

基于 GC-MS 的 3 种龙胆属植物的代谢差异分析

武文雅, 吴可心, 张 迈, 穆立蔷*

(东北林业大学 林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:为明确中药龙胆的可入药植物即龙胆、三花龙胆及条叶龙胆根部活性成分的差异及 3 种龙胆的叶片是否具有开发利用价值,通过气相色谱—质谱联用(GC-MS)技术进行相关代谢物数据采集,根据非靶向代谢组学对 3 种龙胆根部及叶片的化学组成成分进行研究。采用无监督模式的主成分分析(PCA)、单变量与多元统计分析相结合的偏最小二乘法(PLS-DA)分析和差异代谢物相对含量的聚类分析。结果表明,PCA 可对 3 种龙胆根部及 3 种龙胆叶片进行明显的区分;PLS-DA 分析及聚类分析结果显示在龙胆、三花龙胆、条叶龙胆根部发现了 58 种差异代谢物,叶片中发现了 46 种差异代谢物,其中大部分代谢物在龙胆中的积累量高于三花龙胆及条叶龙胆。通过 KEGG 富集通路分析发现 L-脯氨酸和 L-丙氨酸均参与了 ABC 转运蛋白途径,且这 2 种代谢物在龙胆根部及叶片中均表现为上调,龙胆在抗逆性能及抵御外界病菌能力上优于三花龙胆及条叶龙胆,因此累积下来的化学成分含量也高于三花龙胆及条叶龙胆。研究结果为中药龙胆药原植物的开发利用提供了理论依据。

关键词:龙胆;三花龙胆;条叶龙胆;代谢组学;GC-MS

中图分类号:Q949.776

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2023)06-0203-08

Metabolic Difference Analysis of Three *Gentiana* Species Based on GC-MS

WU Wen-ya, WU Ke-xin, ZHANG Mai, MU Li-qiang*

(College Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to understand the difference of active components in the roots of the medicinal plants of three *Gentiana* species, including *G. scabra*, *G. triflora* and *G. manshurica*, and whether the leaves of the three have medicinal value of development and utilization, this study collected the related metabolite data through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and studied the chemical components of the roots and leaves of the three based on non-targeted metabolomics. The unsupervised principal component analysis (PCA), partial least squares analysis (PLS-DA) combined with univariate and multivariate statistical analysis, and cluster analysis of relative content of differential metabolites were used. The results showed that PCA could distinguish the roots and leaves of three *Gentiana* species; by PLS-DA analysis and cluster analysis, 58 different metabolites were found in the roots of *Gentiana* species, and 46 different metabolites were found in the leaves, of which most of the metabolites accumulated in *G. scabra* were higher than those in *G. triflora* and *G. manshurica*. Through the analysis of KEGG enrichment pathway, it was found that L-proline and L-alanine were involved in the ABC transporter pathway, and these two metabolites were up-regulated in the roots and leaves of *G. scabra*. *G. scabra* was superior to *G. triflora* and *G. manshurica* in terms of stress resistance and resistance to external bacteria, so the content of chemical components accumulated was also higher than *G. triflora* and *G. manshurica*. This study provides a theoretical

收稿日期:2022-09-26 修回日期:2022-11-16

基金项目:国家科技基础性资源专项(2019FY100505)。

第一作者:武文雅。研究方向:森林植物资源学。E-mail:1806334106@qq.com

*通信作者:穆立蔷,博士生导师,教授。研究方向:森林植物资源学。E-mail:mlq0419@163.com

basis for the development and utilization of the original plant of *G. scabra*.

Key words: *Gentiana scabra*; *Gentiana triflora*; *Gentiana manshurica*; metabonomics; GC-MS

龙胆(*Gentiana scabra*)、三花龙胆(*Gentiana triflora*)、条叶龙胆(*Gentiana manshurica*)都为龙胆科龙胆属多年生草本植物,龙胆又名粗糙龙胆、龙胆草、山龙胆;条叶龙胆又名东北龙胆^[1-2]。3种龙胆均主要分布在黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地,生于草地、湿草地及林下等地^[3]。中华人民共和国药典2020版记载以上3种龙胆的根及根茎皆为中药龙胆的可入药材料,中药龙胆味苦、性寒、归肝、胆经^[4]。其特征性成分及主要的药用成分为环烯醚萜类化合物、三萜类化合物及口山酮类化合物^[5-6]。在现代医学中可治疗急性传染性肝炎、高血压、头晕耳鸣、胆囊炎及由人类病原性真菌引起的疾病等症,是保肝利胆的良药^[7-8]。

代谢组学从2000年左右提出概念,到现在,特别是最近几年,保持快速的发展势头。代谢物是中药发挥作用的载体,代谢组学在中医药领域有着非常广阔的应用^[9]。药用植物代谢组学是以药用植物为研究对象,采用各种化学分析手段,全局性分析药用植物小分子代谢产物,从整体上定性、定量测定基因或环境对代谢物的影响,从而解析代谢物的代谢合成途径、代谢物网络及调控机制^[10-11]。研究内容主要包括药用植物的鉴别和质量评价,药用植物品种选育及抗逆研究,初生、次生代谢途径解析,代谢网络、代谢工程研究及合成生物学研究等几个方面,最终为药用植物品种选育、创新药物研发和质量安全性评价奠定基础^[12]。

近年来其药原植物也受到了相应的重视,但大多数都集中在龙胆的研究上,对三花龙胆和条叶龙胆的研究相对较少,这3种龙胆在其成分及成分含量上存在何种差异,本研究将采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)技术并运用代谢组学的分析方法对其挥发性成分进行定性和定量分析。龙胆属植物以往都是根部被广泛研究利用,但也有研究发现龙胆属植物的叶片中也含有可被开发利用的化学成分^[13],所以在本研究中把3种龙胆的叶片也作为研究对象,探究其初级代谢产物,并比较3种龙胆叶片初级代谢产物的差异。龙胆作为一种重要的中药材,在临床医学中被广泛应用,了解其不同药原植物的成分差异,对中药龙胆的开发利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

