从接骨木中提取得到。

[0033] 所述木脂素类化合物溶液中的溶剂为甲醇或二甲基亚砜(DMSO);甲醇或二甲基亚砜对木脂素类化合物具有很好的溶解性。进一步地,所述木脂素类化合物溶液中的木脂素类化合物浓度为50-100mg/ml。

[0034] 在步骤S02中:将所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合进行摇床培养中,所述木脂素类化合物溶液与所述肠道菌群液的体积比为1:100;而且,所述木脂素类化合物溶液与复苏后的肠道菌群液混合后,所述木脂素类化合物溶液中的溶剂不超过肠道菌群液体积的2%,这样可以使肠道菌群对木脂素类化合物更好地进行代谢,避免溶剂如甲醇或二甲基亚砜在培养过程中对肠道菌群活力造成影响。

[0035] 在一实施例中,复苏的肠道菌群液的制备方法为:采集新鲜粪便(如人或大鼠),制备成肠道菌原液,然后以1:100的比例接种于BHI肉汤(脑心浸液肉汤)中,37℃摇床过夜培养,得到肠道菌群液。具体地,该肠道菌群液中的肠道菌群可以为完全厌氧菌(Anaerobic)

或微需氧菌(Microaerophilic),具体地,采用不同的培养方法获得相应的优势菌群,在摇床培养过程中采用油封层或厌氧盒的方法进行时可以形成完全厌氧菌,微需氧菌则在正常培养环境下进行,这样就可以由培养方式的差异在各自的优势状态下得到不同的菌群。而且通过实施例证明,更优选为完全厌氧菌的肠道菌群。

[0036] 在一实施例中,所述摇床培养的时间为大于或等于7天,且在摇床培养的过程中,采集不同培养时间的9个培养液样品。具体地,9个培养液样品为:摇床培养时间分别为0小时、8小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天采集到的培养液样品。

[0037] 木脂素类化合物的肠道菌群代谢产物可能具有远胜于原型化合物的活性,通过对木脂素类化合物的代谢转化分析确定具体代谢路径后,采用大批量培养的方法进行代谢产物的富集纯化,从而得到具体代谢产物,相对于化学合成更快速简便,而后进行活性研究。在保障肠道菌群活力的基础上将体外摇床培养时间延长至长达7天的长时培养,使得木脂素类化合物代谢转化的更加完全,研究更加充分;给药方式上选择先给药后接种菌群的方式减少了DMSO等溶剂对菌群活力可能造成的损伤;对代谢产物单体化合物的活性验证研究可以为骨质疏松相关疾病的治疗提供新的物质基础。

[0038] 在步骤S03中:所述液质联用色谱检测后的数据分析的步骤包括:用Markerlynx软件对检测数据进行归一化处理,然后用OPLS-DA模型在单一变量水平下通过t-检验进行验证,再根据分子式检索数据库确定木脂素类化合物的代谢产物结构和代谢路径。

[0039] 在步骤S04中:采用细胞模型实验验证所述木脂素类化合物的代谢产物抗骨质疏松活性作用。根据代谢产物的性质选择细胞模型实验的试验方法验证其在抗骨质疏松方面的活性,从而证实肠道菌群代谢转化在木脂素类化合物防治骨质疏松症活性作用时的重要作用。其中,在所述液质联用色谱检测后的数据分析的步骤中确定具体代谢产物相对含量最大的培养时间点,利用该培养时间点对所选择代谢产物进行富集培养。利用体外菌群大批量培养的方法,根据具体代谢产物相对含量最大的时间点对所选择代谢产物进行富集,再通过相应的分离纯化方法对其进行纯化,从而得到具体代谢产物。

[0040] 例如,通过细胞模型实验,血清体内检测SECO的代谢产物肠内脂具有更好的活性,可以提供一种木脂素类化合物SECO的代谢产物制备方法,即将木脂素类化合物SECO溶液与复苏后的肠道菌群液混合进行摇床培养7天,然后对SECO的培养液进行离心分离,取上清液进行纯化得到代谢产物肠内脂。

[0041] 本发明实施例中,对接骨木含量较大的4个木脂素类化合物(式I-IV)进行肠道菌群体外培养实验,对完全厌氧菌和微需氧菌进行了分别的相关培养实验,结果发现待测木脂素类化合物均能在体外培养的肠道菌群中被代谢转化成其次级代谢产物,而与动物试验中血液样品进行代谢产物对比发现,的确有部分代谢产物存在于这些样品中,由此证明肠道菌群在接骨木活性部位发挥抗骨质疏松症作用时起到了重要作用。由于不同肠道菌群对木脂素类化合物的代谢能力不同,通过实验对代谢木脂素类化合物的优势性肠道菌群进行了确认,经过实验证明完全厌氧菌是木脂素类化合物代谢转化的优势菌群。同时,本发明实施例通过对代谢产物的指认,确定了经肠道菌群代谢并最终进入血液的代谢产物,从而证实了肠道菌群在木脂素类化合物进入血液之前对其代谢转化的能力。而代谢产物活性试验方面,证实了以肠内脂为代表的代谢产物在抗骨质疏松症上的活性作用,更全面的证实了肠道菌群在接骨木活性部位发挥抗骨质疏松活性作用时的重要作用。

[0042] 在一具体实施例中,一种接骨木中木脂素类化合物肠道菌群代谢组学研究方法,包括以下步骤:

[0043] 1)配液:将不同木脂素类化合物依照溶解性的不同分别溶解于DMSO或色谱甲醇溶液中,浓度为50-100mg/ml,超声至全部溶解得到木脂素类化合物溶液,4℃保存备用;

