

濒危蒙药沙冬青毛状根代谢组学分析

王沛雅[†],方彦昊[†],郭琪,张军,李鑫,杨晖*,王治业,杨涛

甘肃省科学院生物研究所 甘肃省微生物资源开发利用重点实验室

“特色微生物与植物资源创新”甘肃省国际科技合作基地,兰州 730000

摘要:为了探讨利用蒙药蒙古沙冬青毛状根生产其药用成分的可能性,本研究采用超高效液相色谱-串联四级杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS)技术分别对蒙古沙冬青毛状根和自然根组织进行化学成分分析,并通过主成分分析(PCA)和偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等多元变量分析方法研究二者间的代谢产物差异。结果显示,蒙古沙冬青毛状根和自然根样本在正、负离子模式下分别得到3 982和4 209种代谢物,差异代谢物分别为1 706和1 639种,其中表达上调的代谢物分别有1 455和1 095种;注释到KEGG的差异代谢物有171和134种,主要富集在8大类65条代谢通路:氨基酸代谢、次生代谢产物生物合成、碳水化合物代谢、脂质代谢、辅助因子和维生素代谢、萜类和聚酮化合物代谢、能量代谢及核苷酸代谢等通路;蒙古沙冬青毛状根差异代谢产物主要集中在氨基酸代谢和次生代谢产物生物合成通路中,正离子模式下涉及的差异代谢物分别占37.4%和32.7%,负离子模式下占28.4%和26.1%;次生代谢产物生物合成途径中涉及黄酮/类黄酮生物合成、生物碱生物合成、β-内酰胺生物合成、芥子油苷生物合成、苯丙烷代谢等11条代谢通路,其中黄酮/类黄酮生物合成途径涉及的差异代谢产物最多,占次生代谢产物生物合成途径中差异代谢物的34%,其次是有关生物碱生物合成的差异代谢物,占24%;黄酮/类黄酮生物合成途径中涉及的差异代谢物有88.2%呈现上调。本研究结果可为蒙古沙冬青毛状根代谢产物积累及途径解析提供理论依据。

关键词:沙冬青;毛状根;代谢组学;次生代谢产物

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)4-0647-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.4.013

Metabolomics analysis of hairy roots of endangered Mongolian medicine *Ammopiptanthus mongolicus*

WANG Pei-ya[†], FANG Yan-hao[†], GUO Qi, ZHANG Jun, LI Xing, YANG Hui*, WANG Zhi-ye, YANG Tao

Key Laboratory of Microbial Resources Exploitation and Application / Gansu International Science and Technology Cooperation Base of Microorganism and Plant Germplasm Resources & Genetic Improvement, Institute of Biology, Gansu Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China

Abstract: In order to know the possibility of producing medicinal components from hairy roots of *Ammopiptanthus mongolicus*, UHPLC-Q-TOF-MS method combined with multivariate statistical analysis was used to analyze the chemical components of hairy roots and roots of *A. mongolicus*, PCA and OPLS-DA were used for data processing. The results showed that 3 982 and 4 209 metabolites were obtained from the hairy roots and roots of *A. mongolicus* at positive and negative ion modes, respectively, with 1 706 and 1 639 differential metabolites, among which 1 455 and 1 095 were up-regulated; there were 171 and 134 differential metabolites annotated to KEGG, which were enriched to 65 metabolic pathways, mainly concentrated in amino acid metabolism, secondary metabolites biosynthesis, carbohydrate metabolism, lipid metabolism, cofactors and vitamins metabolism, terpenes and polyketides metabolism, energy metabolism and nucleotide metabolism. The differential metabolites were mainly concentrated in amino acid metabolism and secondary metabolites biosynthesis, 37.4% and 32.7% of the differential metabolites at positive ion mode, 28.4% and 26.1% of the differential metabolites at negative ion mode. There were 11 pathways in-

收稿日期:2021-08-19 接受日期:2022-01-14

基金项目:甘肃省科技重点研发计划(18YF1WA089);甘肃省科学院应用开发项目(2018JK-04);甘肃省科学院创新团队项目(2019CX004-01)
†共同第一作者

*通信作者 E-mail:yanghui43@163.com

volved in the secondary metabolites biosynthesis, including flavone/flavonoid biosynthesis, alkaloid biosynthesis, β -lactam biosynthesis, glucosinolate biosynthesis, phenylpropanoid metabolism, etc. and the flavone/flavonoid biosynthesis pathway involved the most differential metabolites, accounting for 34% of the differential secondary metabolites, followed by the differential metabolites related to alkaloid biosynthesis, accounting for 24%. 88.2% of differential metabolites in flavone/flavonoid biosynthesis pathway were up-regulated. The results of this study provide a theoretical basis for the accumulation and pathway elucidation of metabolites in hairy roots of *A. mongolicus*.