3种植物样本均于2021年9月采自黑龙江省

牡丹江市宁安市小北湖保护区,选取生长环境基本一致,生长年限及长势基本相同的龙胆、三花龙胆、条叶龙胆各10株,每个样本分别采集3个生物学重复,将其根部和叶片取下洗净晾干后冻干备用。

1.2 样品制备

样品制备参照刘洋^[14]成熟的GC-MS样品前处理方法,使用安捷伦7890气相色谱仪和飞行时间质谱仪进行GC-MS分析。参考李彤彤等^[15]与周妮等^[16]的分析条件。系统采用DB-5MS毛细管柱,以无分流模式注入1 μ L样品。使用氦气作为载气,通过色谱柱的气体流速为1 mL/min。注入、传输线和离子源温度分别为280、280、250 $^{\circ}$ C。在电子碰撞模式下,能量为-70 eV。溶剂延迟6.35 min后,以每12.5个/s光谱的速率,在m/z范围为50~500的全扫描模式下获得质谱数据。

1.3 数据分析

将GC-MS下机数据导入excel进行整理,将整理后的数据矩阵导入SIMCA-P(Umet-rics, Umea, 瑞典)软件,对所测代谢物进行主成分分析(PCA)并执行多元回归偏最小二乘判别分析(PLS-DA)。为找到更准确的差异代谢物,选择PLS-DA模型投影中变量对分组贡献得分(VIP值)>1且单因素方差分析结果显著($P < 0.05$)的阈值来筛选差异代谢物。将筛选出的差异代谢物输入到KEGG数据库(<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>),对代谢途径进行富集和筛选。GC-MS代谢组学数据均使用Microsoft Excel 2019和SPSS 25.0软件进行统计分析(采用单因素方差分析法),使用SIMCA-P软件和微生信在线绘图。

2 结果与分析

2.1 PCA分析

2.1.1 龙胆、三花龙胆、条叶龙胆根部主成分分析
主成分分析(PCA)是一种无监督模式的分析方法,是在不对样品进行预先分组情况下进行的数据分析。3种龙胆根部代谢物的PCA得分情况如图1A所示,主成分累积贡献率为74%。对代谢物采取降维的方法通过少数几个主成分来考察多个样本之间的关联性,图1A显示3种龙胆根部代谢物在坐标轴上是分开的,表明3种龙胆根部代谢物存在差异。PCA载荷图(图1B)显示将3种龙胆区分开来的代谢物包括塔罗糖、蔗糖、丁二酸、肌醇、D-果糖、柠檬酸、无水草酸、缬氨酸、景天庚酮糖、乳酸及D-甘露糖等。

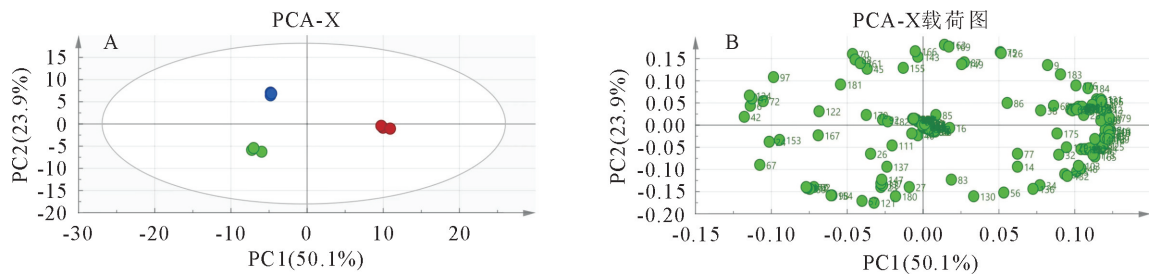


图 1 A:龙胆、三花龙胆、条叶龙胆根部 PCA 得分;B:龙胆、三花龙胆、条叶龙胆根部 PCA 载荷

Fig. 1 A:PCA score chart of root of *G. scabra*,*G. triflora* and *G. manshurica* ;
B:PCA load diagram of root of *G. scabra*,*G. triflora* and *G. manshurica*

2.1.2 龙胆、三花龙胆、条叶龙胆叶片主成分分析

龙胆、三花龙胆和条叶龙胆叶片代谢物的 PCA 得分情况如图 2A 所示,主成分累积贡献率为 55.5%,表明 3 种龙胆叶片代谢物也存在明显的差异。PCA

载荷图(图 2B)显示将 3 种龙胆区分开来的代谢物包括 3 α -甘露二糖、咖啡酸、柠檬酸、葡萄糖、甘氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-异亮氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、L-缬氨酸及塔罗糖等。

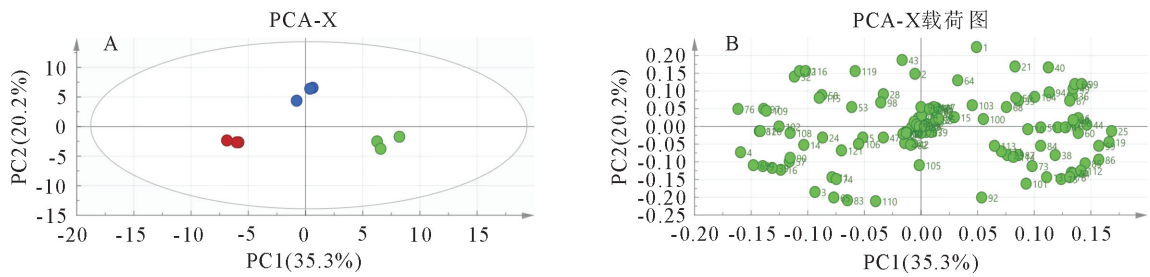


图 2 A:龙胆、三花龙胆、条叶龙胆叶片 PCA 得分;B:龙胆、三花龙胆、条叶龙胆叶片 PCA 载荷

Fig. 2 A:PCA score chart of blade of *Gentiana scabra*,*Gentiana triflora* and *Gentiana manshurica* ;
B:PCA load diagram of blade of *Gentiana scabra*,*Gentiana triflora* and *Gentiana manshurica*