[0044] 2)菌群培养:肠道菌群复苏后,分别接种于完全厌氧菌与微需氧菌群培养BHI肉汤中,37℃摇床培养过夜得到肠道菌群液(次日以1:100的比例进行接种,培养适当时间);

[0045] 3)给药:

[0046] a、分装:将复苏后的肠道菌群液分别进行分装,按照所需采样时间点和木脂素类化合物样品种类数目分装肉汤,采样时间点9个,木脂素类化合物4种,菌群培养方式为完全厌氧和微需氧2种,分别有各自对应的空白对照组,则需要分装144个肉汤,每个2ml。给予待测样品溶液与相应空白对照溶液后将复苏过的菌群接种至相应的肉汤中,37℃摇床进行培养。

[0047] b、给药:将4℃保存的木脂素类化合物溶液分别按照终浓度为0.5-1mg/ml接种于已分装的肠道菌群液中,37℃摇床培养,空白对照组加入等量的DMSO或色谱甲醇溶液;由于DMSO溶液与甲醇溶液具在一定程度上具有细菌损伤性,所以要控制其终浓度不超过肉汤总体积的2%,以避免其在给药及培养过程中对菌群活力造成影响。

[0048] c、采样:按照不同时间点进行培养液样品采集,采样时间点设定为0h、8h、1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d。

[0049] 4)样品前处理

[0050] -80℃冰箱中取出采集好的培养液样品,缓慢解冻至完全溶解,取适量样品加入3倍量的色谱甲醇溶液与内标溶液,振荡均匀后置于4℃冰箱静置2h,涡旋1min后14000rpm离心10min,取上清液,氮气吹干后采用50%甲醇水溶液复溶至100ul后置于4℃冰箱保存至待分析。

[0051] 5)样品分析

[0052] 采用Waters公司的UPLC-Q-TOF-MS/MS液质联用色谱仪针对所有待测样品进行分析。

[0053] 6)数据处理

[0054] 数据分析利用Markerlynx建立精确质量,保留时间与强度对的矩阵。每个样品中的各峰面积将通过总的峰面积进行归一化。实验结果用OPLS-DA模型在单一变量水平下通过t-检验进行验证。再根据分子式检索数据库KEGG、METLIN、HMDB和lipid map,最终确定具体代谢产物的结构并推测出具体化合物代谢路径。

[0055] 7)代谢产物富集

[0056] 利用体外菌群大批量培养的方法,根据数据分析过程中选择具体代谢产物相对含量最大的时间点对所选择代谢产物进行富集,再通过相应的分离纯化方法对其进行纯化,从而得到具体代谢产物。

[0057] 8)代谢产物活性验证

[0058] 根据代谢产物的性质选择相应的试验方法验证其在抗骨质疏松方面的活性,从而证实肠道菌群代谢转化在几种木脂素类化合物防治骨质疏松症活性作用时的重要作用。

[0059] 本发明先后进行过多次试验,现举一部分试验结果作为参考对发明进行进一步详

细描述,下面结合具体实施例进行详细说明。

[0060] 实施例1肠道菌群对木脂素类化合物SEC0的代谢研究

[0061] 1、配制木脂素类化合物溶液

[0062] 根据药物溶解性选择溶剂DMSO对SEC0进行溶解,得到木脂素类化合物SEC0溶液,浓度为100mg/ml。预实验发现SEC0在DMSO中溶解性更好,所以选择DMSO作为SEC0的溶剂。由于DMSO具有一定的细胞与细菌损伤性,所以后续培养要控制肉汤中SEC0终浓度为0.5mg/ml的同时,DMSO的终浓度不超过肉汤总体积的2%,以免其菌群活力造成影响,SEC0完全溶解后于4℃条件下保存。

[0063] 2、肠道菌群的离体培养

[0064] 2.1收集健康大鼠的新鲜粪便,制备成肠道菌液。

[0065] 2.2菌群复苏:将保存于-80℃的肠道菌液提前解冻,完全解冻后以1:100的比例接种于BHI肉汤中,37℃摇床过夜培养。

[0066] 2.3菌群培养:按照所需采样时间点和菌群种类分装肉汤,采样时间点9个,菌群种类为完全厌氧和微需氧2种(完全厌氧菌采用BHI肉汤油封法进行培养),分别有各自对应的空白对照组,则需要分装36汤,每个2ml。给药组给予配置好的SEC0(浓度100mg/ml)20ul,空白对照组给予空白DMSO溶液20ul后,在两组肉汤中分别以1:100的比例接种复苏后的肠道菌群液,37℃摇床进行培养,得到培养液样品。

[0067] 3、培养液样品的采集与分析

[0068] 3.1样品采集:针对SEC0完全厌氧菌与微需氧菌的各自给药组与空白组培养液进行采集,采集时间点分别为0h,8h,24h,2d,3d,4d,5d,6d和7d,每次采集菌群培养液1ml,其中200ul测定OD值用作菌群活力检测,其余800ul在12000rpm离心2min,取上清液,-80℃保存,上清液即为SEC0的肠道菌群培养液检测样品;

[0069] 3.2样品前处理:从-80℃冰箱中取出SEC0培养液检测样品,缓慢解冻至完全溶解,取适量样品加入3倍量的色谱甲醇溶液与内标溶液,振荡均匀后置于4℃冰箱静置2h,涡旋1min后14000rpm离心10min,取上清液,氮气吹干后采用50%甲醇水溶液复溶至100ul后置于4℃冰箱保存至待分析。

