

基于代谢组学技术分析枸杞愈伤组织抗氧化活性成分差异

曾晓倩,周笑如,刘春环,刘学*,杨成

江南大学化学与材料工程学院 合成与生物胶体教育部重点实验室,无锡 214122

摘要:采用非靶向代谢组学技术,探究不同植物生长调节剂组合对枸杞愈伤组织抗氧化活性成分富集的影响。以枸杞无菌苗茎段为外植体,分别以 0.25 mg/L 1-萘乙酸 + 0.125 mg/L 6-苄氨基嘌呤(NB)和 0.25 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸 + 0.125 mg/L 激动素(DK)为植物生长调节剂进行愈伤组织培养,以 DPPH 自由基清除法检测不同愈伤组织的抗氧化活性,在相同浓度下 NB 抗氧化活性是 DK 的 1.9 倍。基于 UHPLC-Q-TOF-MS 的代谢组学技术对两组样品进行代谢物分析,共鉴定出 752 种代谢物,其中 55 种的相对含量存在显著差异,主要为氨基酸类和糖类;KEGG 分析发现差异代谢通路主要为 ABC 转运蛋白通路。ABC 转运蛋白的功能差异可能是导致枸杞愈伤组织抗氧化活性差异显著的主要原因。

关键词:枸杞;愈伤组织;抗氧化;代谢组学;差异代谢物

中图分类号:R282.6;R914.4

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)9-1495-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.9.004

Metabolomics-based analysis on the differences in antioxidant components from callus of *Lycium barbarum* L.

ZENG Xiao-qian, ZHOU Xiao-ru, LIU Chun-huan, LIU Xue*, YANG Cheng

Key Laboratory of Synthetic and Biological Colloids, Ministry of Education, School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract: The effects of different plant growth regulator combinations on the enrichment of antioxidant components in *Lycium barbarum* L. callus were investigated by non-targeted metabolomics technique. The sterile stem segments of *L. barbarum* was used as explant, and 0.25 mg/L naphthylacetic acid + 0.125 mg/L 6-benzylaminopurine (NB) or 0.25 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid + 0.125 mg/L kinetin (DK) were used as plant growth regulators for callus culture. The antioxidant activity of different callus was detected by DPPH free radical scavenging method. The antioxidant activity of NB was 1.9 times that of DK at the same concentration. Based on the metabolomics technology of UHPLC-Q-TOF-MS, a total of 752 metabolites were identified in two groups of samples, of which 55 had significant differences in relative content, mainly amino acids and carbohydrates; KEGG analysis revealed that the differential metabolic pathway was mainly the ABC transporter pathway. The functional difference of ABC transporters may be the main reason for the significant difference in antioxidant activity of *L. barbarum* callus.

Key words: *Lycium barbarum* L.; callus; antioxidant; metabolomics; differential metabolites

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.),茄科枸杞属植物,是被载入 2020 年版《中华人民共和国药典》(后文简称《中国药典》)的中国传统药用植物^[1],因其富含多酚、生物碱等活性物质,抑菌抗炎等效果好^[2],食用与药用价值高,被我国食药监局列入首批药食同源目录,在国内外保健品商品市场中备受

青睐。由于温度、湿度等气象因子对枸杞品质的影响^[3],宁夏、青海等省一直是枸杞主产区,但传统农业生产生长周期长、人工调控难等问题仍突出,植物组织培养技术为这一难题提供了解决方案。

植物组织培养是一种在无菌及人工控制的条件下,使离体的植物器官、细胞等在适宜的培养基上再生细胞或成为完整植物的技术^[4],愈伤组织就是离体的植物器官较易诱导出的一种呈无定形状态的薄壁细胞。而根据植物细胞的全能性,枸杞愈伤组织

与天然枸杞植株具有相同的遗传信息,其化学成分与生物活性也将具有高度相似性。且与传统农业种植相比,通过植物组织培养技术诱导枸杞愈伤组织的条件更可控,愈伤组织生长周期较人工种植的枸杞也更短,因此通过植物组织培养诱导枸杞愈伤组织拓宽了枸杞资源的获取途径,利于满足枸杞市场与日增长的需求。代谢组学是研究生命体中分子质量在 1 500 Da 以内的代谢物种类、数量及其变化规律的科学,在黄芪、人参等^[5]药食两用的天然植物的成分分析中应用广泛,但目前对枸杞的成分分析仍局限于自然条件下生长的枸杞果实、花、叶等^[6]。

本研究从枸杞种子出发建立了稳定的枸杞愈伤组织培养体系,比较不同植物生长调节剂组合诱导出的愈伤组织抗氧化活性并对其进行代谢组学检测,分析愈伤组织物质组成与代谢途径,探究枸杞愈伤组织抗氧化活性代谢物来源,为枸杞资源深入开发与多元化应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

宁夏枸杞干燥果实,产自宁夏银川,购于百瑞源枸杞股份有限公司。

Murashige and Skoog 培养基(MS)(青岛海博生物技术有限公司,批号:20220307,纯度:BR);2,2-联苯基-1-苦基胍基(DPPH)(批号:B2222178,纯度:≥97%)、1-萘乙酸(NAA)(批号:J2008068,纯度:96%)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)(批号:J1924138,纯度:≥98%)、6-苄氨基嘌呤(6-BA)(批号:J2104107,纯度:≥99%)、激动素(KT)(批号:J2023136,纯度:99%)(均购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

OSE-Y50 组织研磨器(北京天根生化科技有限公司);Triple TOF 6600 质谱仪(美国爱博才思公司);1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪(美国安捷伦公司);ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm,美国沃特世公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 枸杞无菌苗培育

将大小均一的枸杞果实在水中浸泡 12 h 后去除果肉,清洗种子 3 次后再浸泡 12 h,2% NaClO 溶液浸泡 30 min,无菌水冲洗 5 次,滤纸吸干水分,接种于无菌 MS 固体培养基上培育无菌苗,温度 25 ± 1 °C,湿度 50%,光照 16 h,黑暗 8 h,培养 45 d。

1.2.2 愈伤组织培养体系建立

以枸杞无菌苗茎段为外植体,接种于添加了不

同植物生长调节剂的 MS 培养基上,其中以 0.25 mg/L NAA + 0.125 mg/L 6-BA 为植物生长调节剂组合诱导出的枸杞愈伤组织记为 NB,以 0.25 mg/L 2,4-D + 0.125 mg/L KT 为植物生长调节剂组合诱导出的枸杞愈伤组织记为 DK。每皿 4 节茎段,每段 0.5 ~ 1 cm,每一培养条件设 5 个平行。温度 25 ± 1 °C,湿度 50%,黑暗培养,45 d 后记录出愈率、愈伤组织生长量与生长形态。取 1 g 枸杞愈伤组织,接种于继代培养基上,每 7 d 称重并绘制愈伤组织生长曲线,确定继代周期。

$$\text{出愈率} = \frac{\text{诱导出愈伤组织的外植体数}}{\text{接种的外植体数}} \times 100\%$$

1.2.3 愈伤组织与枸杞种子、果实、根皮提取

取冷冻干燥后的愈伤组织、枸杞种子、果实、根皮各 2 mg 于研磨器中,70% 乙醇 1 mL,10 000 r/min 提取 1 min,40 °C 超声提取 30 min,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液待测。