2.2 PLS-DA 分析

由于 PCA 分析是一种无监督的分析方法,不对样本进行分组,其不能忽略组内误差并消除与研究目的无关的随机误差。所以对样本进行了有监督模式识别的偏最小二乘法(PLS-DA)分析,以达到反应组内及组间差异的目的。

龙胆、三花龙胆和条叶龙胆根部及叶片代谢物的 PLS-DA 得分如图 3(A:根部;B:叶片)所示,结果表明,各组分间聚类良好,且 3 组样本的根部及叶片在坐标轴上都有明显的区分,说明 3 种龙胆代谢物在根部和叶片中均存在差异。对 PLS-DA 模型进行置换检验,根据打乱后建模的 R² 数据均大于

Q²,说明 PLS-DA 模型的拟合结果稳定、可靠。基于 PLS-DA 分析结果,得到龙胆、三花龙胆及条叶龙胆根部和叶片的差异代谢物,筛选时参考 VIP 值与单因素方差分析 *P* 2 个参数,通过单维与多维结合的方法从不同角度观察数据,避免只用 1 种统计分析方法带来假阳性错误及模型过于拟合。为更准确地找到 3 种龙胆根部及叶片的差异代谢物,最终筛选其中 VIP>1 且 *P*<0.05 的代谢物。根部筛选结果如表 1 所示,共筛选出 58 个差异化合物,包括 14 种糖,25 种酸,8 种醇及其他 11 种化合物;叶片筛选结果如表 2 所示,共筛选出 46 个差异化合物,包括 9 种糖,22 种酸,5 种醇及其他 10 种化合物。

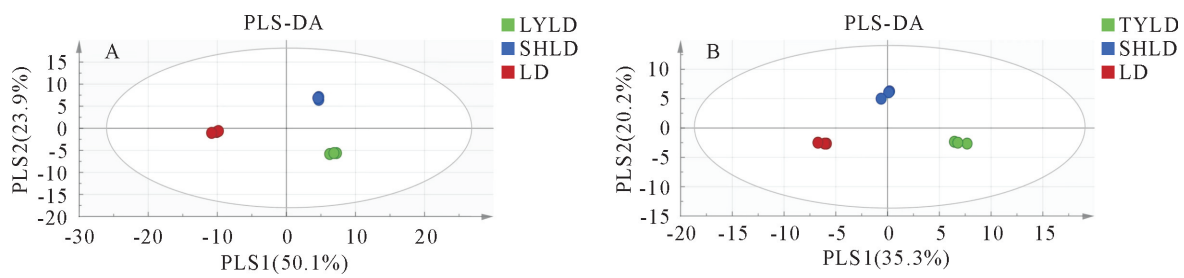


图 3 A:龙胆、三花龙胆、条叶龙胆根部 PLS-DA 得分;B:龙胆、三花龙胆、条叶龙胆叶片 PLS-DA 得分

Fig. 3 A:PLS-DA score chart of *G. scabra*,*G. triflora* and *G. manshurica* roots;
B:PLS-DA score chart of *G. scabra*,*G. triflora* and *G. manshurica* blade

表 1 龙胆、三花龙胆、条叶龙胆根部差异代谢物筛选结果

Table 1 Screening results of different metabolites in the roots of *G. scabra*, *G. triflora* and *G. manshurica*

序号	Compounds	化合物	分类	序号	Compounds	化合物	分类
1	. beta. -Gentiobiose	β-龙胆二糖	糖类	30	Oxalic acid	无水草酸	有机酸
2	2-. alpha. -Mannobiose	2-α-甘露二糖	糖类	31	Palmitic Acid	棕榈酸	有机酸
3	Arabinofuranose	阿拉伯呋喃糖	糖类	32	Propanedioic acid	丙二酸	有机酸
4	D-Fructose	D-果糖	糖类	33	2-Propenoic acid	丙烯酸	有机酸
5	D-Glucose	D-葡萄糖	糖类	34	Propanoic acid	丙酸	有机酸
6	D-Mannose	D-甘露糖	糖类	35	Stearic acid	硬脂酸	有机酸
7	D-Xylose	D-木糖	糖类	36	Succinic acid	琥珀酸	有机酸
8	Galactopyranose	半乳糖吡喃糖	糖类	37	Terephthalic acid	对苯二甲酸	有机酸
9	Glucose	葡萄糖	糖类	38	Undecanoic acid	十一酸	有机酸
10	L-Rhamnose	L-鼠李糖	糖类	39	Xylonic acid	木糖酸	有机酸
11	Maltose	麦芽糖	糖类	40	1-Butanol	1-丁醇	醇类
12	Sedoheptulose	景天庚酮糖	糖类	41	D-Threitol	D-苏糖醇	醇类
13	Sucrose	蔗糖	糖类	42	Erythritol	赤藓糖醇	醇类
14	Talose	塔罗糖	糖类	43	Glycerol	甘油	醇类
15	Alanine	丙氨酸	氨基酸	44	Myo-Inositol	肌醇	醇类
16	DL-Alanine	DL-丙氨酸	氨基酸	45	Propylene glycol	丙二醇	醇类
17	Asparagine	天冬酰胺	氨基酸	46	Ribitol	核糖醇	醇类
18	L-Alanine	L-丙氨酸	氨基酸	47	Xylitol	木糖醇	醇类
19	L-Glutamic acid	L-谷氨酸	氨基酸	48	2-Propanamine	异丙胺	其他
20	L-Proline	L-脯氨酸	氨基酸	49	Benzamide	苯甲酰胺	其他
21	L-Threonine	L-苏氨酸	氨基酸	50	Cadaverine	尸胺	其他
22	L-Norvaline	L-正缬氨酸	氨基酸	51	Dopamine	多巴胺	其他
23	Citric acid	柠檬酸	有机酸	52	Indolizine	吡啶	其他
24	Serine	丝氨酸	有机酸	53	Methylgalactoside	甲基半乳糖苷	其他
25	Tryptophan	色氨酸	有机酸	54	n-Butylamine	正丁胺	其他
26	Valine	缬氨酸	有机酸	55	Propylamine	正丙胺	其他
27	Glyceric acid	甘油酸	有机酸	56	Putrescine	腐胺	其他
28	Lactic Acid	乳酸	有机酸	57	Uracil	尿嘧啶	其他
29	Malic acid	苹果酸	有机酸	58	Urea	尿素	其他