Key words: *Ammopiptanthus mongolicus*; hairy root; metabolomics; secondary metabolite

沙冬青 (*Ammopiptanthus mongolicus* (Maxim. ex kon) Cheng f.) 又名蒙古沙冬青, 属于豆科蝶形花亚科沙冬青属, 是我国荒漠地区唯一的超旱生常绿阔叶灌木树种, 被国家列入第 1 批珍稀濒危保护植物名录^[1,2]。沙冬青是传统的民族药材(蒙药), 名“孟和哈日嘎讷”, 其枝叶可入药, 具有祛风湿、活血、散瘀、止痛的功效, 外用还能治疗冻疮、尤用于治疗风湿性关节炎疾病效果显著^[3-5]。其体内含有丰富的生物活性物质, 有生物碱类、黄酮及异黄酮类、有机酸、二苯乙烯类、甾醇及单萜类等, 具有降糖、抗肿瘤、抗病毒、杀菌、抗氧化、杀虫等作用功效^[6-11]。

毛状根(hairy root) 大规模繁殖培养能获得大量理想的药用物质, 迄今为止, 通过毛状根可以培养生产出的次生代谢产物已涵盖生物碱类、苷类、黄酮类、醌类、多糖类等多种物质^[12-15]。Liu 等^[16]通过建立人参毛状根培养体系, 其毛状根中的总皂苷含量可达 2.468%, 接近人参原药材含量的 2 倍。另有研究发现, 发根农杆菌 LBA9402 和 R1601 感染甘草外植体产生毛状根, 其中 5 种黄酮类化合物的总量比愈伤组织中高 1.5 倍, 甘草查耳酮含量是愈伤组织的 15.5 倍^[17], Yang 等^[18]诱导培养杜仲毛状根, 其次生代谢产物桃叶珊瑚苷质量分数高于自然根及皮, 最高可达 30.105 mg/g。目前, 国内外学者对蒙古沙冬青的研究主要集中于其地上药用部分及种子中化学成分及药理活性, 尚未见对其毛状根组织代谢积累情况的报道。本研究选取长势较好的蒙古沙冬青毛状根根系与其自然根对比, 采用 UHPLC-Q-TOF-MS 实验技术对样本进行了进行非靶向代谢组学分析, 初步了解其毛状根组织差异代谢产物积累及代谢通路情况, 为蒙古沙冬青毛状根代谢产物积累及途径解析提供理论依据, 为后期借助毛状根途径生产蒙古沙冬青活性代谢成分提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蒙古沙冬青材料来自中科院鄂尔多斯实验站(内蒙古杭锦旗呼和浩特, 40°12'9" ~ 11"N/107°

22'25" ~ 32"E)。

蒙古沙冬青毛状根由本课题组利用发根农杆菌 A4 菌株侵染沙冬青子叶诱导获得。毛状根组织于无激素的固体 1/2MS 培养基中, 25 ℃, 黑暗条件下保存在甘肃省微生物资源开发利用重点实验室, 定期转接并 PCR 验证。

1.2 仪器

超高效液相 Agilent 1290(美国安捷伦公司); 高分辨质谱 Triple TOF 6600(AB Sciex, 美国应用生物系统公司); Agilent 1260 高效液相色谱(美国安捷伦公司), Agilent-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m, 美国安捷伦公司); Thermo GenPure Pro 型超纯水器(美国赛默飞公司)。

1.3 方法

将蒙古沙冬青毛状根组织与幼根样品广泛非靶向代谢组检测和数据分析委托百迈客生物科技有限公司采用超高效液相串联四极杆飞行时间质谱(UHPLC-Q-TOF-MS)技术, 结合数据依赖采集方式对样本进行分析, 获得一级质谱和二级质谱数据, 采用 XCMS 对数据进行峰提取和代谢物鉴定。

供试品溶液制备: 样品先真空冷冻干燥, 称取 10 mg 样品, 加入 500 μ L 提取液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}} = 2:2:1$, 含同位素标记内标混合物), 涡旋混匀 30 s, 加入钢珠, 35 Hz 研磨处理 4 min, 冰水浴超声 5 min。重复研磨, 超声处理 2 次, 40 ℃ 静置 1 h, 将样品 4 ℃, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清 250 μ L 于 EP 管中, 真空干燥。加入 200 μ L 体积分数 50% 乙腈复溶, 涡旋 30 s, 冰水浴超声 10 min, 将样品在 4 ℃, 13 000 r/min 离心 15 min, 取 75 μ L 上清液于进样瓶中上机, 用于 UPLC-MS 分析。所有样品另取 10 μ L 混合成 QC 样品上机分析。

色谱质谱采集条件: 使用 Agilent 1290 (Agilent Technologies) 超高效液相色谱仪, 通过 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μ m) 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相, 含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L

L 氨水, B 相为乙腈。采用梯度洗脱:0~0.5 min, 体积分数 95% B; 0.5~7 min, 体积分数 95% B→65% B; 7~8 min, 体积分数 65% B→40% B; 8~9 min, 体积分数 40% B; 9~9.1 min, 体积分数 40% B→95% B; 9.1~12 min, 体积分数 95% B。流动相流速:0.5 mL/min, 柱温:25 °C, 样品盘温度:4 °C, 进样体积:正离子 1 μL; 负离子 1 μL。

使用 Triple TOF 6600 高分辨质谱, 通过 IDA (information-dependent acquisition) 模式进行高分辨质谱数据采集。在 IDA 这种模式下, 数据采集软件 (Analyst TF 1.7, AB Sciex) 依据一级质谱数据和预先设定的标准, 自动选择离子并采集其二级质谱数据。每个循环选取 12 个强度最强且大于 100 的离子进行二级质谱扫描, 碰撞诱导解离的能量为 30 eV, 循环时间为 0.56 s。离子源参数如下, GS1:60 psi, GS2:30 psi, CUR:35 psi, TEM:600 °C, DP:60 V, ISVF:5 000 V(Pos)/4 000(Neg)。