1.2.4 抗氧化活性检测

将 40 μL 愈伤组织上清液与 160 μL 0.1 mmol/L DPPH 溶液加入 96 孔板中,振板 1 min,避光反应 30 min 后,于 517 nm 测吸光度(A)。对照组为提取溶剂 + DPPH 溶液,空白组为愈伤组织上清液 + Tris-HCl 缓冲液。

$$\text{DPPH 清除率} = \left(1 - \frac{A_{\text{样品组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{对照组}}}\right) \times 100\%$$

1.2.5 代谢组学检测

通过 UHPLC-Q-TOF-MS 对 NB、DK 愈伤组织提取物上清液检测,分析其代谢物变化,每组 6 个重复。其中 NB 记为 NB-1、NB-2、NB-3、NB-4、NB-5、NB-6,DK 为 DK-1、DK-2、DK-3、DK-3、DK-4、DK-5、DK-6。

色谱条件:1290 Infinity LC 超高效液相色谱系统;ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm);柱温 40 °C;流速 0.4 mL/min;进样量 2 μL;流动相为 25 mmol/L 乙酸铵水溶液(含 0.5% 甲酸)(A)、甲醇(B)。流动相洗脱程序为 0 ~ 0.5 min,5% B;0.5 ~ 10 min,5% → 100% B;10 ~ 12 min,100% B;12 ~ 12.1 min,100% → 5% B;12.1 ~ 16 min,5% B。

质谱条件:电喷雾离子化(ESI)源条件为离子源温度 600 °C,雾化气辅助加热气 60 psi,辅助加热气 60 psi,气帘气 30 psi,喷雾电压 ± 5 500 V(正负两种模式);一级质荷比检测范围为 60 ~ 1 000 Da,一级质谱扫描累积时间 0.20 s,二级子离子质荷比

检测范围为 25 ~ 1 000 Da, 二级质谱在峰强度值筛选模式采用数据依赖型采集模式 IDA 获得, 去簇电压为 ± 60 V (正、负两种模式), 碰撞能量为 35 ± 15 eV。

1.2.6 代谢组学数据处理与分析方法

原始数据经 ProteoWizard 软件由 Wiff 格式转换为 mzXML 格式, 用 MSDAIL 软件进行峰对齐、保留时间校正与提取峰面积操作。将 MSDAIL 提取得到的数据与中科新生命植物代谢组数据库中代谢物的分子质量 (误差 < 10 ppm)、保留时间、二级碎裂谱图等信息进行匹配, 鉴定代谢物结构。利用主成分分析、正交偏最小二乘法判别分析进行多元统计分析获取差异代谢物并进行生物信息学分析。

2 结果与分析

2.1 愈伤组织培养体系建立

NB 生长量与出愈率均高于 DK 且两者的生长

形态存在一定差异 (见表 1), 这是由于培养基中添加的植物生长调节剂不同。作为启动愈伤组织诱导的关键条件, 植物细胞内细胞分裂素含量较生长素高时形成新芽, 生长素含量较细胞分裂素含量高时促进生根^[4], 当生长素与细胞分裂素比例不当时会抑制愈伤组织生长甚至无法诱导出愈伤组织, 只有生长素与细胞分裂素处于一定水平时有利于愈伤组织生长、分化并影响其次生代谢物质如黄酮类物质花青素^[7]或咖啡酸、绿原酸等酚类物质^[8]的生成。枸杞愈伤组织继代培养情况如图 1 所示, NB 与 DK 继代生长曲线呈“S”型, 在继代后的 7 d 内愈伤组织生长最慢, 在 7 ~ 21 d 内进入指数生长期, 愈伤组织生长量增速最快, 培养基养分被大量消耗, 加速愈伤组织中代谢物的合成, 21 ~ 28 d, 培养基趋于耗尽, 愈伤组织质量增长减缓, 因此以 28 d 作为枸杞愈伤组织的最佳继代周期。

表 1 枸杞愈伤组织生长量、出愈率及生长形态 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Growth amount, induction rate and morphology of *L. barbarum* callus ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 Group | 生长量 Growth amount (g) | 出愈率 Induction rate (%) | 生长形态 Morphology |
|-------------|--------------------------|---------------------------|--------------------|
| NB | 4.1 ± 2.5 | 95.0 ± 11.2 | 疏松, 深黄色或白色 |
| DK | 3.5 ± 2.1 | 65.0 ± 41.8 | 紧密, 淡黄或白色 |

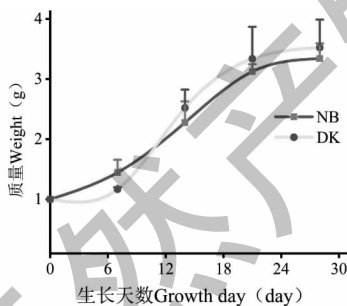


图 1 NB 与 DK 枸杞愈伤组织继代生长曲线

Fig. 1 Subculture growth curve of *L. barbarum* callus of NB and DK

2.2 枸杞愈伤组织抗氧化活性检测

抗氧化活性是枸杞具有的众多生物活性之一, DPPH 自由基清除法是一种常用的检测天然产物抗氧化活性的方法, DPPH 自由基清除率高低能在一定程度反映物质的抗氧化能力强弱。NB、DK 以及枸杞植株不同部位提取物 DPPH 自由基清除率结果如图 2 所示, NB 在质量浓度为 2 mg/mL 时 DPPH

自由基清除率最高达 74.8%, DK 在相同质量浓度时的 DPPH 自由基清除率仅为 38.6%, NB 的 DPPH 自由基清除率是 DK 的 1.9 倍, 说明 NB 更易积累抗氧化活性物质。在质量浓度 2 mg/mL 时, NB 的 DPPH 自由基清除率较自然条件生长的枸杞种子、果实、根皮更高, 可见枸杞愈伤组织抗氧化性能良好。