2.3 差异代谢物分析

2.3.1 差异代谢物概况 3 种龙胆根部及叶片的各类差异代谢物占比如图 4 所示(A:根部;B:叶片),根部差异代谢物中糖类化合物占 24.14%,氨基酸类占 13.79%,有机酸占 29.31%,醇类占 13.79%,其他类型化合物占 18.97%;叶片差异代谢物中糖类化合物占 19.57%,氨基酸类和有机酸类各占 23.91%,醇类占 10.87%,其他类型化合物占 21.74%。根部与叶片中存在相同的差异代谢物,对根部与叶片筛选出的差异化合物进行比对,绘制韦恩图,结果见图 4C。其中根部特有差异代谢物为 37 个,叶片为 25 个,共有差异代谢物 21 个,包含 β-龙胆二糖、丝氨酸、柠檬酸、D-果糖、D-木糖、L-丙氨酸、L-谷氨酸和 L-脯氨酸等化合物。

2.3.2 差异代谢物相对含量的聚类分析 为了更直观地观察差异代谢物在 3 种龙胆间的含量差异,对筛选出的差异化合物进行聚类分析,聚类是将数据分到不同的类或者簇这样的一个过程,所以同一

个簇中的对象有很大的相似性,而不同簇间的对象有很大的相异性。通过聚类分析不仅可以观察各差异代谢物在不同样本中含量的高低,还可通过聚类观察各样本间的差异性。

龙胆、三花龙胆及条叶龙胆根部与叶片差异代谢物聚类热图如图 5(a:根部;b:叶片)所示,图中横坐标代表不同的试验样本分组,纵坐标为 3 组样本筛选出的差异代谢物,可以看出 3 种龙胆根部及叶片分别聚集在一个大的集群中,表明 3 种龙胆在所含成分上有一定的相似性;但图中颜色差异表明代谢物的表达量在 3 种龙胆根部及叶片中均有显著性差异。如图 5a 显示,在 3 种龙胆根部筛选出的 58 种差异代谢物中大部分化合物在龙胆中表达量较高,表现为上调。包括 β-龙胆二糖、2-α-甘露二糖、D-木糖、麦芽糖等 7 种糖;L-丙氨酸、L-谷氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、L-正缬氨酸等 8 种氨基酸;柠檬酸、苹果酸、无水草酸、硬脂酸、棕榈酸等 10 种有机酸;核糖醇和木糖醇等 5 种醇及 5 种其他类型化合物;上调化合物

数量共计 35 种。如图 5b 显示,在 3 种龙胆叶片中筛选出的 46 种差异代谢物表达量各有高低,其中在龙胆中表现为上调的化合物包括 D-木糖、景天庚酮糖等 4 种糖;丝氨酸、L-脯氨酸、L-正缬氨酸等 6 种氨基酸;咖啡酸、乳酸、无水草酸等 5 种有机酸及 4 种其他类型化合物;上调化合物数量共计 19 种。

表 2 龙胆、三花龙胆、条叶龙胆叶片差异代谢物筛选结果

Table 2 Screening results of different metabolites in the leaves of *G. scabra*, *G. triflora* and *G. manshurica*

序号	Compounds	化合物	分类	序号	Compounds	化合物	分类
1	. beta. -Gentiobiose	β -龙胆二糖	糖类	24	Caffeic acid	咖啡酸	有机酸
2	3-. alpha. -Mannobiose	3 α -甘露二糖	糖类	25	Citric acid	柠檬酸	有机酸
3	Arabinofuranose	阿拉伯呋喃糖	糖类	26	Glyceric acid	甘油酸	有机酸
4	Cellobiose	纤维素双糖	糖类	27	Lactic Acid	乳酸	有机酸
5	D-Fructose	D-果糖	糖类	28	Oxalic acid	无水草酸	有机酸
6	D-Xylose	D-木糖	糖类	29	Pentanedioic acid	戊二酸	有机酸
7	Glucose	葡萄糖	糖类	30	Phosphoric acid	磷酸	有机酸
8	Sedoheptulose	景天庚酮糖	糖类	31	Propanoic acid	丙酸	有机酸
9	Talose	塔罗糖	糖类	32	D-Pinitol	D-松醇	醇类
10	Glycine	甘氨酸	氨基酸	33	D-Threitol	D-苏糖醇	醇类
11	L-Alanine	L-丙氨酸	氨基酸	34	Glycerol	甘油	醇类
12	L-Aspartic acid	L-天冬氨酸	氨基酸	35	Muco-Inositol	黏质肌醇	醇类
13	L-Glutamic acid	L-谷氨酸	氨基酸	36	Silanol	硅烷醇	醇类
14	L-Isoleucine	L-异亮氨酸	氨基酸	37	. beta. -L-Galactopyranoside	β -L-半乳糖吡喃甲苷	其他
15	L-Proline	L-脯氨酸	氨基酸	38	1-Monopalmitin	1-单棕榈胺	其他
16	L-Threonine	L-苏氨酸	氨基酸	39	Cadaverine	尸胺	其他
17	L-Valine	L-缬氨酸	氨基酸	40	Decane	癸烷	其他
18	Serine	丝氨酸	氨基酸	41	Ethanolamine	乙醇胺	其他
19	L-Norvaline	L-正缬氨酸	氨基酸	42	Galactose oxime	半乳糖肟	其他
20	4-Aminobutanoic acid	4-氨基丁酸	氨基酸	43	L-Norleucine	L-降核苷	其他
21	2-Butenedioic acid	2-丁烯二酸	有机酸	44	Methoxyamine	甲氧基胺	其他
22	2-Propenoic acid	丙烯酸	有机酸	45	Phenol	苯酚	其他
23	Butanedioic acid	丁二酸	有机酸	46	Undecane	十一烷	其他