[0070] 3.3样品检测:采用UPLC-Q-ToF-MS/MS Waters液质联用色谱仪;C18色谱柱(Waters,1.7μm,2.1mm×50mm);柱温40℃;流速0.3mL/min;流动相分别为0.1%甲酸-水溶液(A)和0.1%甲酸-乙腈溶液(B);采用梯度洗脱的方式进行分析,洗脱顺序为:15%-15%B(0-2min),15%-17%B(2-4min),17%-20%B(4-6min),20%-45%B(6-12min),45%-70%B(12-14min),70%-95%B(14-16min),95%B(16-18min),15%B(18-20min);进样量5μL;在样品分析的过程中自动进样箱的温度保持在6℃;离子模式选择正离子模式和负离子模式均进行分析;锥体电压和毛细管电压分别为35V和3.0Kv;离子源温度120℃;去溶剂化温度350℃;质谱数据采集范围100-1500Da;采集时间间隔0.1s。其他条件均采用仪器使用常规条件即可。

[0071] 3.4数据分析:

[0072] 数据分析利用Markerlynx建立精确质量,保留时间与强度对的矩阵。每个样品中的各峰面积将通过总的峰面积进行归一化。实验结果用OPLS-DA模型在单一变量水平下通过t-检验进行验证。再根据分子式检索数据库KEGG、METLIN、HMDB和lipid map,最终确定具

体代谢产物的结构。

[0073] SECO培养液样品的数据分析结果如图2所示:图2(A)为PCA分析图,从中可以看出,与空白对照组相比(三角形,此PCA分析中所有空白对照组样品数据几乎完全重叠),随着给药时间的延长(圆点),给药组与空白对照组的差异性越来越显著,说明随着SECO培养时间的延长,菌群对其代谢转化所产生的代谢产物含量和(或)种类越来越多,导致了这种差异的产生。图2(B)为VIP分析图,从中可以看到,与空白对照组相比,SECO组共有5个VIP值>2的化合物(其中包含SECO),针对每一化合物进行数据库对比后可以确认其具体结构,在根据代谢图谱中具有代谢产物产生的时间可以进一步推测SECO的代谢路径为图3所示。

[0074] 实施例2 SECO优势菌群选择性研究

[0075] 1、SECO代谢路径分析

[0076] 在SECO体外培养的两种菌群样本中随着给药时间的延长均依次检测到了单去甲基代谢产物,二羟基肠二醇,肠二醇与肠内脂的存在,具体路径图如图3。针对不同时间点样品代谢产物分析可知,在SECO组培养8h时,SECO发生部分代谢,代谢产物为单去甲基化反应代谢产物,并且SECO在24h样品中被完全代谢转化;而在3-4天左右样品中依次产生代谢产物肠二醇与肠内脂,肠二醇与肠内脂作为植物木脂素代谢产物—动物木脂素的重要组成,正因其具有多种多样的活性吸引越来越的关注。

[0077] 2、代谢产物相对含量测定

[0078] 针对不同时间点不同肠道进行代谢产物肠二醇与肠内脂的相对含量测定,并分别针对两者绘制相对含量变化趋势图。如图4,图4(A)为在完全厌氧菌和微需氧菌中肠二醇相对含量变化趋势图,图4(B)为在完全厌氧菌和微需氧菌群中肠内脂相对含量变化趋势图。根据代谢产物肠二醇与肠内脂在不同菌群中代谢转化的情况可以得到结论:完全厌氧菌为木脂素类化合物SECO代谢转化的优势菌群。

[0079] 实施例3 SECO代谢产物体内检测

[0080] 1、血清样本前处理

[0081] SECO代谢产物体内检测采用血浆样本,动物模型为去卵巢雌性SD大鼠,具体分组:Sham组为假手术组;OVX组为对照组;OVX+Premarin组为阳性对照组;OVX+SWC组为接骨木SECO提取物组,收集好的血清在-80℃冰箱保存。

[0082] 从-80℃冰箱取出血清样本,于4℃冰箱中冰浴融化,涡旋1min后于预冷过的4℃低温离心机中14000rpm离心15min,取上清置于预冷过的EP管中,分别加入3倍量预冷过的甲醇溶液,振荡均匀后置于4℃冰箱静置2h,涡旋1min后14000rpm低温离心10min,取上清液,氮气吹干后采用50%甲醇水溶液复溶至100ul后置于4℃冰箱保存至待分析。

[0083] 2、血清中SECO代谢产物检测

[0084] 样品检测方法与SECO肠道菌群培养液样品检测方法完全一致,具体数据处理方法也完全一致,最终确定经肠道菌群代谢转化并最终进入血液中的代谢产物为肠内脂,具体数据分析结果如图5所示,相对于其他组别样品而言,只有接骨木SECO提取物组动物血浆样本中检测到了肠内脂的存在。

[0085] 实施例4、肠道菌群对木脂素类化合物TET的代谢研究

[0086] 1、配制木脂素类化合物溶液

[0087] 根据药物溶解性选择溶剂色谱甲醇溶液对TET进行溶解,得到木脂素类化合物TET

溶液,浓度为100mg/ml。由于色谱甲醇溶液具有不确定性的细菌损伤能力,所以后续培养要控制肉汤中TET终浓度为0.5mg/ml的同时,甲醇的终浓度不超过肉汤总体积的2%,以免其菌群活力造成影响,TET完全溶解后于4℃条件下保存。