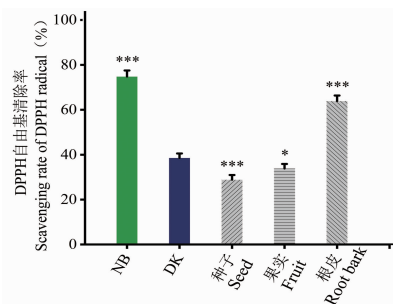


图 2 枸杞愈伤组织与植株不同部位提取物 DPPH 自由基清除率

Fig. 2 DPPH radical scavenging rate of *L. barbarum* callus and different part of *L. barbarum* extract

注: 与 DK 相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。Note: Compared with DK, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。

2.3 代谢组学分析

2.3.1 代谢物数量与分类

采用 UHPLC-Q-TOF-MS 检测分析枸杞愈伤组织中代谢物。正、负离子模式合并后共鉴定出 752 种代谢物,其中正离子模式 431 种,负离子模式 321 种,常见种类代谢物统计结果见表 2。愈伤组织中类脂的含量较高达 17.6%,而自然生长的枸杞也富含亚麻酸等必需多不饱和脂肪酸^[9]。枸杞中糖类

含量丰富,其中含量最高的是葡萄糖,其次为果糖、蔗糖^[10],甜菜碱与一类特定的多糖在《中国药典》中被作为枸杞合格标准的生物标志物^[11],而在枸杞愈伤组织中也检测到甜菜碱与大量糖类物质。此外,枸杞根皮中主要活性成分地骨皮乙素^[11]也存在于愈伤组织中,可见枸杞愈伤组织与天然枸杞植株代谢物组成具有较高的相似性。

表 2 枸杞愈伤组织代谢物在各化学分类的数量及含量占比

Table 2 Quantity and proportion of metabolites of *L. barbarum* callus in different chemical classifications

| 类别 Category | 数量 Quantity | 比例 Proportion |
|--|-------------|---------------|
| 类脂 Lipid-like molecules | 132 | 17.6% |
| 有机酸及其衍生物 Organic acids and derivatives | 69 | 9.2% |
| 萜类 Terpenes | 28 | 3.7% |
| 酚类 Phenols | 18 | 2.4% |
| 甾体及其衍生物 Steroids and derivatives | 17 | 2.3% |
| 生物碱及其衍生物 Alkaloids and derivatives | 13 | 1.7% |

2.3.2 主成分分析

主成分分析反映组间样本的总体分布趋势和组间样本的差异度。正、负离子模式下,NB 与 DK 主成分分析结果如图 3 所示,NB 与 DK 各自的 6 个生物学重复聚集在一起,说明组内样品重复性良好,两

种类型的点分离,说明 NB 与 DK 样品之间代谢物存在较明显差异。经 7 次循环交互验证,正、负离子模式下 PCA 模型解释率 $R^2 X$ 分别为 0.694、0.871,两者均接近 1,表明模型稳定。

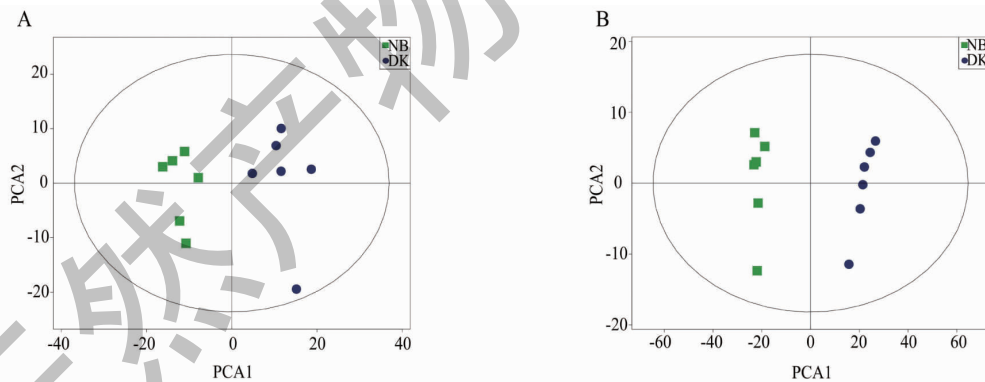


图 3 正(A)、负(B)离子模式下 NB 与 DK 的 PCA 图

Fig. 3 PCA diagram of NB and DK in positive (A) and negative (B) ion mode

2.3.3 正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)

正交偏最小二乘判别分析通过滤除与分类信息无关的噪音,将组间差异最大化,提高模型解析能力与有效性。正、负离子模式下,NB 与 DK 正交偏最小二乘判别分析结果如图 4 所示,两种类型的点组内聚集,组间分散,说明 NB 与 DK 具有明显差异。经 7 次循环交互验证,正、负离子下模型预测能力

Q^2 分别为 0.955、0.990,两者均大于 0.5,表明模型可靠。

为避免过度拟合,保证模型的有效性,对模型进行 200 次响应的置换检验,正、负离子模式下,NB 与 DK 正交偏最小二乘判别分析置换检验结果如图 5 所示,随着置换保留度逐渐降低,随机模型的 R^2 和 Q^2 均下降,说明原模型未过度拟合,模型稳定。