2.3.3 差异代谢物通路富集分析 将根部及叶片中的差异代谢物分别在 KEGG 数据库中找到对应的 KEGG ID,在 KEGG pathway 选项下根部共找到 77 条代谢通路;叶片中共找到 63 条代谢通路,为了找到更具价值的通路,只取 $P\leq 0.05$ 的通路,绘制差异代谢物 KEGG 富集通路影响因子图,结果如图 6 所示(A:根部;B:叶片)。由图 6A 知 3 种龙胆根部富集显著且富集到差异代谢物较多的通路有 ABC 转运蛋白、半乳糖代谢、磷酸转移酶系统(PTS)、淀粉和蔗糖代谢、由鸟氨酸、赖氨酸和烟酸衍生的生物碱生物合成、氨基酰基 tRNA 生物合成等。其中 ABC 转运蛋白通路富集最为显著且所含的差异代谢物最多,包括 D-果糖、D-木糖、葡萄糖、蔗糖、L-谷氨酸、L-丙氨酸、丝氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、麦芽糖、尿素及腐胺。由图 6B 知 3 种龙胆叶片富集显著且富集到差异代谢物较多的通路有 ABC 转运蛋白、丙氨酸,天冬氨酸和谷氨酸的代谢、氨基酰基 tRNA 生物合成、磷酸转移酶系统(PTS)、半乳糖代谢、由鸟氨酸、赖氨酸和烟酸衍生的生物碱

生物合成等。其中富集最显著的通路为氨基酰基 tRNA 生物合成,包含的化合物有 L-谷氨酸、甘氨酸、L-丙氨酸、L-天冬氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、L-缬氨酸及 L-异亮氨酸;ABC 转运蛋白通路中所含的差异代谢物最多,包括 D-果糖、D-葡萄糖、纤维素双糖、L-谷氨酸、甘氨酸、L-丙氨酸、L-天冬氨酸、L-脯氨酸、D-木糖、L-缬氨酸、L-苏氨酸、L-异亮氨酸及磷酸。

3 结论与讨论

3.1 结论

本研究基于 GC-MS 的代谢组学技术对中药龙胆的 3 种不同入药植物进行了代谢组学分析。在龙胆、三花龙胆和条叶龙胆根部检测到 58 种差异代谢物;龙胆、三花龙胆和条叶龙胆叶片中检测到 46 种差异代谢物;根部及叶片中一共检测到 83 种差异代谢物,其中共有的差异代谢物为 21 种。发现龙胆根部中大部分糖类、氨基酸和有机酸的积累比例均高于三花龙胆和条叶龙胆根部,龙胆根部拥有更多抗

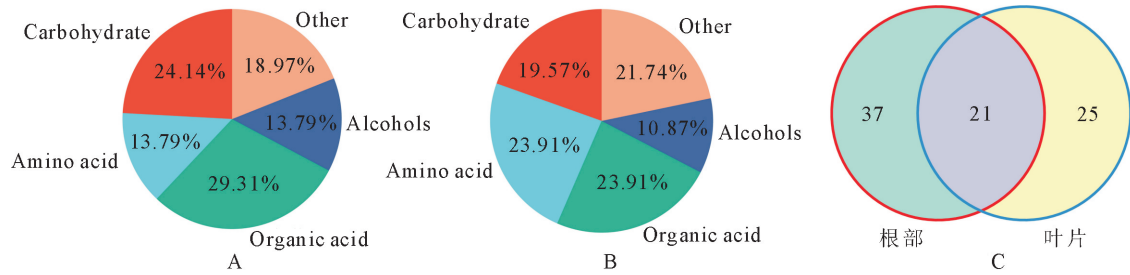
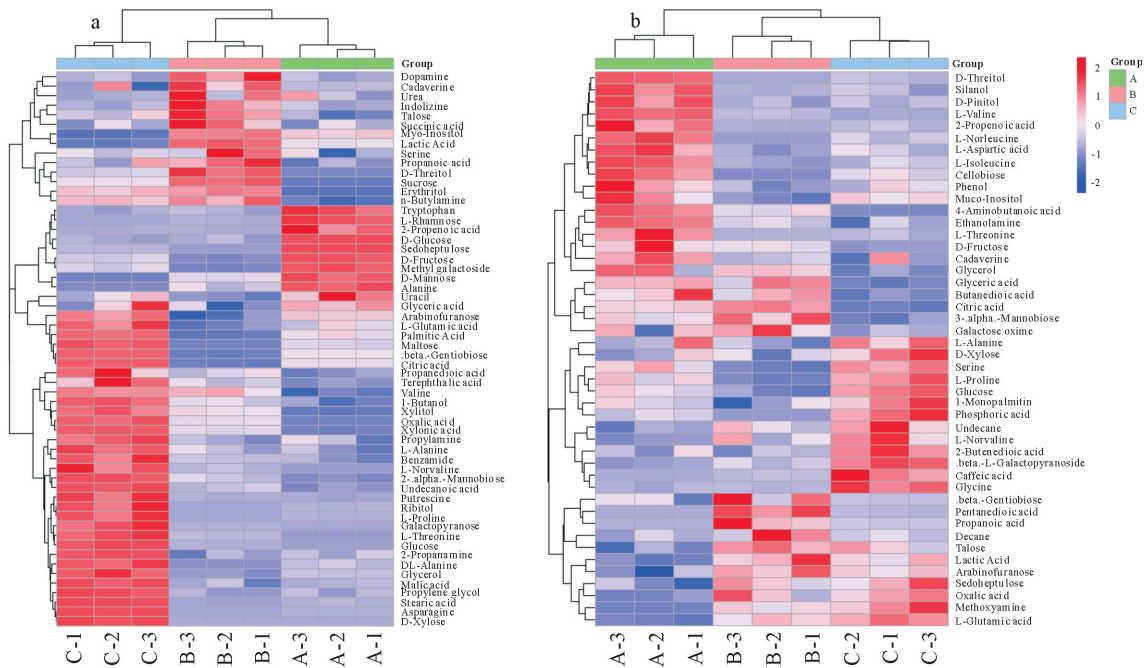