[0088] 2、肠道菌群的离体培养

[0089] 2.1收集健康大鼠的新鲜粪便,制备成肠道菌液。

[0090] 2.2菌群复苏:将保存于-80℃的肠道菌液提前解冻,完全解冻后以1:100的比例接种于BHI肉汤中,37℃摇床过夜培养。

[0091] 2.3菌群培养:按照所需采样时间点和菌群种类分装肉汤,采样时间点9个,菌群种类为完全厌氧和微需氧2种(完全厌氧菌采用BHI肉汤油封法进行培养),分别有各自对应的空白对照组,则需要分装36汤,每个2ml。给药组给予配置好的TET(浓度100mg/ml) 20ul,空白对照组给予空白甲醇溶液20ul后,在两组肉汤中分别以1:100的比例接种复苏后的肠道菌群,37℃摇床进行培养,得到培养液样品。

[0092] 3、培养液样品的采集与分析

[0093] 3.1样品采集:针对TET完全厌氧菌与微需氧菌的各自给药组与空白组培养液进行采集,采集时间点分别为0h,8h,24h,2d,3d,4d,5d,6d和7d,每次采集菌群培养液1ml,其中200ul测定OD值用作菌群活力检测,其余800ul在12000rpm离心2min,取上清液,-80℃保存,上清液即为TET肠道菌群培养液检测样品;

[0094] 3.2样品前处理:从-80℃冰箱中取出TET培养液检测样品,缓慢解冻至完全溶解,取适量样品加入3倍量的色谱甲醇溶液与内标溶液,振荡均匀后置于4℃冰箱静置2h,涡旋1min后14000rpm离心10min,取上清液,氮气吹干后采用50%甲醇水溶液复溶至100ul后置于4℃冰箱保存至待分析。

[0095] 3.3样品检测:采用UPLC-Q-ToF-MS/MS Waters液质联用色谱仪;C18色谱柱(Waters,1.7μm,2.1mm×50mm);柱温40℃;流速0.3mL/min;流动相分别为0.1%甲酸-水溶液(A)和0.1%甲酸-乙腈溶液(B);采用梯度洗脱的方式进行分析,洗脱顺序为:15%-15%B(0-2min),15%-17%B(2-4min),17%-20%B(4-6min),20%-45%B(6-12min),45%-70%B(12-14min),70%-95%B(14-16min),95%B(16-18min),15%B(18-20min);进样量5μL;在样品分析的过程中自动进样箱的温度保持在6℃;离子模式选择正离子模式和负离子模式均进行分析;锥体电压和毛细管电压分别为35V和3.0Kv;离子源温度120℃;去溶剂化温度350℃;质谱数据采集范围100-1500Da;采集时间间隔0.1s。其他条件均采用仪器使用常规条件即可。

[0096] 3.4数据分析:

[0097] 数据分析利用Markerlynx建立精确质量,保留时间与强度对的矩阵。每个样品中的各峰面积将通过总的峰面积进行归一化。实验结果用OPLS-DA模型在单一变量水平下通过t-检验进行验证。再根据分子式检索数据库KEGG、METLIN、HMDB和lipid map,最终确定具体代谢产物的结构。

[0098] TET培养液样品的数据分析结果如图6所示:图6(A)为PCA分析图,从中可以看出,与空白对照组相比(三角形,此PCA分析中所有空白对照组样品几乎完全重叠),随着给药时间的延长(原点),给药组与空白对照组的差异性越来越显著,说明随着TET培养时间的延长,菌群对其代谢转化所产生的代谢产物含量和(或)种类越来越多,导致了这种差异的产

生。图6 (B) 为VIP分析图,从中可以看到,与空白对照组相比,TET组共有6个VIP值>2的化合物(其中包含TET),针对每一化合物进行数据库对比后可以确认其具体结构,在根据代谢图谱中具有代谢产物产生的时间可以进一步推测TET的代谢路径为图7所示。

[0099] 木脂素类化合物TET的代谢优势菌群研究方法与所述实施例2的SEC0研究均一致,实验结论也完全一致,均显示完全厌氧菌为其优势菌群。以优势菌群完全厌氧菌组培养样品为例进行具体分析,在24h内的样品中TET的相对含量未发生明显的变化,说明在此时间内并未开始转化,而随着培养时间的延长,发现48h及之后所有样品中TET完全消失,说明TET在24~48小时内被肠道菌群完全代谢转化,于此同时产生了去甲基代谢产物及环裂解代谢产物,且两种去甲基代谢产物随着时间延长相对含量并无显著减少,说明均为终产物之一,肠道菌群无法再对其进行进一步代谢转化;环裂解代谢产物产生后快速消失,同时产生其次级代谢产物,说明肠道菌群能对其进行进一步的代谢,而后趋于停止。

[0100] 另外,对其余两个木脂素类化合物DDA和DDDA的代谢组学研究,使用的方法与所述实施例1-3中的SEC0代谢研究方法均一致,具体数据分析与代谢路径图如附图6-10所示。

[0101] 通过对四种木脂素类化合物的代谢产物分析发现:肠道菌群中对木脂素类化合物代谢转化的优势菌群为完全厌氧菌;单去甲基反应为木脂素类化合物在肠道菌群中代谢转化的第一步;肠道菌群在木脂素类化合物发挥具体活性作用中起着至关重要的作用。本发明实施例的木脂素类化合物的代谢组学研究方法从肠道菌群方面探讨木脂素类化合物防治疾病的物质基础与作用机制,为后续具体代谢产物进行成药性研究、对骨质疏松症的防治与相关药物的应用提供基础。