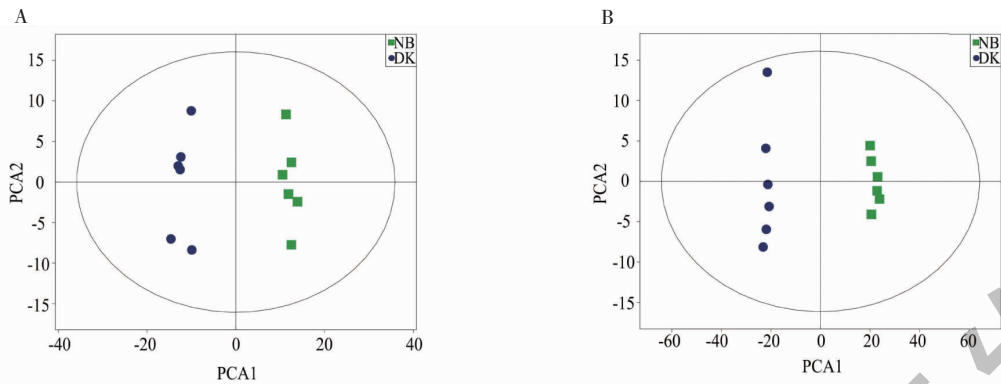


图4 正(A)、负(B)离子模式下NB与DK的OPLS-DA图

Fig. 4 OPLS-DA diagram of NB and DK in positive (A) and negative (B) ion mode

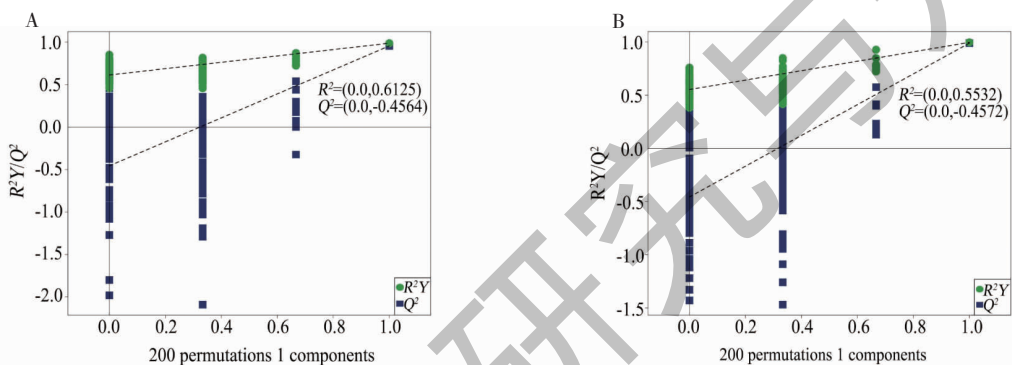


图5 正(A)、负(B)离子模式下NB与DK的OPLS-DA置换检验

Fig. 5 OPLS-DA permutation test of NB and DK in positive (A) and negative (B) ion mode

2.3.4 差异代谢物分析

以OPLS-DA模型获得的变量权重值(VIP)衡量代谢物在模型解释中贡献情况,将VIP > 1和 $P < 0.05$ 作为显著性差异代谢物筛选标准并对筛选结果进行分析,正、负离子模式下,NB与DK差异代谢物统计结果见表3。

正、负离子模式下,显著性差异代谢物层次聚类热图如图6所示,图中右侧编号对应的代谢物见表3,图内颜色种类与深浅程度反映NB、DK代谢物富集情况差异,其中橙红色代表代谢物富集,红色越深富集程度越高,蓝色相反。NB较DK共有55种差异代谢物,其中22种差异代谢物含量上调且差异倍数超1倍,上调代谢物中2种肉桂酸及其衍生物(阿魏酰-O-甲基多巴胺、顺式-咖啡酸),1种木质素苷(8-羟基松脂醇4'-葡萄糖苷)等次生代谢物均有一定的抗氧化作用,(+/-)-格罗沙酰胺可以抑制脂多糖诱导的巨噬细胞中自由基与氧化损伤的产生^[12],提升了NB的抗氧化能力,而NB较DK高11倍的

乳糖、乳果糖,虽然都是初生代谢物,不直接参与次生代谢物合成,但通过糖酵解、三羧酸循环、磷酸戊糖途径、莽草酸途径等初生代谢途径也可以促进次生代谢物生成,Zhong等^[13]也发现碳水化合物的积累能够促进次生代谢物穿心莲内酯的生物合成。此外,NB中咖啡酸乙酯含量比DK高55倍(VIP > 1, $P = 0.087$),而咖啡酸乙酯抗氧化能力强^[14],且具有高于原儿茶醛的 α 淀粉酶抑制活性,可减缓碳水化合物分解成单糖^[15],降糖活性良好,是一种潜在的植物源活性物。

KEGG分析结果如图7所示,NB中显著性差异代谢物蔗糖、D-氨基葡萄糖、谷氨酰胺、亮氨酸、环磷酸腺苷、胆碱等主要富集在氨基酸的生物合成、ABC转运蛋白、甘油磷脂代谢、氨酰-tRNA生物合成等20条通路。气泡大小表示该通路在拓扑分析中的影响因子大小,气泡越大代表影响因子越大,气泡颜色反映富集分析的 P 值大小,颜色越深, P 值越小,富集程度越显著。由此可见,ABC转运蛋白、氨酰-tRNA

表3 正、负离子模式下NB与DK差异代谢物统计结果

Table 3 Statistical results of differential metabolites between NB and DK in positive and negative ion modes