样本质控分析:质控样本(QC)由两组样品提取物混合制备而成, 共 3 次重复, 用来分析样本在相同处理方法下的重复性。

1.4 数据处理与分析

通过比较离子碎片模式、保留时间和 m/z 值, 并通过百迈客生物科技有限公司的自建数据库 MWDB (metware database)、公共数据库代谢物信息和二级谱信息对代谢物进行鉴定。利用三重四级杆质谱的多反应监测模式 (multiple reaction monitoring, MRM) 对代谢物进行定量, 获得不同样本的代谢物质谱并对其进行峰面积积分, 最后不同样本的相同代谢物中的质谱出峰进行积分校正。采用 R 软件 (<https://www.r-project.org/>) 对鉴定的代谢产物进行无监督的主成分分析(PCA), 从总体上得到各组样本之间的总体代谢差异和组内样本之间的变异性大小。利用有监督的正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)将原始数据进行 \log^2 转换后进行中心化处理, 获得导致两组之间显著差异的相关代谢物信息。根据 OPLS-DA 模型获得的变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) 评分, 将 $VIP \geq 1$, 差异倍数 (fold change, FC) 值 ≥ 2 筛选组间差异代谢物, 并用 t 检验 (双尾平均值) 评估代谢物含量差异的显著性 ($P < 0.05$), 同时将得到的相应差异代谢物通过代谢通路数据 KEGG Pathways (<https://www.genome.jp/keg>) 进行解析。

2 结果与分析

2.1 蒙古沙冬青毛状根样本 UHPLC-Q-TOF-MS 的总离子流图

通过 UHPLC-Q-TOF-MS 中 LC-MS 技术对蒙古沙冬青毛状根和自然根中的化学成分进行定性分析, 结果显示正、负离子模式下均有较好的响应, 所有样品的仪器分析均信号强、峰容量大且保留时间重现性好。正、负离子模式下的得到典型总离子流色谱图 (total ions chromatograph, TIC) 图谱如图 1 所示, 蒙古沙冬青毛状根检测到的代谢产物与其自然根系相比具均有明显差异。毛状根组织和自然根样本在正离子模式下得到 3 982 种代谢物, 在负离子模式下得到 4 209 种代谢物。通过数据比对分析, 初步推断蒙古沙冬青毛状根组织可积累类黄酮、生物碱、酚酸、氨基酸、有机酸、脂质等丰富的代谢产物, 如: 芒柄花苷、降紫香苷、芒柄花素、黄豆黄素、黄豆黄素苷、苜蓿毒素、高丽槐素、新补骨脂异黄酮、异补骨脂甲素等类黄酮化合物, 葫芦巴碱、氧化苦参碱、毒芹碱、白羽扇豆碱等生物碱类化合物, 还有龙胆酸、亚油酸、苜蓿酚、白藜芦醇、temazepam 等众多药效功能化合物。

2.2 主成分分析(PCA)与正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)结果

PCA 通过建立低维平面或空间, 分析和概览整个数据集, 揭示数据集中观测变量的分组、趋势及离群值, 从而发现各变量间的相似性或差异性。图 2 中可以看出, 正离子模式下主成分 PC1 与 PC2 的占比分别达到了 45.66% 和 22.41%, 积累贡献率达到了 68.07%; 负离子模式下二者的占比分别达到了 41.42% 和 12.75%, 积累贡献率达到了 54.17%。蒙古沙冬青毛状根与其自然根两组样本呈现出明显的分离趋势, 分别聚为一类, 证实了实验的可靠性与重复性。

PCA 作为一种反映原始数据状态的无监督方法, 环境等其他因素以及系统错误都会影响实验结果。为排除由与实验无关的某些因素引起的代谢变化, 并获得更准确的结果, 本研究使用有监督的 OPLS-DA 对数据进行进一步处理, 最大化组间差异确定潜在的差异成分。在 OPLS-DA 分析中, Q^2 是一个重要的参数, $Q^2 > 0.9$ 时被视为出色的模型, 则可以反映该模型的可靠性与稳定性。图 3 显示两组样本可以被明显区分开来, 在正、负离子模式下 Q^2 分别为 0.986 和 0.992, 证实该模型可以用以下一