图 4 A:根部差异代谢物分类饼状图;B:叶片差异代谢物分类饼状图;C:根部与叶片差异代谢物维恩图
Fig. 4 A:Pie chart of root differential metabolite classification; B:Pie chart of leaf differential metabolite classification;
C:Venn diagram of different metabolites in roots and leaves

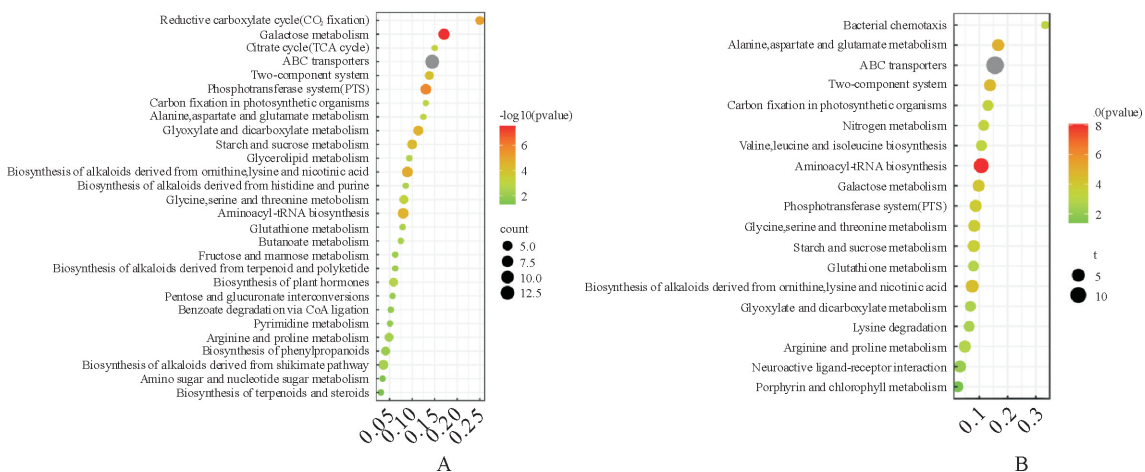


A:条叶龙胆;B:三花龙胆;C:龙胆;红色代表代谢物表达量较高,为上调;蓝色代表代谢物表达量较低,为下调。

图 5 a:3 种龙胆根部差异代谢物聚类热图;b:3 种龙胆叶片差异代谢物聚类热图

Fig. 5 a:Clustering thermogram of different metabolites in roots of three *Gentiana* species;

b:Clustering thermogram of different metabolites of three *Gentiana* leaves



气泡颜色代表富集显著性,颜色越红,富集越显著;气泡大小代表代谢通路中富集到代谢物的多少,越大代表富集到的代谢物越多。

图 6 A:根部差异代谢物 KEGG 富集通路影响因素;B:叶片差异代谢物 KEGG 富集通路影响因素

Fig. 6 A:Figure of influencing factors of KEGG enrichment pathway of root differential metabolite;

B:Figure of influencing factors of KEGG enrichment pathway of leaf differential metabolite

氧化性物质和缓解逆境胁迫的调节物质,可以更快地缓解和消除如外界病菌、病虫害、干旱及重金属等逆境胁迫所带来的伤害和影响,更好地保护植物组织和细胞,龙胆在不利条件下具有更强的调节能力及适应性,并且可药用的成分含量也明显高于其他2种龙胆;叶片中的差异代谢物的积累比例在3种龙胆中各有高低。值得一提的是在龙胆根部及叶片中积累比例较高的多种代谢物参与了ABC转运蛋白代谢途径,这条途径基本参与了植物生长发育各个阶段的组织运输,参与其中的代谢物对植物体的生长发育及药用成分累积具有重要作用。本研究从挥发性成分的角度比较了龙胆、三花龙胆及条叶龙胆的药用部位根部及其未被开发利用的叶片部位的化学成分差异,发现龙胆根部的成分及成分含量在一定程度上确实优于三花龙胆及条叶龙胆根部;叶片中也含有许多可被开发利用的可药用成分,为进一步研究中药材龙胆及龙胆、三花龙胆和条叶龙胆种质资源充分利用提供理论支持。