| 编号 No. | 代谢物 Metabolite | 化学式 Formula | 离子模式 Ion mode | VIP | FC | P 值 |
|-----------|---|---|------------------|------|------|-------------------------|
| 1 | 8-羟基松脂醇 4'-葡萄糖苷 8-Hydroxy Pinoresinol 4'-glucoside | C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂ | + | 1.67 | 1.97 | 2.31 × 10 ⁻³ |
| 2 | 吡咯烷-1-鎗-2-羧酸盐 Pyrrolidin-1-ium-2-carboxylate | C ₅ H ₉ NO ₂ | + | 1.62 | 6.78 | 6.88 × 10 ⁻⁴ |
| 3 | 丙基 2-O-β-D-吡喃木糖基-β-D-吡喃葡萄糖苷 Propyl 2-O-β-D-xylopyranosyl-β-D-glucopyranoside | C ₁₄ H ₂₆ O ₁₀ | + | 2.73 | 2.51 | 4.22 × 10 ⁻³ |
| 4 | 异麦芽酮糖 Palatinose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | + | 5.89 | 8.76 | 6.61 × 10 ⁻⁴ |
| 5 | β-麦芽糖 β-Maltose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | + | 2.74 | 8.36 | 5.36 × 10 ⁻⁴ |
| 6 | 环磷酸腺苷 Cyclic AMP | C ₁₀ H ₁₂ N ₅ O ₆ P | + | 2.77 | 1.72 | 2.83 × 10 ⁻⁴ |
| 7 | D-氨基葡萄糖 D-Glucosamine | C ₆ H ₁₃ NO ₅ | + | 2.29 | 10.4 | 2.33 × 10 ⁻⁵ |
| 8 | 蔗糖 Sucrose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | + | 2.49 | 6.22 | 7.05 × 10 ⁻⁵ |
| 9 | 表小檗碱 Epiberberine | C ₂₀ H ₁₈ NO ₄ ⁺ | + | 1.25 | 1.84 | 1.48 × 10 ⁻⁴ |
| 10 | 3-[3-羟基-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-三羟基-6-羟甲基氧杂环-2-基]氧苯基]丙酸 3-[3-Hydroxy-2-[(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyphenyl]propanoic acid | C ₁₅ H ₂₀ O ₉ | + | 1.67 | 6.37 | 8.05 × 10 ⁻³ |
| 11 | 亮氨酸 Leucine | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | + | 1.23 | 4.5 | 1.35 × 10 ⁻³ |
| 12 | 岩藻甾醇 Fucosterol | C ₂₈ H ₄₆ O | + | 2.56 | 0.12 | 2.75 × 10 ⁻⁴ |
| 13 | 谷氨酰胺类似物 Glutamine analogue | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ | + | 1.54 | 7.08 | 1.17 × 10 ⁻³ |
| 14 | 顺式-咖啡酸 cis-Caffeic acid | C ₉ H ₈ O ₄ | + | 1.33 | 1.42 | 2.72 × 10 ⁻³ |
| 15 | 12,19,20-三羟基-14-亚甲基香叶基内醇 12,19,20-Trihydroxy-14-methylenegeranylnerol | C ₂₁ H ₃₈ O ₄ | + | 1.3 | 1.99 | 1.24 × 10 ⁻² |
| 16 | 甜菜碱 Betaine | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | + | 1.19 | 2.36 | 3.16 × 10 ⁻² |
| 17 | (6β,22E)-6-羟基豆甾-4,22-二烯-3-酮 (6β,22E)-6-Hydroxystigmasta-4,22-dien-3-one | C ₂₉ H ₄₆ O ₂ | + | 1.06 | 0.61 | 4.18 × 10 ⁻² |
| 18 | 沙耶恩苷 Sajaenoside | C ₁₉ H ₂₈ O ₁₀ | + | 1.97 | 0.25 | 5.56 × 10 ⁻³ |
| 19 | 8-[3-氧代-2-[(E)-戊-2-烯基]环戊烯基-1-基]辛酸 8-[3-Oxo-2-[(E)-pent-2-enyl]cyclopenten-1-yl]octanoic acid | C ₁₈ H ₂₈ O ₃ | + | 1.49 | 0.21 | 5.84 × 10 ⁻³ |
| 20 | 1-十七烷酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 1-Heptadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P | + | 1.07 | 0.33 | 3.86 × 10 ⁻³ |
| 21 | 阿魏酰 O-甲基多巴胺 Feruloyl O-methyldopamine | C ₁₉ H ₂₁ NO ₅ | + | 1.3 | 4.42 | 2.04 × 10 ⁻² |
| 22 | (2-羟基-3-十八烷-6,9,12-三烯酰氧基丙基)2-(三甲基铵)乙基磷酸酯 (2-Hydroxy-3-octadeca-6,9,12-trienyloxypropyl) 2-(trimethylazaniumyl) ethyl phosphate | C ₂₆ H ₄₈ NO ₇ P | + | 1.67 | 0.31 | 1.11 × 10 ⁻² |
| 23 | 1-十六烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺 1-Hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine | C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P | + | 1 | 0.39 | 1.16 × 10 ⁻² |
| 24 | 1-硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸胆碱 1-Stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P | + | 2.3 | 0.28 | 6.77 × 10 ⁻³ |
| 25 | (6aR,9R,9aR)-9-乙酰基-3-[(1E,3E,5S)-3,5-二甲基庚-1,3-二烯基]-6a-甲基-9,9a-二氢呋喃[2,3-h]异色烯-6,8-二酮 (6aR,9R,9aR)-9-Acetyl-3-[(1E,3E,5S)-3,5-dimethylhepta-1,3-dienyl]-6a-methyl-9,9a-dihydrofuro[2,3-h]isochromene-6,8-dione | C ₂₃ H ₂₆ O ₅ | + | 1.07 | 0.09 | 1.21 × 10 ⁻⁴ |
| 26 | 豆甾醇 Stigmasterol | C ₂₉ H ₄₈ O | + | 11.2 | 0.53 | 1.39 × 10 ⁻² |
| 27 | 24-亚甲基胆固醇-8-烯-3β-醇 24-Methylene-cholest-8-en-3β-ol | C ₂₈ H ₄₆ O | + | 4.02 | 0.44 | 1.71 × 10 ⁻² |
| 28 | 3-(2,5-辛二烯基)氧辛酸 3-(2,5-Octadienyl)-oxiraneoctanoic acid | C ₁₈ H ₃₀ O ₃ | + | 1.15 | 0.33 | 1.20 × 10 ⁻³ |

续表 3 (Continued Tab. 3)