[0102] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

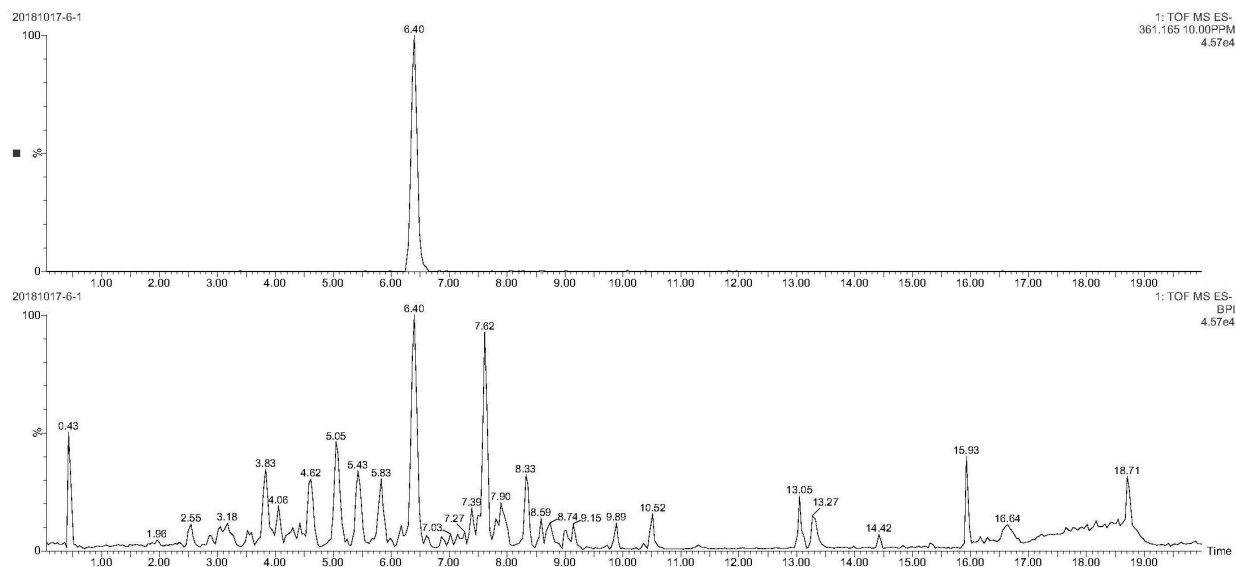


图1



15

