

引用格式:

杜甜甜, 汪明磊, 陈阳峰, 朱妙华, 肖深根. 根干反向生长模拟对厚朴皮总酚含量的诱导及代谢组学分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(6): 684–688.

DU T T, WANG M L, CHEN Y F, ZHU M H, XIAO S G. Induction of total phenol content and metabolomics analysis of *Magnolia officinalis* errata bark by root trunk reverse growth simulation[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(6): 684–688.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



根干反向生长模拟对厚朴皮总酚含量的诱导及代谢组学分析

杜甜甜, 汪明磊, 陈阳峰, 朱妙华, 肖深根*

(湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以厚朴为试材, 设置露晒根、包埋干根干反向生长模拟处理, 以未作任何处理的根皮、干皮为对照, 采用高效液相色谱法测定厚朴总酚, 采用 LC-MS 技术分析差异代谢物。结果表明: 包埋干、露晒根处理的干皮和根皮总酚含量均增加; 厚朴中检测到 873 种代谢物, 其中, 对照的根皮组与干皮组显著性差异代谢物有 107 个, 露晒根皮与对照干皮组显著性差异代谢物有 71 个, 包埋干皮与对照根皮组显著性差异代谢物有 76 个, 各处理组间差异代谢物以上调为主; 差异代谢物主要包括脂质和类脂化合物、有机酸及衍生物、有机氧化物、木脂素、新木脂素及其相关化合物, 且主要聚集在 β -丙氨酸代谢、组氨酸代谢等途径; 根干反向生长模拟处理能诱导处理部位与模拟部位之间差异代谢物数量显著降低, 并引起氨基酸类物质和代谢途径积极响应。

关键词: 厚朴; 根干反向生长模拟; 总酚; 差异代谢物

中图分类号: R282; Q493

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)06-0684-05

Induction of total phenol content and metabolomics analysis of *Magnolia officinalis* errata bark by root trunk reverse growth simulation

DU Tiantian, WANG Minglei, CHEN Yangfeng, ZHU Miaohua, XIAO Shengen*

(College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Total phenols were determined by high performance liquid chromatography(HPLC) and the metabolomics were analyzed by LC-MS technique for the experimental material, *Magnolia officinalis*. The studied sample did exposed root and embedded trunk treatments with the root bark and trunk bark as the control. The results showed that the total phenolic content of trunk bark and root bark increased in both the embedded trunk and exposed root treatments. 107 of 873 detected metabolites in *Magnolia officinalis*, were significantly different between the control root bark and control trunk bark group; 71 metabolites were significantly different between the exposed root bark and control trunk bark group, and 76 metabolites were significantly different between the embedded trunk bark and control root bark group. These differential metabolites among the treatment groups were mainly up-regulated. The simulated treatment of root trunk reverse growth caused significant differences in lipids and lipid compounds, organic acids and their derivatives, organic oxides, lignans, neolignans and their related compounds; and the differential metabolites were mainly clustered in β -alanine metabolism, histidine metabolism and other pathways. The root trunk reverse growth simulation treatment induced a significant decrease in the amount of differential metabolites between the treated and simulated sites, and caused a positive response of amino acids and metabolic pathways.

Keywords: *Magnolia officinalis*; root-trunk reverse growth simulation; total phenol; differential metabolites

收稿日期: 2023-02-25

修回日期: 2023-11-28

基金项目: 湖南省创新性自然科学基金项目(2021JJ30346); 湖南省中药材产业技术体系(湘财农指[2023]66号); 湖南省创新型省份建设专项(2021SK2012)

作者简介: 杜甜甜(1997—), 女, 贵州仁怀人, 硕士研究生, 主要从事药用植物资源工程研究, 260162322@qq.com; *通信作者, 肖深根, 博士, 教授, 主要从事药用植物资源栽培与改良研究, 2395265030@qq.com

皮类药用植物的根皮、干皮、枝皮是自然相连的连接体,根据《中华人民共和国药典》^[1],不同的皮类药材入药部位不同,如杜仲和肉桂等^[2-3]只能以树干皮入药,而根皮不能入药;桑白皮、刺五加等只能以地下根皮入药^[4-5],而树干皮不能入药;厚朴则根皮、干皮、枝皮均可入药^[1],但厚朴根皮中质量控制指标厚朴酚与和厚朴酚总含量(以下简称总酚)远高于干皮^[6]。对于只能以根皮或树干皮入药的皮类药用植物而言,常常会造成非药用皮部资源的巨大浪费。为了提高非入药部位有效成分含量,提高皮类药用植物的综合利用率,刘倩^[7]对皮类药用植物进行根干反向生长模拟处理,发现根干反向生长模拟处理能诱导皮类药材不同皮部有效成分含量发生变化,但根干反向生长模拟处理的反向诱导代谢机制并不清楚。

代谢组学技术能直接反映生物体因外界环境改变或基因修饰而发生的表型变化,是分析生物体表型及基因型的重要方法^[8-10]。为深入探究根干反向生长模拟处理的诱导作用机制,以厚朴为试验材料,研究根干反向生长模拟处理能否诱导厚朴根皮、干皮中总酚含量向模拟部位趋同变化,是否存在由反向诱导处理伴生的“胁迫”互作,并从代谢组学水平深度分析其反向诱导影响,旨在了解根干反向生长模拟处理下皮类药用植物处理部位与模拟部位之间的小分子代谢物变化,为皮类药用植物响应根干反向生长模拟处理的反向诱导作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