步的差异代谢物分析。

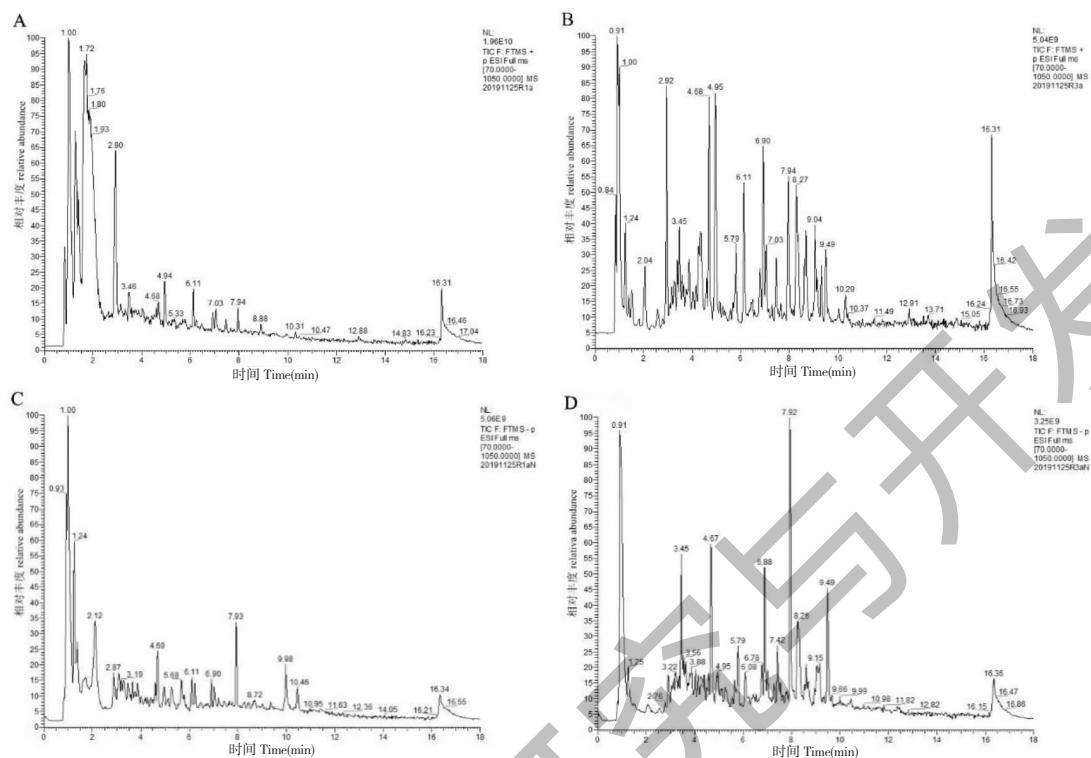


图 1 蒙古沙冬青毛状根与自然根样本的 HPLC-Q-TOF-MS 总离子流图 (TIC)

Fig. 1 The total ions chromatogram (TIC) of HPLC-Q-TOF-MS of hairy roots and roots of *A. mongolicus*

注:A:根(正离子模式);B:毛状根(正离子模式);C:根(负离子模式);D:毛状根(负离子模式)。Note:A:Root (positive ion mode);B:Hairy root (positive ion mode);C:Root (negative ion mode);D:Hairy roots (negative ion mode).

经过 OPLS-DA 置换检验来验证模型是否过拟合,横线对应为原始模型的 R^2 和 Q^2 ,蓝点和红点分别代表 Y 置换后模型的 R^2' 和 Q^2' 。 R^2' 和 Q^2' 均小于原始模型的 R^2 和 Q^2 ,即相应点都不超过相应的线,说明模型有意义,可根据模型变量的变量权重值

(VIP ≥ 1)筛选差异代谢物,图 4 显示两种模式下通过对 OPLS-DA 进行排列验证, R^2' 和 Q^2' 均小于原始模型的 R^2 和 Q^2 ,表明可以用 OPLS-DA 模型来进行数据的分析。

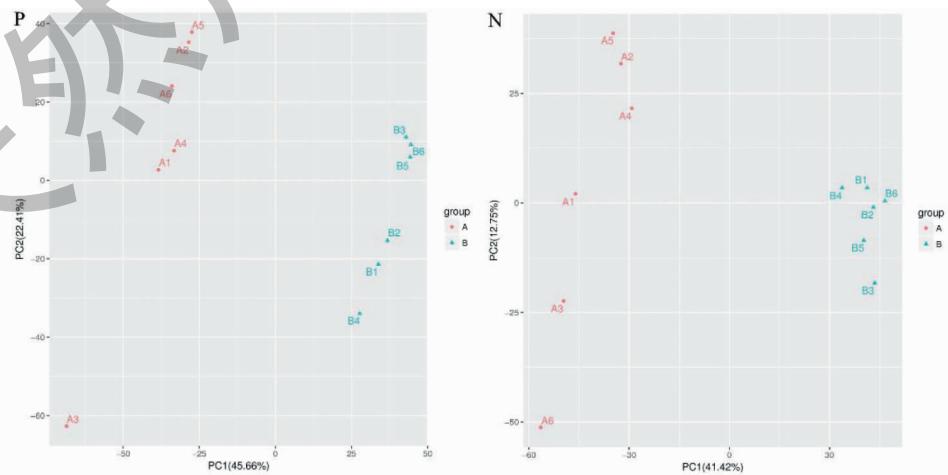


图 2 蒙古沙冬青毛状根与自然根样本的 PCA 得分

Fig. 2 PCA score of hairy roots and roots of *A. mongolicus*

注:P:正离子模式;N:负离子模式(下同)。Note:P:Positive ion mode;N:Negative ion mode on right (the same below).