| 编号 No. | 代谢物 Metabolite | 化学式 Formula | 离子模式 Ion mode | VIP | FC | P 值 |
|-----------|---|---|------------------|------|------|-------------------------|
| 29 | 6- 9a,11a-二甲基-1 <i>H</i> ,2 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,3a <i>H</i> ,3b <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,8 <i>H</i> ,9 <i>H</i> ,9a <i>H</i> ,9b <i>H</i> ,10 <i>H</i> ,11 <i>H</i> ,11a <i>H</i> -环戊[<i>a</i>]菲-1-基 -3-乙基-2-甲基庚烷 6- 9a,11a-Dimethyl-1 <i>H</i> ,2 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,3a <i>H</i> ,3b <i>H</i> ,4 <i>H</i> ,8 <i>H</i> ,9 <i>H</i> ,9b <i>H</i> ,10 <i>H</i> ,11 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-1-yl -3-ethyl-2-methylheptane | C ₂₉ H ₄₈ | + | 4.49 | 0.32 | 1.79 × 10 ⁻⁴ |
| 30 | 4-乙酰基-2-羟基苯基 2- <i>O</i> -β- <i>D</i> -呋喃果糖基-β- <i>D</i> -吡喃木糖苷 4-Acetyl-2-hydroxyphenyl 2- <i>O</i> -β- <i>D</i> -fructofuranosyl-β- <i>D</i> -xylopyranoside | C ₁₉ H ₂₆ O ₁₂ | + | 1.57 | 0.16 | 8.09 × 10 ⁻⁴ |
| 31 | 菜油甾醇 Campesterol | C ₂₈ H ₄₈ O | + | 1.82 | 0.26 | 1.01 × 10 ⁻³ |
| 32 | 6-[3-[(3,4-二甲氧基苯基)甲基]-4-甲氧基-2-甲氧基甲基丁基]-4-甲氧基-1,3-苯并二氧杂环戊烯 6-[3-[(3,4-Dimethoxyphenyl)methyl]-4-methoxy-2-(methoxymethyl)butyl]-4-methoxy-1,3-benzodioxole | C ₂₄ H ₃₂ O ₇ | + | 1.96 | 0.56 | 4.93 × 10 ⁻² |
| 33 | 托芬甾醇 A2 Topsentisterol A2 | C ₂₉ H ₄₈ O ₃ | + | 1.01 | 0.57 | 2.87 × 10 ⁻² |
| 34 | 胆碱 Choline | C ₅ H ₁₄ NO | + | 3.11 | 0.51 | 2.08 × 10 ⁻² |
| 35 | 姜辣素 Gingerol | C ₁₇ H ₂₆ O ₄ | - | 2.44 | 0.88 | 8.47 × 10 ⁻³ |
| 36 | <i>N</i> -乙酰基- <i>L</i> -苯丙氨酸 <i>N</i> -Acetyl- <i>L</i> -phenylalanine | C ₁₁ H ₁₃ NO ₃ | - | 1.68 | 0.24 | 9.81 × 10 ⁻⁴ |
| 37 | 9-氢过氧基-(<i>Z</i> , <i>Z</i> , <i>Z</i>)-10,12,15-十八碳三烯酸 9-Hydroperoxy-(<i>Z</i> , <i>Z</i> , <i>Z</i>)-10,12,15-octadecatrienoic acid | C ₁₈ H ₃₀ O ₄ | - | 1.04 | 0.43 | 3.88 × 10 ⁻³ |
| 38 | 2-氮杂环乙基(3-十六烷酰氧基-2-羟丙基)磷酸酯 2-Azaniumylethyl (3-hexadecanoyloxy-2-hydroxypropyl) phosphate | C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P | - | 1.45 | 0.4 | 1.15 × 10 ⁻² |
| 39 | 1-棕榈酰磷脂酰胆碱 1-Palmitoylphosphatidylcholine | C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P | - | 1.41 | 0.32 | 8.74 × 10 ⁻³ |
| 40 | [3-[2-氨基乙氧基(羟基)磷酰基]氧基-2-羟丙基]十八烷-9,12-二烯酸酯 [3-[2-Aminoethoxy(hydroxy)phosphoryl]oxy-2-hydroxypropyl] octadeca-9,12-dienoate | C ₂₃ H ₄₄ NO ₇ P | - | 1.27 | 0.44 | 8.19 × 10 ⁻³ |
| 41 | 7,8-二羟基十八烷-9,12,15-三烯酸 7,8-Dihydroxyoctadeca-9,12,15-trienoic acid | C ₁₈ H ₃₀ O ₄ | - | 1.5 | 0.37 | 9.66 × 10 ⁻³ |
| 42 | (10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-9-羟基十八烷-10,12,15-三烯酸 (10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> ,15 <i>Z</i>)-9-Hydroxyoctadeca-10,12,15-trienoic acid | C ₁₈ H ₃₀ O ₃ | - | 7.96 | 0.28 | 1.68 × 10 ⁻³ |
| 43 | 2-[[3,4-二羟基-4-羟甲基氧杂环己烷-2-基]氧基甲基]-6-苯基甲氧烷-3,4,5-三醇 2-[[3,4-Dihydroxy-4-(hydroxymethyl)oxolan-2-yl]oxymethyl]-6-phenylmethoxyoxane-3,4,5-triol | C ₁₈ H ₂₆ O ₁₀ | - | 1.49 | 0.26 | 1.93 × 10 ⁻⁴ |
| 44 | 色氨酸 Tryptophan | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | - | 1.4 | 0.18 | 3.17 × 10 ⁻⁴ |
| 45 | 泛酸钙 Calcium pantothenate | C ₉ H ₁₇ NO ₅ · 1/2 Ca | - | 1.06 | 0.28 | 2.59 × 10 ⁻⁵ |
| 46 | 十七烷酸 Heptadecanoic acid | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | - | 1.37 | 0.66 | 2.04 × 10 ⁻² |
| 47 | 补骨脂乙素 Isobavachalcone | C ₂₀ H ₂₀ O ₄ | - | 1 | 0.78 | 6.41 × 10 ⁻⁴ |
| 48 | 富马酸 Fumaric acid | C ₄ H ₄ O ₄ | - | 1.08 | 0.78 | 4.24 × 10 ⁻² |
| 49 | 反式-11-十八烯酸 <i>trans</i> -11-Octadecenoic acid | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | - | 2.06 | 0.87 | 3.76 × 10 ⁻³ |
| 50 | 乳果糖 Lactulose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | - | 8.65 | 11.6 | 4.77 × 10 ⁻⁷ |
| 51 | 乳糖 Lactose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | - | 8.3 | 12 | 1.54 × 10 ⁻⁶ |
| 52 | 2-羟基丙烷-1,2,3-三羧酸 2-Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid | C ₆ H ₈ O ₇ | - | 1.53 | 2.99 | 9.75 × 10 ⁻⁴ |
| 53 | 谷氨酰胺 Glutamine | C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ | - | 1.48 | 9.34 | 1.86 × 10 ⁻⁴ |
| 54 | <i>D</i> -葡萄糖 <i>D</i> -Glucose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | - | 1.63 | 7.25 | 1.29 × 10 ⁻³ |
| 55 | (+/-)-格罗沙酰胺 (+/-)-Grossamide | C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O ₈ | - | 1.32 | 2.77 | 1.85 × 10 ⁻⁴ |