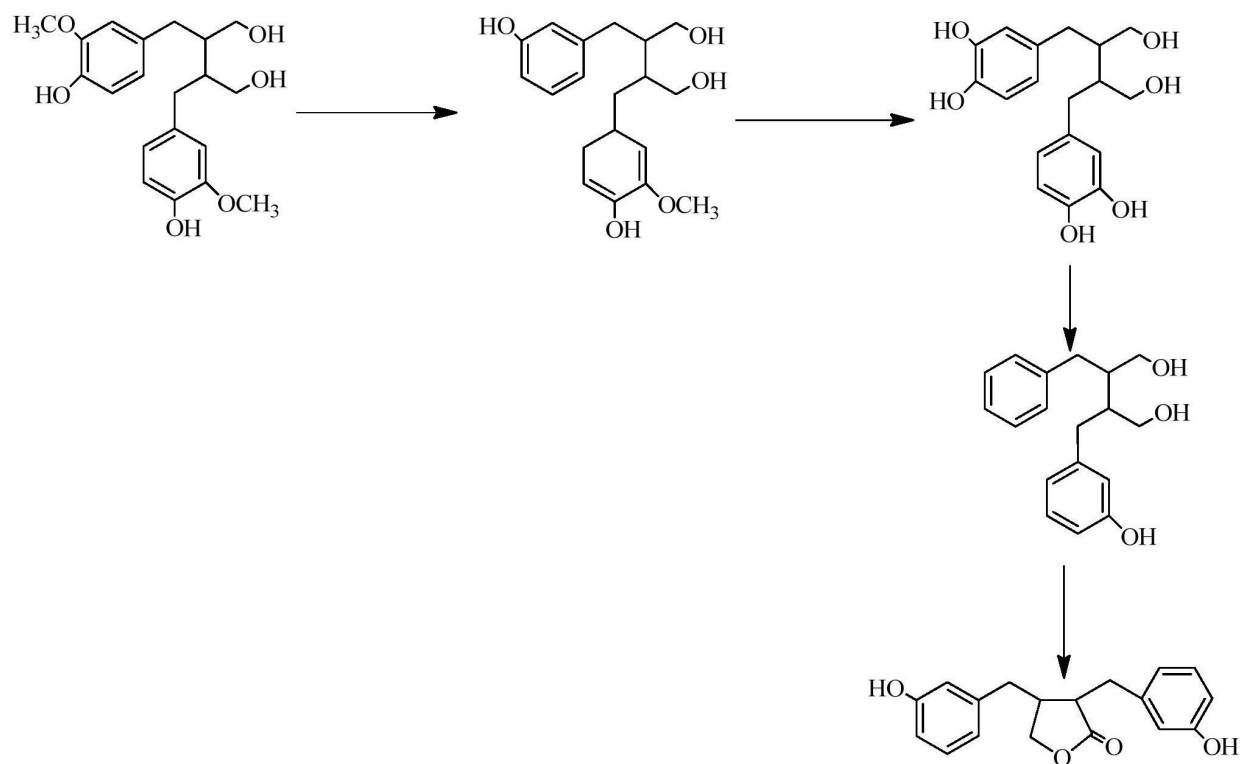
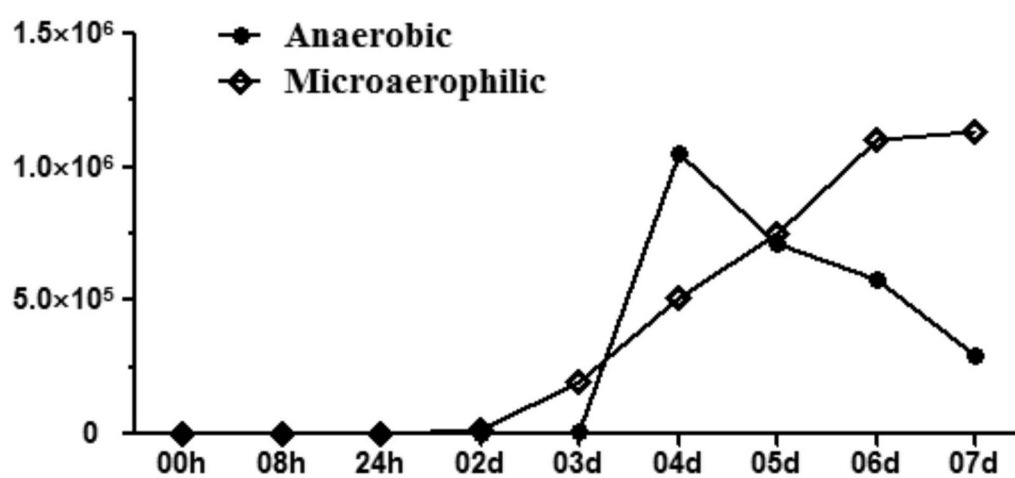
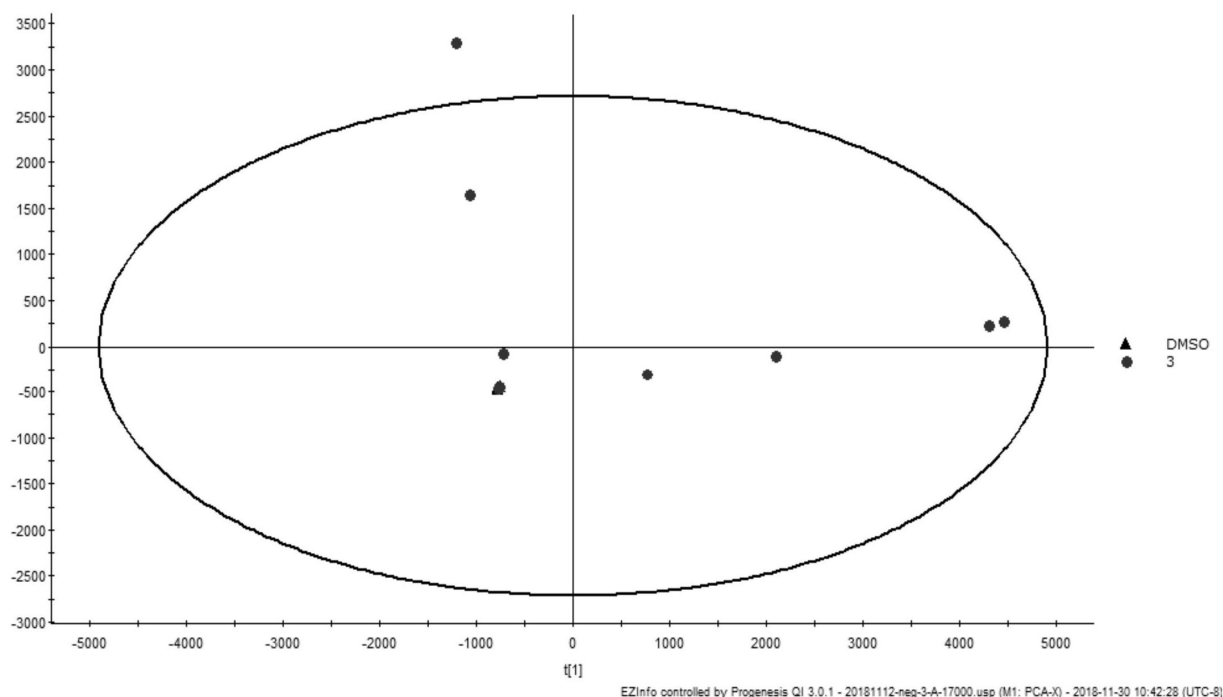