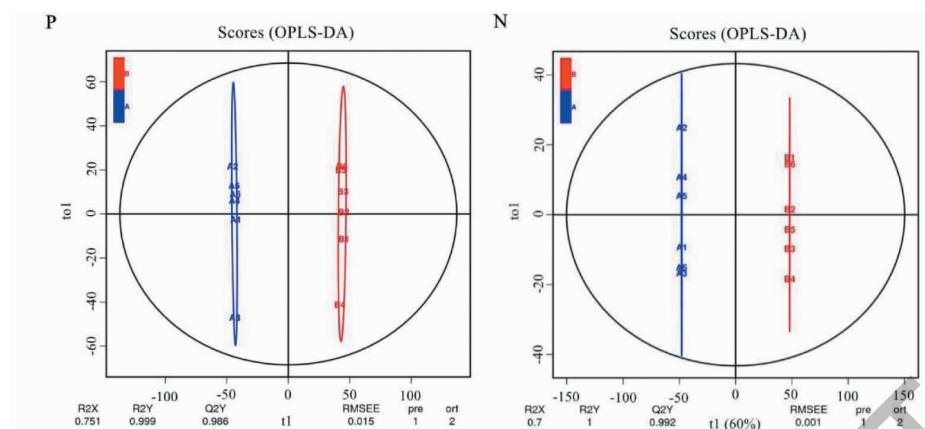


图3 蒙古沙冬青毛状根与自然根样本的OPLS-DA得分图

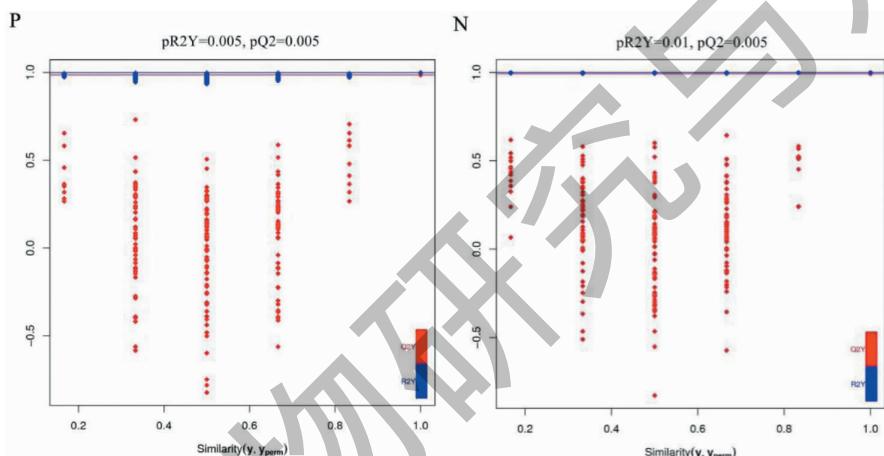
Fig. 3 OPLS-DA score of hairy roots and roots of *A. mongolicus*

图4 蒙古沙冬青毛状根与自然根样本的OPLS-DA模型验证图

Fig. 4 OPLS-DA score verification model of hairy roots and roots of *A. mongolicus*

2.3 差异代谢物的筛选

在 OPLS-DA 分析中,模型变量的变量权重值 VIP 可以衡量各代谢物积累差异对各组样本分类判别的影响强度和解释能力,挖掘具有生物学意义的差异代谢物。VIP ≥ 1 为常见的差异代谢物筛选标准,本研究结合变化倍数 $\log^2 FC \geq 2$,统计学 t 检验 $P\text{-value} < 0.05$ 为阈值进行差异代谢产物筛选。在正、负离子模式下筛选出 1 706 和 1 639 种差异代谢物,其中表达上调的代谢物分别有 1 455 和 1 095 种。以代谢物在样品中定量差异倍数的对数值(取以 2 为底的对数)为横坐标,以 t 检验的 $P\text{-value}$ (取以 10 为底的对数)为纵坐标,作差异代谢物火山图(图 5),散点大小代表 OPLS-DA 模型的 VIP 值,散点越大 VIP 值越大,筛选得到的差异表达代谢物越可靠。根据差异代谢物含量作聚类热图(见图 6),

由图可以清晰看出蒙古沙冬青毛状根与其自然根样本间成分差异明显,而组内样品成分差异较小。

2.4 差异代谢物注释与通路富集分析

基于 HMDB 数据库对 KEGG 数据库注释得到的差异代谢产物进行统计分类,利用 ClusterProfiler 选用超几何检验的方法对差异代谢物 KEGG 的注释结果进行富集分析差异代谢物通路,注释到 KEGG 的差异代谢物在正、负离子模式下分别为 171 和 134 种,主要富集在 8 大类 65 条代谢通路:(1)基酸代谢(“苯丙氨酸代谢”“丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢”“酪氨酸代谢”“精氨酸和脯氨酸代谢”“甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢”“苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成”“缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成”“氨基氨基酸代谢”“ β -丙氨酸代谢”等 18 条);(2)次生代谢产物生物合成(“黄酮/类黄酮生

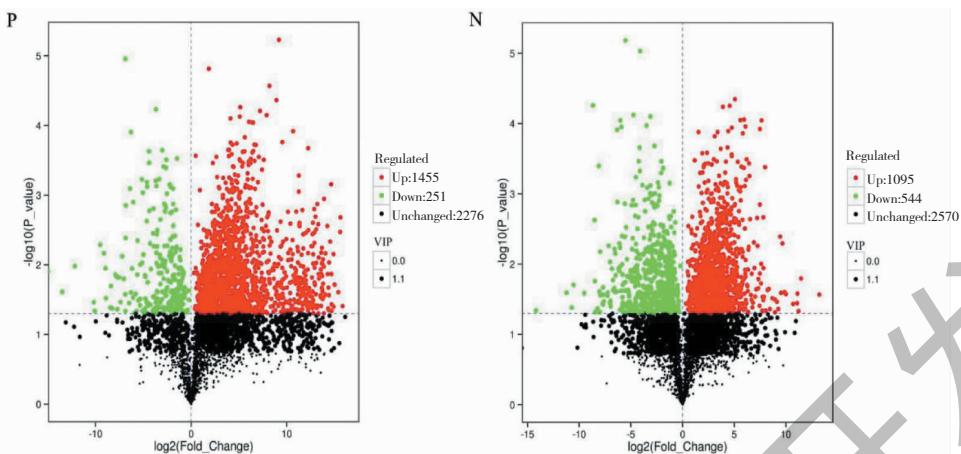


图 5 蒙古沙冬青毛状根与自然根差异代谢物火山图

Fig. 5 Volcanic maps of differential metabolites between roots and hair roots of *A. mongolicus*