生物合成、氨基酸的生物合成通路富集程度最为显著,对愈伤组织物质合成影响最大。其中,ABC 转运蛋白是植物中最大的转运蛋白家族之一,位于植

物液泡、线粒体和叶绿体膜上,由 ATP 直接供能^[16],参与调节植物体内生长、发育以及对营养物质的摄取、对生物和非生物胁迫的耐受性、植物激

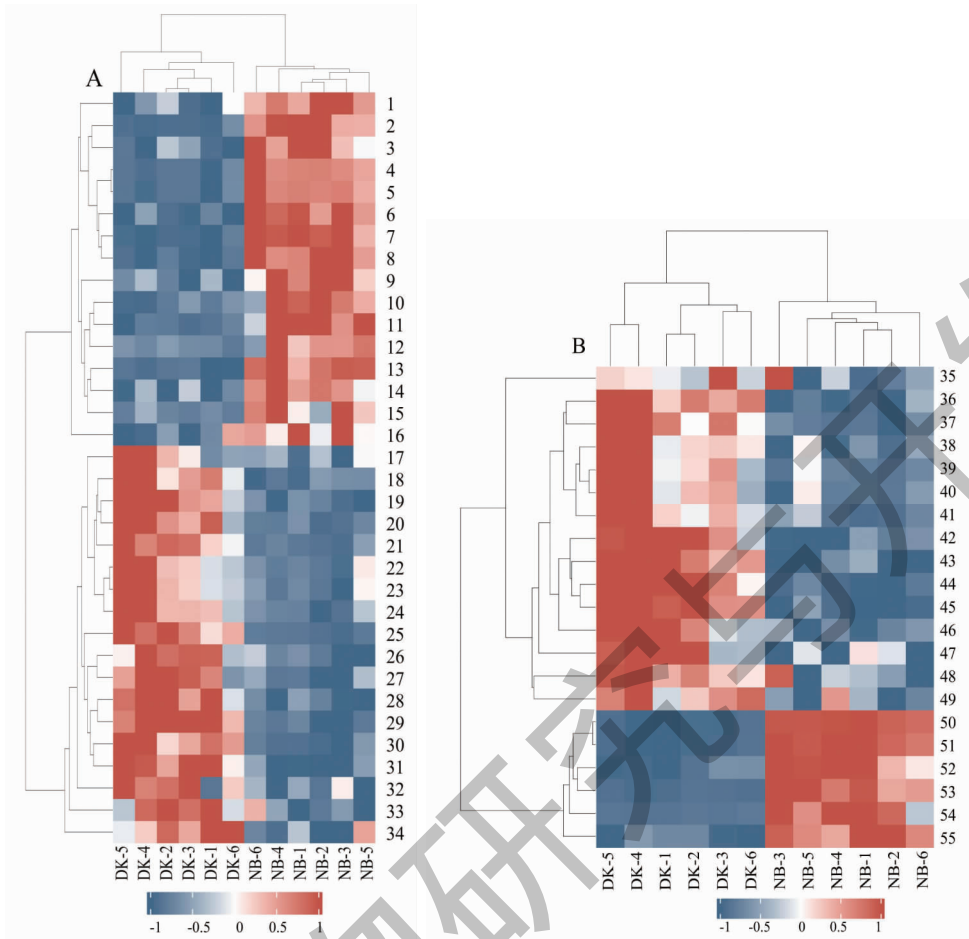


图 6 正(A)、负(B)离子模式下显著性差异代谢物层次聚类热图

Fig. 6 Hierarchical clustering heat map of differential metabolites in positive (A) and negative (B) ion mode

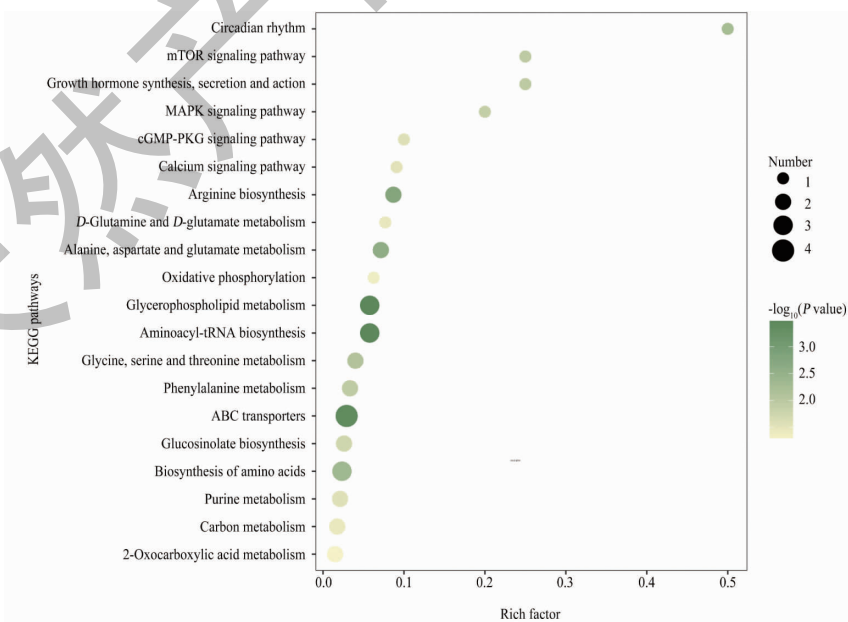


图 7 KEGG 富集通路图

Fig. 7 KEGG enrichment pathway diagram

素、初生与次生代谢物质的运输等多种生物学过程^[17]。显著性差异代谢物谷氨酰胺、亮氨酸、蔗糖、谷氨酰胺、胆碱富集于 ABC 转运蛋白通路上,谷氨酰胺、亮氨酸、色氨酸富集于氨酰-tRNA 生物合成以及氨基酸的生物合成通路上。

谷氨酰胺作为无机氮源氮同化的主要产物,也是植物氮代谢的核心代谢产物^[18],由葡萄糖经多个初生代谢途径合成,是生物体内含量丰富的氨基酸,NB 高蔗糖水平或是导致其谷氨酰胺的水平较 DK 更高的原因。谷氨酰胺与植物体内的氮调节密切相关,不同形态的氮促进药用植物不同种类代谢物的生物合成,但具体作用机制仍有待研究。由于调节氮代谢可减少碳水化合物的消耗,对植物生长与代谢物合成积累具有协同作用^[13],枸杞愈伤组织中的谷氨酰胺可能对地骨皮乙素这一重要含氮代谢物的生物合成具有重要调控作用。Sun 等^[19]发现亮氨酸可以通过改善氧化损伤从而增强抗氧化活性。此外,色氨酸在高等植物中广泛存在,作为前体物质可合成内源生长素吲哚乙酸来间接调控代谢物合成,Kahveci 等^[20]发现外源色氨酸促进酚类物质的合成。

上述三条代谢通路中富集的代谢物多为初生代谢物,初生代谢物在 ABC 转运蛋白、氨酰-tRNA 生物合成以及氨基酸的生物合成代谢通路上的显著富集反映出 NB 活跃的初生代谢物物质合成、运输水平,它们可以直接参与植物生命活动过程,为其提供能量,也可进一步生成次生代谢物所需的原料与前体,间接调控具有良好生物活性的酚类、生物碱等代谢物的生成,从而对愈伤组织的抗氧化活性产生影响。虽然植物细胞内物质转运是一个动态且复杂过程,其具体的作用机制仍未明确,但已有研究表明,ABC 转运蛋白不仅在植物营养和生殖发育中发挥作用,还可以参与调控次生代谢物花青素的积累^[21],因为 ABC 转运蛋白介导的细胞内转运是花青素积累的重要限速步骤,转运蛋白的向内和向外交替的构象结构被认为可以调节底物结合或释放^[22]。因此,初步推断 ABC 转运蛋白功能差异可能是导致不同植物生长调节剂组合诱导出的枸杞愈伤组织抗氧化活性差异显著的主要原因。

3 讨论与结论

从枸杞种子培育无菌苗获取茎段作为诱导愈伤组织的外植体,建立了稳定的枸杞愈伤组织培养体系,并得到高抗氧化活性枸杞愈伤组织 NB。通过非

靶向代谢组学分析了枸杞愈伤组织的物质成分及其代谢通路差异,发现枸杞愈伤组织共有 752 种化合物,与天然植株在活性成分上也具有相似性且抗氧化活性较天然植株更佳。与 DK 相比,NB 中 55 种代谢物存在显著差异,其中 22 种代谢物含量上调,包括抗氧化活性良好的甜菜碱^[23]等次生代谢物。此外,NB 的乳糖、乳果糖较 DK 高 11 倍,这些糖类作为初生代谢物,可以利用糖苷酶水解作用转化为单糖,通过糖异生途径生成重要抗氧化剂谷胱甘肽的前体物质谷氨酰胺等^[24],间接地促进枸杞愈伤组织次生代谢产物的生成及抗氧化能力的增强。KEGG 结果表明,显著差异代谢物富集于 20 条代谢通路中,主要通过 ABC 转运蛋白、甘油磷脂代谢、氨酰-tRNA 生物合成、氨基酸的生物合成通路直接或间接调控枸杞愈伤组织生长及代谢物合成。