图3

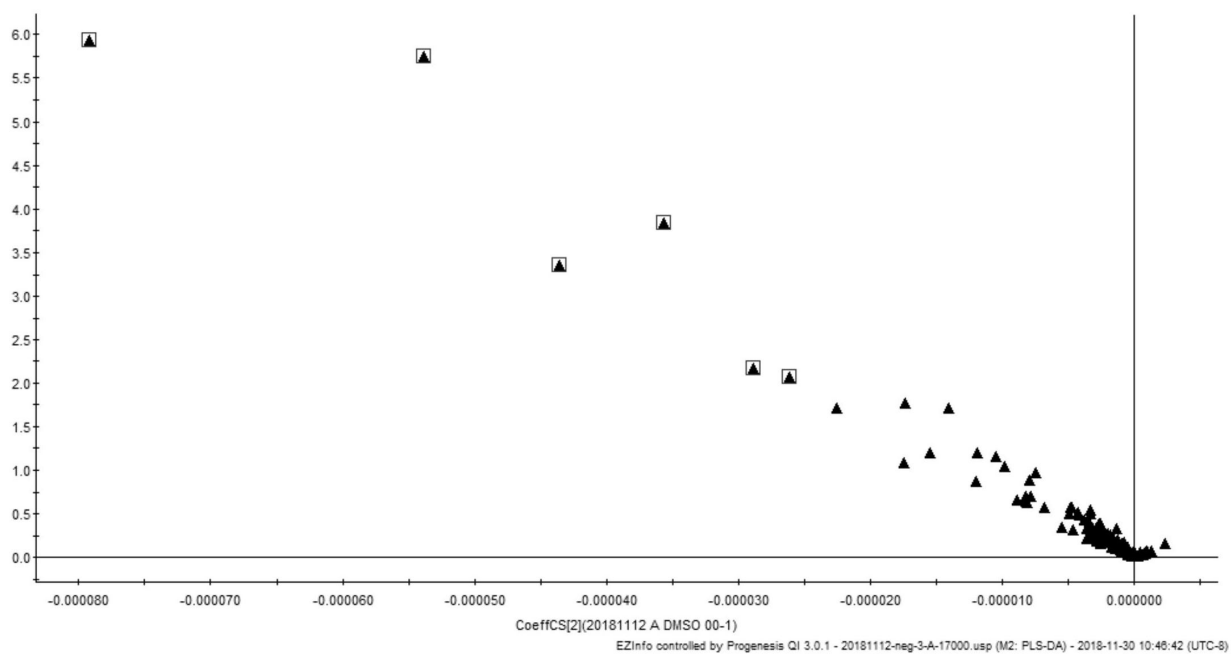


(A)





(A)



(B)

图6

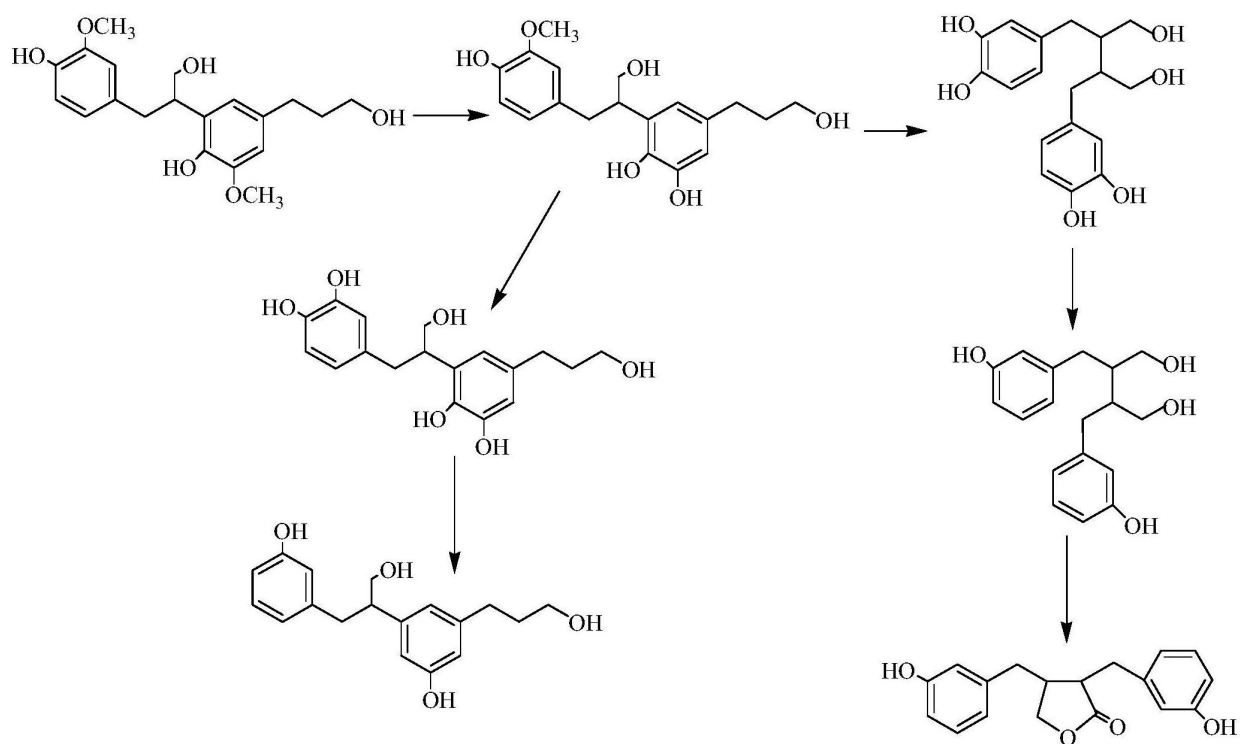
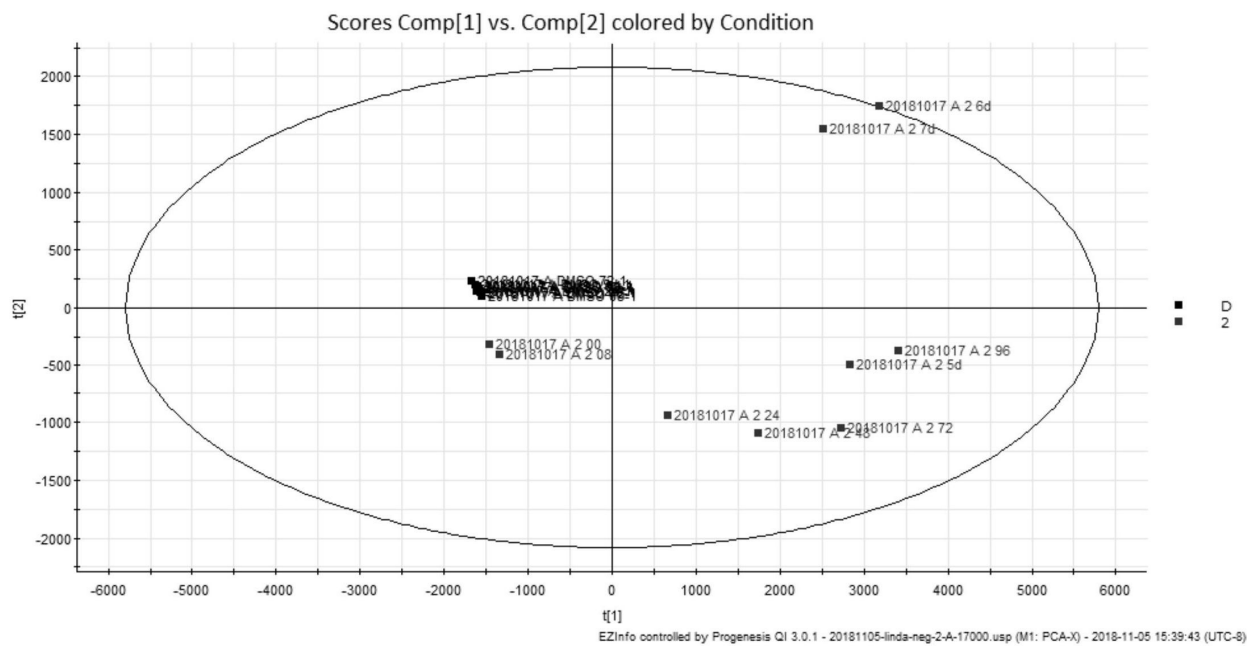