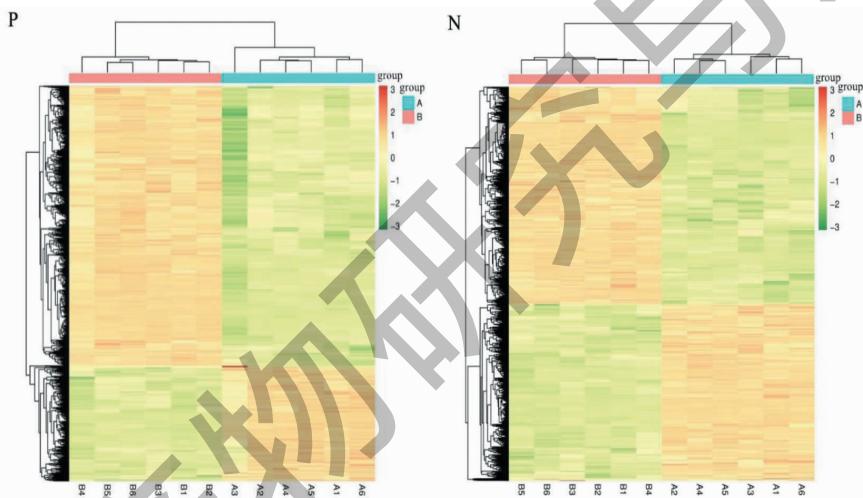


图 6 蒙古沙冬青毛状根与其自然根差异代谢物聚类热图

Fig. 6 The heat map of differential metabolites of hairy roots and roots of *A. mongolicus*

物合成”“生物碱生物合成”“ β -内酰胺菌素生物合成”“芥子油苷生物合成”“苯丙烷代谢”“有机氧化合物合成”等 11 条); (3) 碳水化合物代谢(“乙醛酸和二羧酸代谢”“半乳糖代谢”“抗坏血酸与醛酸代谢”“柠檬酸循环”“淀粉和蔗糖代谢”“丁酸酯代谢”等 12 条); (4) 脂质代谢(“ α -亚麻酸代谢”“亚油酸代谢”“脂肪酸合成”“花生四烯酸代谢”“甾族生物合成”等 9 条); (5) 辅助因子和维生素代谢(“泛酸和 CoA 生物合成”“泛醌和其他萜类醌生物合成”“维生素 B6 代谢”“生物素代谢”“烟酸和烟酰胺代谢”“硫胺素代谢”等 7 条); (6) 萜类和聚酮化合物代谢(“单萜生物合成”“玉米素生物合成”和“柠檬烯和蒎烯的降解”3 条); (7) 能量代谢(“光合生物固碳”“硫代谢”和“氧化磷酸化”3 条); (8) 核

苷酸代谢(“嘧啶代谢”和“嘌呤代谢”2 条)等通路。

在蒙古沙冬青毛状根差异代谢产物主要富集的 8 类代谢通路中, 氨基酸代谢和次生代谢产物生物合成通路所占比重较大, 这两类通路在正离子模式下富集的差异代谢物分别占总差异代谢物的 37.4% 和 32.7%, 负离子模式下占 28.4% 和 26.1% (见图 7)。在我们所关注的次生代谢产物生物合成途径中涉及 11 条差异代谢通路(见图 8):(1) 黄酮/类黄酮生物合成; (2) 生物碱生物合成; (3) β -内酰胺菌素生物合成; (4) 芥子油苷生物合成; (5) 苯丙烷代谢; (6) 苯并恶嗪类生物合成; (7) 茜类、二芳基庚烷类和姜酚生物合成; (8) 呋喃型木脂素; (9) 酚类; (10) 醇脂类; (11) 有机氧化合物等。此途径涉及 50 种差异代谢产物, 其中 34% 的差异代谢产物

富集在黄酮/类黄酮生物合成通路,占比最高;其次是生物碱生物合成通路中富集了24%的差异代谢物。在黄酮/类黄酮生物合成途径中88.2%的差异代谢物呈现上调(高丽槐素、芒柄花素、芒柄花苷、