3.2 讨论

ABC转运蛋白是目前已知的最大也是功能最多的转运蛋白家族之一,有研究表明ABC转运蛋白家族基本参与了植物生长发育各个阶段的组织运输,包括植物体应对外界胁迫、植物激素运输和次生代谢物运输等^[17-18]。除此之外,其家族成员的转运底物非常丰富,不但包括糖类、脂质和次生代谢物,还包括生物碱、无机离子及类固醇等物质^[19-20]。3种龙胆根部及叶片中都含有这条通路,共有19种差异代谢物参与其中,分别为D-果糖、D-木糖、葡萄糖、D-葡萄糖、纤维素双糖、蔗糖、麦芽糖、L-谷氨酸、L-丙氨酸、丝氨酸、L-脯氨酸、L-苏氨酸、甘氨酸、L-天冬氨酸、L-缬氨酸、L-异亮氨酸、磷酸、尿素及腐胺。L-谷氨酸有刺激植物生长,提高植物对不利气候条件抵抗能力的作用^[21-22];L-丙氨酸能够促进叶绿素的合成,调节气孔开放,对病菌有抵御作用^[23];丝氨酸在植物体中可参与细胞组织分化,促进发芽^[24];L-脯氨酸可增加植物对渗透胁迫的耐受性,提高植物的抗逆性;L-苏氨酸可提高植物耐受性并增强植物抵御病虫害危害的能力^[25];甘氨酸对植物的光合作用有独特的效果,利于植物生长,增加作物含糖量,是天然的金属螯合剂^[25];L-天冬氨酸作为聚天冬氨酸合成原料可以间接地促进植物生长,优化根系形态,提高根系吸收面积和根系活力,促进植物对养分的吸收^[26];L-缬氨酸能够提高种子发芽率,改善植物风味^[27];L-异亮氨酸是帮助植物抵抗盐胁迫,提高花粉活力及合成芳香物质的前体物质^[28]。L-谷氨酸、L-丙氨酸、丝氨酸、L-脯氨酸、L-

苏氨酸、甘氨酸、L-天冬氨酸、L-缬氨酸及L-异亮氨酸均可直接作为医药用品或作为合成医药品的中间体。D-果糖、D-木糖、葡萄糖、D-葡萄糖、纤维素双糖、蔗糖及麦芽糖可为植物的生长发育提供能量且可作为植物体物质代谢的碳骨架^[29]。以上19种差异代谢物中大部分物质的表达量在龙胆根部及叶片中均表现为上调。表明龙胆在不利的生存环境下自身的调节机制均优于其他两种龙胆,因此植物体内积累下来的化学成分含量相对高于其他两种龙胆,并且所含的可作医药用途的氨基酸类物质含量也高于三花龙胆和条叶龙胆。

在3种龙胆根部差异代谢物中发现的谷胱甘肽代谢途径中,有3种差异代谢物参与其中,分别为L-谷氨酸、尸胺和腐胺。除尸胺外其他2种代谢物的表达量在龙胆中都呈上调。L-谷氨酸作为生物体内最重要的氨基酸之一有着刺激植物生长,提高植物对不利气候条件抵抗能力的作用,杨佳丽^[30]研究发现L-谷氨酸可以通过诱导植物自身的抗性来抵御或延缓其病害的发展,L-谷氨酸作为 γ -氨基丁酸(GABA)前体物质,激活了植物体内GABA支路上与GABA合成和代谢相关关键基因的表达,GABA支路的激活一方面可能与三羧酸(TCA)循环路径的加强为防御反应提供更多的能量有关;另一方面可能是阻止了活性氧的积累减少了细胞死亡从而不利于腐生型病原菌的侵染。因此,L-谷氨酸对植物抗性的诱导机制可能与GABA支路密切相关。Pia等^[31]研究发现L-谷氨酸对多种植物根系的生长具有调节作用。腐胺作为一种多胺在植物体内有调节和缓解胁迫对植株生长抑制的作用。王琳^[32]研究发现外源喷施腐胺在干旱胁迫的条件下可缓解植株形态指标及抗氧化酶的活性指标。由于L-谷氨酸和腐胺在龙胆根部的表达量均高于其他2种龙胆,且2种物质均有调节与缓解外界不利条件对植株生长的影响,可以推断龙胆根部可利用成分大部分优于三花龙胆与条叶龙胆可能是由于L-谷氨酸和腐胺在龙胆根部表达量高,在生长过程中较其他2种龙胆有着更强的抵御外界不利条件的能力,从而发育得更更为良好,积累下来的可药用成分均高于三花龙胆和条叶龙胆。

参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志(第62卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 104-106.
- [2] 傅沛云. 东北植物检索表[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1995: 518-520.
- [3] 刘娟. 黑龙江省药用植物资源现状及利用保护[C]. 淄博: 全国第二届中药资源生态学学术研讨会论文集, [出版者不详],