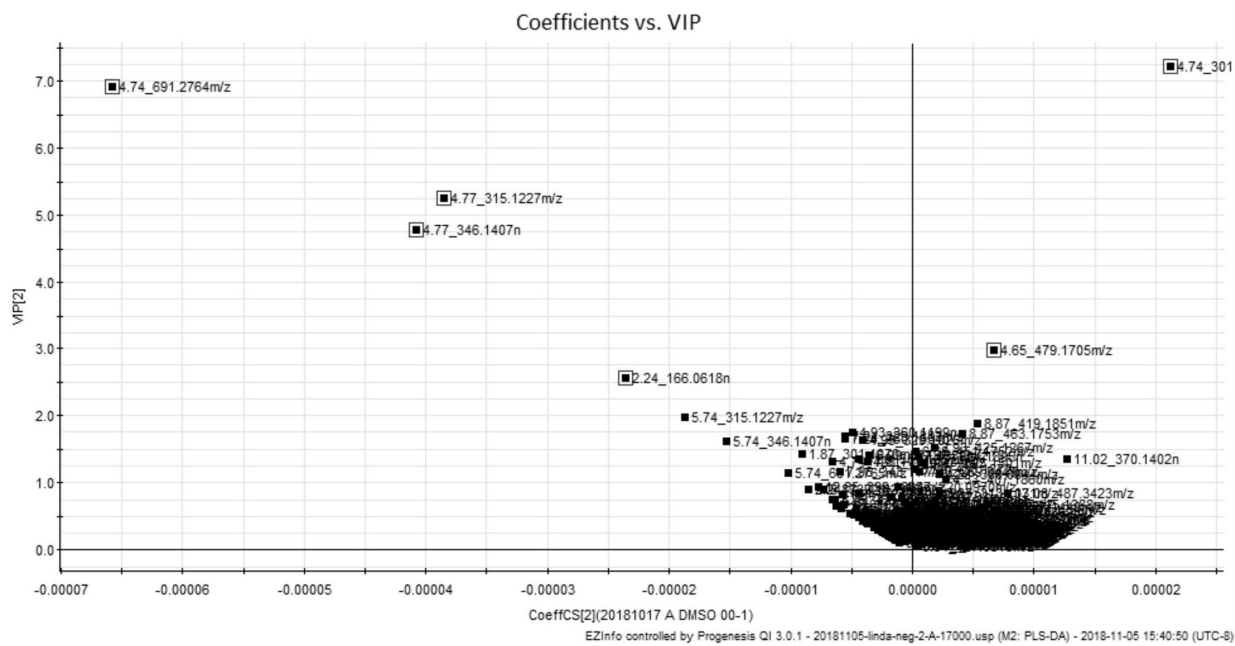
图7



20



(A)



(B)

图9

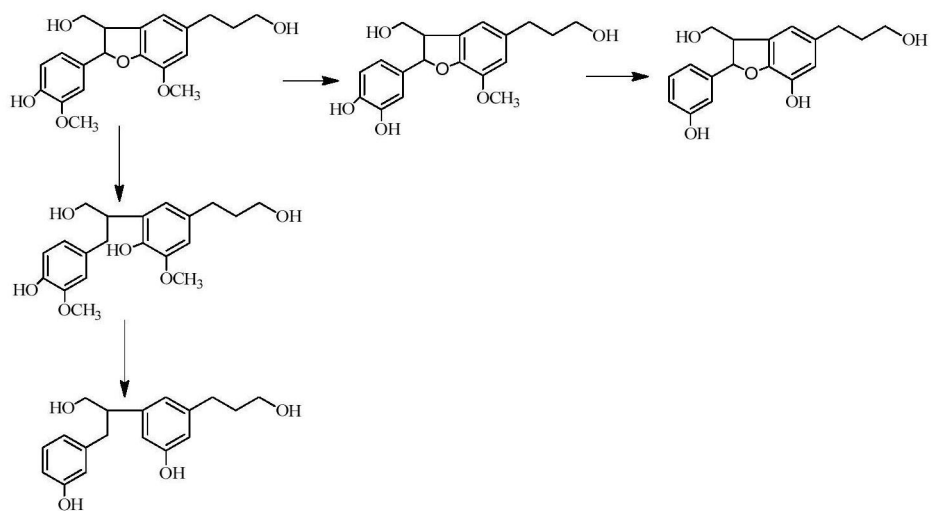


图10