在已检测出的 55 种差异代谢物中,甜菜碱与有机酸研究广泛,而表小檗碱等次生代谢物鲜见研究,且表小檗碱具有良好的减少脂质积累^[25]的作用,对人体健康极具益处。目前,通过控制外源条件对愈伤组织代谢物进行定向诱导,可以富集特定代谢物并利用分离纯化手段获取安全可靠的植物源天然活性物。Khanam 等^[26]通过添加化学结构不同的植物生长调节剂提高了薄荷油的产量,可见植物次生代谢物调控具有可行性,植物组织培养有望成为枸杞资源的重要获取途径,为枸杞资源的开发尤其是次生代谢物的工业化生产提供借鉴。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia: Vol I (中华人民共和国药典:第一部) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020; 260.
- 2 Lan T, Huang YP, Liang QP, et al. Study on chemical constituents from root and stem of *Lycium barbarum* L. [J]. Nat Prod Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1491-1497.
- 3 Li YP, Zeng SH, Li F, et al. Variation of kukoamine A (KuA) and B (KuB) contents and related meteorological factors for Cortex Lycii Radicis of different areas [J]. Biochem Syst Ecol, 2020, 88: 103985.
- 4 Phillips GC, Garda M. Plant tissue culture media and practices: an overview [J]. In Vitro Cell Dev Biol-Plant, 2019, 55: 242-257.
- 5 Guo Q, Niu WL, Li XJ, et al. Study on hypoglycemic effect of the drug pair of Astragalus Radix and Dioscoreae Rhizoma in T2DM Rats by network pharmacology and metabonomics

- [J]. *Molecules*, 2019, 24:4050.
- 6 Qian D, Zhao YX, Yang G, et al. Systematic review of chemical constituents in the genus *Lycium* (Solanaceae) [J]. *Molecules*, 2017, 22:911.
 - 7 Ji XH, Wang YT, Zhang R, et al. Effect of auxin, cytokinin and nitrogen on anthocyanin biosynthesis in callus cultures of red-fleshed apple (*Malus sieversii* f. *niedzwetzkyana*) [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2015, 120:325-337.
 - 8 Karakas FP. Efficient plant regeneration and callus induction from nodal and hypocotyl explants of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) and comparison of phenolic profiles in calli formed under different combinations of plant growth regulators [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2020, 146:384-391.
 - 9 Covaci E, Senila M, Leopold LF, et al. Characterization of *Lycium barbarum* L. berry cultivated in North Macedonia: a chemometric approach [J]. *J Berry Res*, 2020, 10:1-19.
 - 10 Spano M, Maccelli A, Di Matteo G, et al. Metabolomic profiling of fresh Goji (*Lycium barbarum* L.) berries from two cultivars grown in central Italy: a multi-methodological approach [J]. *Molecules*, 2021, 26:5412.
 - 11 Zhao Q, Li LH, Zhu Y, et al. Kukoamine B ameliorate insulin resistance, oxidative stress, inflammation and other metabolic abnormalities in high-fat/high-fructose-fed rats [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13:1843-1853.
 - 12 Zhao WL, Xu D, Hong W, et al. Grossamide attenuates inflammation by balancing macrophage polarization through metabolic reprogramming of macrophages in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 112:109190.
 - 13 Zhong C, Jian SF, Chen DL, et al. Organic nitrogen sources promote andrographolide biosynthesis by reducing nitrogen metabolism and increasing carbon accumulation in *Andrographis paniculata* [J]. *Plant Physiol Bioch*, 2021, 164:82-91.
 - 14 Jahanbani P, Nasserli S, Mojarrab M. Antioxidant activity-guided phytochemical investigation of *Artemisia aucheri* Boiss. isolation of ethyl caffeate and a spinacetin glycoside [J]. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20:82-90.
 - 15 Dan L, Mu TH, Sun HN. Profiling of phenolic acids and flavonoids in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves and evaluation of their anti-oxidant and hypoglycemic activities [J]. *Food Biosci*, 2021, 39:100801.
 - 16 Do THT, et al. Functions of ABC transporters in plant growth and development [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 41:32-38.
 - 17 Anil D, et al. Role of ABC transporters in maintaining plant homeostasis under abiotic and biotic stresses [J]. *Physiol plant*, 2021, 171:785-801.
 - 18 Vasuki RC, Elena E, Tatjana L, et al. A Widespread glutamine-sensing mechanism in the plant kingdom [J]. *Cell*, 2014, 159:977-978.
 - 19 Sun MX, Li SH, Gong QT, et al. Leucine contributes to copper stress tolerance in peach (*Prunus persica*) seedlings by enhancing photosynthesis and the antioxidant defense system [J]. *Antioxidants*, 2022, 11:2455.
 - 20 Kahveci H, Bilginer N, Diraz-Yildirim E, et al. Priming with salicylic acid, β -carotene and tryptophan modulates growth, phenolics and essential oil components of *Ocimum basilicum* L. grown under salinity [J]. *Sci Hort*, 2021, 281:109964.
 - 21 Sylvia C, Sun JL, Zhang YQ, et al. Genome-wide analysis of atp binding cassette (ABC) transporters in peach (*Prunus persica*) and Identification of a gene PpABCC1 involved in anthocyanin accumulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24:1931-1931.
 - 22 Beis K. Structural basis for the mechanism of ABC transporters [J]. *Biochem Soc T*, 2015, 43:889-893.
 - 23 Zhang MM, Zhang H, Li HX, et al. Antioxidant mechanism of betaine without free radical scavenging ability [J]. *J Agr Food Chem*, 2016, 64:7921-7930.
 - 24 Miller RA, Shi Y, Lu W, et al. Targeting hepatic glutaminase activity to ameliorate hyperglycemia [J]. *Nat Med*, 2018, 24:518-524.
 - 25 Choi JS, Kim JH, Ali MY, et al. Anti-adipogenic effect of epiberberine is mediated by regulation of the Raf/MEK1/2/ERK1/2 and AMPK α /Akt pathways [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38:2153-2162.
 - 26 Khanam D, Mohammad F. Effect of structurally different plant growth regulators (PGRs) on the concentration, yield, and constituents of peppermint essential oil [J]. *J Herbs Spices Med Plants*, 2017, 23:26-35.