- 2006;88-91.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2020:155-168.
 - [5] 陈云,王国凯,武臻,等. 红花龙胆化学成分研究[J]. 中国中药杂志,2013,38(3):362-365.
CHEN Y, WANG G K, WU C, *et al.* Chemical constituents of *Gentiana rhodantha* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2013, 38(3):362-365. (in Chinese)
 - [6] 陈士林,孙永珍,徐江,等. 本草基因组计划研究策略[J]. 药学报,2010,45(7):807-812.
CHEN S L, SUN Y Z, XU J, *et al.* Strategies of the study on Herb Genome Program[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2010, 45(7):807-812. (in Chinese)
 - [7] 郭海凤. 关龙胆抗肿瘤活性成分的研究[D]. 延吉:延边大学, 2010.
 - [8] 田冶,李洪源. 龙胆水提液体外抑制呼吸道合胞病毒作用研究[J]. 哈尔滨医科大学学报,2006,40(2):144-146.
TIAN Y, LI H Y. The antiviral effect of Chinese Gentian against respiratory syncytial virus in vitro[J]. Journal of Harbin Medical University, 2006, 40(2):144-146. (in Chinese)
 - [9] FIEHN O. Metabolomics-the link between genotypes and phenotypes[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48(1/2):155-171.
 - [10] 卿德刚,倪慧,贾晓光,等. 西部资源秦艽的研究进展及新疆地产秦艽的开发前景[J]. 新疆中医药,2004,22(3):60-63.
 - [11] MAWALAGEDERA S M U P, CALLAHAN D L, GASKETT A C, *et al.* Combining evolutionary inference and metabolomics to identify plants with medicinal potential[J]. Frontiers in Ecology and Evolution, 2019, 7:267.
 - [12] 宋发军,黄珍,罗忠,等. 代谢组学及其在药用植物研究中的应用[J]. 中南民族大学学报:自然科学版,2016,35(2):36-41.
SONG F J, HUANG Z, LUO Z, *et al.* Metabolomics and its application in medicinal plant[J]. Journal of South-Central University for Nationalities: Natural Science Edition, 2016, 35(2):36-41. (in Chinese)
 - [13] 陈俊可,曾锐. 基于 UPLC-ESI-HRMSⁿ 的代谢组学技术对粗茎秦艽不同部位化学成分研究[J]. 中草药,2018,49(10):2328-2335.
CHEN J K, ZENG R. Application of metabolomics approach to study on chemical constituents in different parts of *Gentiana crasicaulis* based on UPLC-ESI-HRMSⁿ [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(10):2328-2335. (in Chinese)
 - [14] 刘洋. 应用代谢组学对比研究两种黄芪响应 UV-B 和干旱胁迫的代谢基础[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2018.
 - [15] 李彤彤,李冠君,李家宁. GC-MS 分析比较琼产降香黄檀不同部位材化学成分[J]. 西北林学院学报,2018,33(5):172-178.
LI T T, LI G J, LI J N. Comparison of the components in different parts of *Dalbergia odorifera* wood planted in Hainan by GC-MS[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2018, 33(5):172-178. (in Chinese)
 - [16] 周妮,胡瑶,钟毅,等. 白蜡木和水曲柳木材构造特征及提取液化学成分的 GC-MS 分析[J]. 西北林学院学报,2021,36(6):237-241.
ZHOU N, HU Y, ZHONG Y, *et al.* Structure characteristics and GC-MS analysis of the extractives from *Fraxinus chinensis* and *F. mandshurica* woods[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(6):237-241. (in Chinese)
 - [17] HIGGINS C F. ABC transporters; from microorganisms to man[J]. Annual review of cell biology, 1992, 8(10):67-113.
 - [18] MOSSER J, DOUAR A M, SARDE C O, *et al.* Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters[J]. Nature, 1993, 361(6414):726-730.
 - [19] PAUL J V, DAVID B, BO B, *et al.* Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory[J]. Trends in Plant Science, 2008, 13(4):151-159.
 - [20] ROCÍO S F, DAVIES T G E, COLEMAN J O, *et al.* The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory[J]. The Journal of biological chemistry, 2001, 276(32):30231-30244.
 - [21] 张晨阳,刘佳欣,黄蕊,等. L-谷氨酸对“秋锦”苹果贮藏品质和糖代谢的影响[C]. 天津:中国食品科学技术学会第十八届年会摘要集. [出版者不详], 2022:454.
 - [22] SANAPALLI B K R, TYAGI R, SHAIK A B, *et al.* L-Glutamic acid loaded collagen chitosan composite scaffold as regenerative medicine for the accelerated healing of diabetic wounds[J]. Arabian Journal of Chemistry, 2022, 15(6):103841.
 - [23] 甄俊峰. L-丙氨酸通过增加细胞内活性氧促进氟喹诺酮对分枝杆菌持留菌的杀伤[D]. 重庆:西南大学,2020.
 - [24] MARINA C, MARIANA G C, SEBASTIÁN A P, *et al.* Plant serine protease inhibitors: biotechnology application in agriculture and molecular farming[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(6):1345-1345.
 - [25] MILLER D A, SIMMONDS S. The metabolism of L-threonine and glycine by *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1957, 43(2):195-199.
 - [26] 刘媛,袁亮,张水勤,等. 不同分子量聚天冬氨酸对小麦根系生长和养分吸收的影响[J]. 中国农业科学, 2022, 55(13):2526-2537.
 - [27] 魏洪波,石拓,崔毅,等. 基于近红外光谱结合代谢流分析的 L-缬氨酸发酵过程监控[J]. 中国食品学报, 2019, 19(11):79-87.
WEI H B, SHI T, CUI Y, *et al.* Fermentation process monitoring of L-valine based on near infrared spectroscopy combined with metabolic flow analysis[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(11):79-87. (in Chinese)
 - [28] 徐周洋. 人参根系分泌物对其病原菌的化学趋向性的影响及人参属植物种子种苗的化感作用研究[D]. 长春:吉林农业大学,2021.
 - [29] 陈秀玉. 外源海藻糖对盐胁迫下番茄糖代谢影响的研究[D]. 天津:天津大学,2019.
 - [30] 杨佳丽. L-谷氨酸对果实抗性的诱导作用及其相关机理研究[D]. 杭州:浙江大学,2017.
 - [31] PIA W L, LIU L H, TONY R, *et al.* Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant & Cell Physiology, 2006, 47(8):1045-1057.
 - [32] 王琳. 外源腐胺提高散叶生菜耐旱性的生理机制及细胞超微结构研究[D]. 北京:北京农学院,2017.