降紫香苷、黄豆黄素、苜蓿毒素、芹菜苷等)(见表1),初步预测蒙古沙冬青毛状根组织对于黄酮/类黄酮物质具有潜在的积累能力,有待进一步深入挖掘研究。

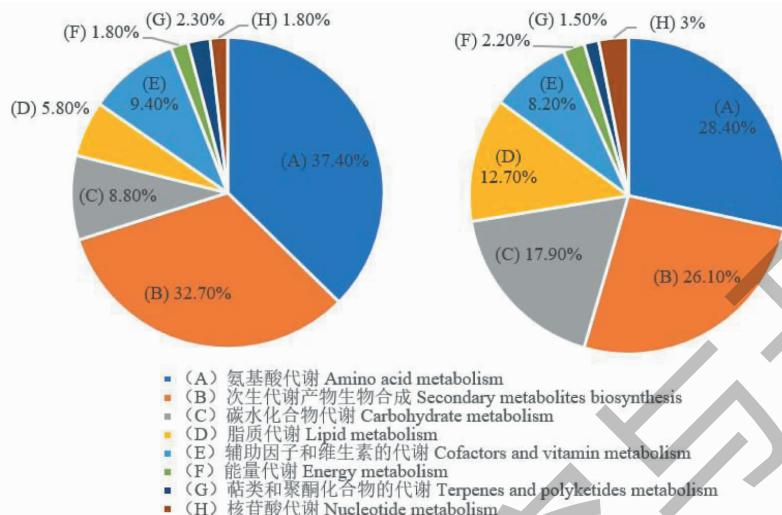


图7 差异代谢物KEGG通路富集图

Fig. 7 Statistics of KEGG pathway enrichment of differential metabolites

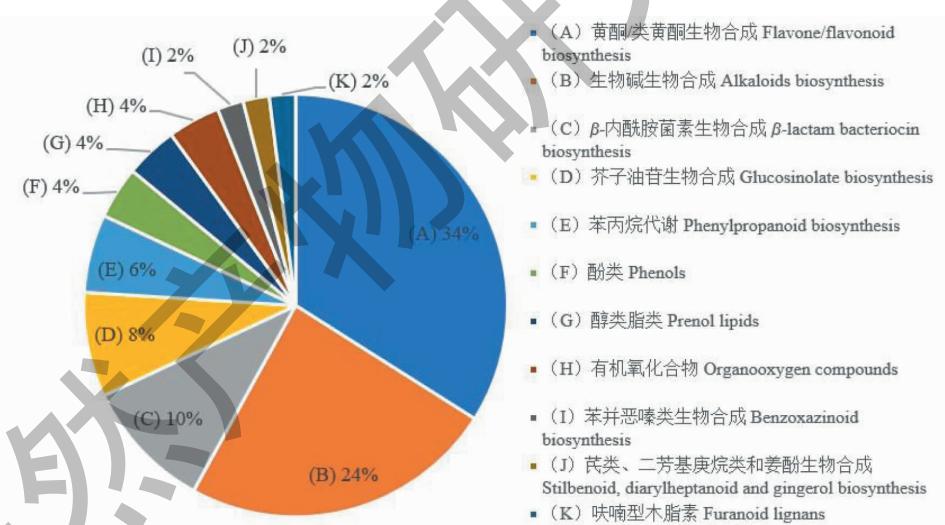


图8 次生代谢产物生物合成通路富集图

Fig. 8 Statistics of pathway enrichment of secondary metabolites biosynthesis

表1 黄酮/类黄酮生物合成通路差异代谢产物

Table 1 differential metabolites of flavone/flavonoid biosynthesis

差异代谢物 Differential metabolite	KEGG注释 KEGG annotation	差异倍数对数值 $\log^2 FC$	P值 P value	变量权重值 VIP	调控变化 Regulation	HMDB分类 HMDB taxonomy
(+)-高丽槐素 (+)-Maackiain	C16229	4.731	0.005	1.088	上调	异黄酮
芒柄花素 Formononetin	C00858	2.577	0.007	1.097	上调	异黄酮

续表1(Continued Tab. 1)

差异代谢物 Differential metabolite	KEGG 注释 KEGG annotation	差异倍数对数值 $\log^2 FC$	P 值 P value	变量权重值 VIP	调控变化 Regulation	HMDB 分类 HMDB taxonomy
降紫香昔 Sissotrin	C05376	4.878	0.0117	1.087	上调	异黄酮
芒柄花昔 Ononin	C10509	3.754	0.015	1.082	上调	异黄酮
黄豆黄素昔 Glycitein	C16195	3.062	0.004	1.083	上调	异黄酮
黄豆黄素 Glycitein	C14536	3.391	0.009	1.091	上调	异黄酮
黄豆昔 Daidzin	C10216	2.461	0.002	1.084	上调	异黄酮
松属素 Pinocembrin	C09827	2.162	0.004	1.091	上调	黄酮
美迪紫檀素 Medicarpin	C00858	2.574	0.007	1.095	上调	异黄酮
柚皮素 Naringenin	C00509	1.802	0.040	1.058	上调	黄酮
柚皮苷 Naringin	C09789	4.955	0.025	1.094	上调	黄酮
芹菜昔 Apigenin	C04858	4.553	0.048	1.075	上调	黄酮
芹菜素 7-O-新橘皮糖昔 Apigenin 7-O-neohesperidoside	C12627	3.991	0.007	1.080	上调	类黄酮
芹菜素-7-葡萄糖昔 Apigenin 7-glucoside	C04608	4.446	0.0004	1.082	上调	黄酮
芦丁 Rutin	C05625	2.185	0.020	1.067	上调	黄酮
白杨素 Chrysin	C10028	3.362	0.045	1.090	上调	黄酮
大豆黄酮 Daidzein	C10208	-2.349	0.017	1.080	下调	异黄酮
高良姜素 Galangin	C10044	-0.612	0.025	1.079	下调	黄酮

3 讨论与结论

本研究利用 UHPLC-Q-TOF-MS 技术对蒙古沙冬青毛状根及其自然根进行代谢组学分析, 在正、负离子模式下分别筛选到 1 706 和 1 639 种差异代谢产物, 其中表达上调的代谢物分别有 1 455 和 1 095 种。二者的差异代谢物主要富集在氨基酸代谢、次生代谢产物生物合成代谢通路上, 在次生代谢产物生物合成途径中包含黄酮/类黄酮生物合成、生物碱生物合成、 β -内酰胺菌素生物合成、芥子油昔生物合成等 11 条代谢通路, 黄酮/类黄酮生物合成通路涉及的差异代谢产物最多, 占 34%, 其中 88.2% 差异代谢物呈现上调。类黄酮是一类 2-苯基色原酮类化合物, 按其骨架可分为查尔酮、黄烷酮、黄酮、黄酮醇、异黄酮、花青素和紫檀素等, 而糖基化、丙二酰基化、羟基化、异戊烯基化、乙酰基化修饰以及聚合反

应最终导致了该化合物家族的多样性, 这些化学修饰对类黄酮的溶解性、移动性和降解性均有重要影响。类黄酮的结构和分子特性的多样性, 使得它能与各类亚细胞中的靶标相互作用, 从而影响植物、微生物和动物的生物学活性, 是植物发挥化学生态学功能的重要载体之一^[19]。研究发现, 从蒙古沙冬青种子中提取的总黄酮具有多种生物学活性, 具有良好的免疫增强作用, 对小鼠免疫活性细胞的增殖、相关免疫细胞因子和抗体的产生与释放等都具有显著的促进作用, 沙冬青种子总黄酮的主要活性成分为芒柄花素, 占总黄酮含量比高达 52.48%^[20-22]。通过本研究分析, 初步判断蒙古沙冬青毛状根对黄酮/类黄酮物质具有较强的合成积累能力, 这与学者对蒙古沙冬青功效成分研究结果相近, 说明其毛状根组织拥有潜在的开发价值。在此代谢组学分析的基

础上,后续需对其黄酮/类黄酮生物合成通路进行靶向代谢组学分析,并对毛状根组织展开化学成分分离提取及活性鉴定等相关研究,为蒙古沙冬青毛状根可否作为蒙药沙冬青的活性代谢成分生产组织提供参考依据。

参考文献

- Fu LG. China Plant Red Data Book (中国植物红皮书) [M]. Beijing: Science Press, 1992;368-371.
- Liu GH. Study on the endangered reasons of *Ammopiptanthus mongolicus* in the desert of Alashan[J]. Bull Bot Res(植物研究), 1998, 18:341-345.
- China's Medicinal Herb Compilation Group. Compilation of China's Medicinal Herb(全国中草药汇编)[M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1975, 2:286.
- Zhu YM. Botanical Records of Inner Mongolia(内蒙古植物药志) [M]. Hohhot: Inner Mongolia People's Publishing House, 1989;190.
- He Q, Zhang W. Clinical trial of *Ammopiptanthus mongolicus* in the treatment of rheumatoid arthritis(arthralgia cold-dampness arthralgia syndrome) [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2019, 35:1581-1583.
- Jia HX, Zhao MR, Cheng GQ, et al. The antineoplastic and life prolongation of two plant extracts JA1 and JO1 [J]. J Gansu Agr Univ(甘肃农业大学学报), 1991, 26:329-332.
- Jia N, Fang M. Inhibitory effect of JA1 on H22 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Chin J Vet Sci(中国兽医学报), 2007, 27: 710-714.
- Feng WJ, Ou YF, Su YL, et al. Chemical constituents of *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 36:1040-1042.
- Ji TF; Li J, Liang, CH. The chemical constituents of the twigs of *Ammopiptanthus nanus*[J]. J Asia Nat Prod Res, 2013, 15: 332-336.
- Xu GY, Pan BR, Xie ML. A study on the alkaloids of *Ammopiptanthus mongolicus* [J]. Arid Zone Res (干旱区研究), 1994, 11(1):50-52.
- Tian XM, Chen SZ, Tu PF, et al. Studies on chemical constituents of aerial parts of *Ammopiptanthus mongolicus*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2008, 33:2204-2206.
- Du XH, Zhang CL, Guo WL, et al. Nitric oxide plays a central role in water stress-induced tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. Mol Cells, 2015, 20:7574-7585.
- Jiao J, Gai QY, Wang W, et al. Enhanced astragaloside production and transcriptional responses of biosynthetic genes in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures by elicitation with methyl jasmonate[J]. Biochem J, 2016, 105:339-346.
- Bao JS, Zhang HT, Xu DW, et al. Establishment of culture system of *Vaccaria segetalis* hairy roots and determination of vaccarin[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2016, 47: 138-142.
- Zhang D, Jiang CL, Huang CH, et al. The light induced transcription factor FtMYB116 promotes accumulation of rutin in *Fagopyrum tataricum* [J]. Plant Cell Environ, 2019, 42: 1340-1351.
- Liu J, Ding JY, Zhou QY, et al. Studies on influence of fugal elicitor on hairy root of *Panax ginseng* biosynthesis ginseng saponin and biomass[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2004, 29:302-305.
- Lu HY, Liu JM, Zhang HC, et al. Study on induction and *in vitro* cultivation of *Glycyrrhiza uralensis* hairy root and its flavonoids production[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2011, 46:814-818.
- Yang R, Zhang JH, Sun XM, et al. Hairy root culture optimization and aucubin medical composition production of *Eucalyptus ulmoides*[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2009, 34:1902-1905.
- Yang CQ, Yang WY, Liu J. Advances on chemical ecology of plant flavonoids[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2018, 30:2009-2016.
- Liu S, Zhang JN, Jia N, et al. Analysis of active components of total flavonoids from the seeds of *Ammopiptanthus mongolicus* and its effects on immune function mice [J]. Chin Anim Husb Vet Med(中国畜牧兽医), 2019, 46: 2726-2736.
- Zhou JS, Chen H, Fang M, et al. Study on inhibitory effect of the total flavonoids from seeds of *Ammopiptanthus mongolicus* on bovine viral diarrhea virus[J]. Chin Vet Sci(中国兽医学报), 2013, 43:425-429.
- Chen H, Ning MG, Liu Y, et al. Acute toxicity of the total flavonoid from seeds of *Ammopiptanthus mongolicus* on mice [J]. J Gansu Agr Univ(甘肃农业大学学报), 2013, 48 (3):14-18.