材料采自湖南省长沙市湖南农业大学长安基地(28.16 E, 113.24 N)15 年龄厚朴林,经湖南农业大学肖深根鉴定为凹叶厚朴(*Magnolia officinalis* Rehd.et Wils.var.*biloba* Rehd.et Wils.)。试验于 2021 年 8 月进行。取根干反向生长模拟处理 1 年的露晒根根皮、包埋干干皮,以及分别与之相对应的对照根皮、干皮,进行厚朴总酚含量检测及代谢组学分析。各处理分别选取长势一致的 3 份样品进行测定,每个处理设置 3 次重复。

露晒根:即根模拟干处理,将厚朴植株根部向阳侧土壤挖开,露出其发达侧根,并将侧根上土壤

用软刷刷净(图 1-A)。

包埋干:即干模拟根处理,在厚朴植株主干离地约 1.0~1.5 m 高度,用苔藓围绕树干包裹 3 层,在苔藓外再加 2 层 PE 地布包裹并固定(图 1-B)。

对照根皮:选择形态、长势一致且生长在处理组邻近的异株厚朴,取土壤中向阳侧未作任何处理的根皮为对照。

对照干皮:选择厚朴对照根皮同一植株,以与包埋干处理相同高度的干皮作为对照。

厚朴酚、和厚朴酚标准品均购自中国食品药品检定研究院,批号分别为 110729—202015、110730—201915。甲醇、甲酸、乙腈为色谱级;水为超纯水;其余试剂均为化学纯。



A 露晒根; B 包埋干。

图 1 根干反向生长模拟处理

Fig. 1 Root trunk reverse growth simulation treatment

1.2 测定项目和方法

1.2.1 HPLC 定量测定厚朴酚、和厚朴酚含量

分别取露晒根根皮、包埋干干皮、对照根皮和对照干皮,参照《中华人民共和国药典》^[1]的方法配制溶液,测定各处理的厚朴酚、和厚朴酚含量。分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液各 4 μ L,注入色谱柱 Amethyst C₁₈(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m),甲醇、水(体积比为 78:22)为流动相,检测波长 294 nm;理论板数不低于 3800。

1.2.2 LC-MS 检测差异代谢物

委托北京诺禾致源股份有限公司进行代谢组学检测,通过代谢物提取、LC-MS 检测以及数据分析等得出试验数据。具体条件: Hypesil Gold column C₁₈ 色谱柱,正离子模式下流动相为 0.1% 甲酸水溶液-甲醇;负离子模式下流动相为 5 mmol/L

醋酸铵-甲醇;进样量为100 mL,柱温40℃,流速0.2 mL/min。

1.2.3 数据统计与分析

采用Excel 2019和SPSS 22.0对数据进行处理和分析;采用CD3.1软件处理质谱数据,基于 t 检验计算各代谢物在2组间的显著性,并计算代谢物在2组间的差异倍数(fold change)即FC值。以 $P<0.05$ 且 $FC\geq 2$ 或 $FC\leq 0.5$ 作为筛选差异代谢物的条件,并通过KEGG数据库进行代谢物通路注释。采用ggplot 2绘图。

2 结果与分析

2.1 根干反向生长模拟处理对厚朴总酚含量反向诱导的影响

由表1可知,对照根皮、对照干皮与包埋干皮总酚含量分别为128.3、56.4、62.9 mg/g。对照根皮总酚含量约为对照干皮的2.3倍;包埋干处理后,干皮总酚含量较对照干皮的总酚含量显著增加11.5%,对照根皮的总酚含量约为包埋干皮的2倍。说明包埋干处理能反向诱导厚朴干皮的总酚含量增加。

露晒根处理根皮总酚含量为143.7 mg/g,比对照根皮总酚含量显著增加12.0%;露晒根处理根皮总酚含量约为对照干皮的2.5倍,表明露晒根处理不仅没有反向诱导根皮总酚含量减少,反而扩大根皮与干皮之间的总酚含量差距。从根干反向生长模拟诱导效果分析,根干反向生长模拟除了反向诱导作用外,还可能存在其他诱导影响。

表1 根干反向生长处理厚朴不同部位的总酚含量

Table 1 Total phenol content of different parts of *Magnolia officinalis* root trunk reverse growth

处理	总酚含量/(mg g ⁻¹)
对照根皮	(128.3±0.21)b
对照干皮	(56.4±0.60)d
露晒根皮	(143.7±0.23)a
包埋干皮	(62.9±0.56)c

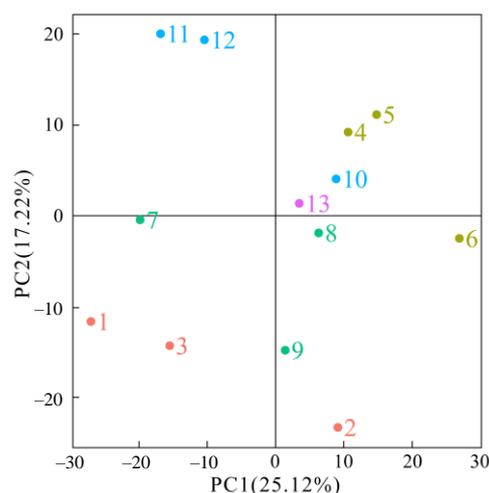
同列数据不同字母示处理间的差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.2 根干反向生长模拟处理对厚朴的反向诱导作用

2.2.1 主成分分析

根据主成分分析(PCA)结果(图2)可知,质控

(QC)样本在PCA得分图中集中在一起,表明试验方法稳定性好,数据质量高。A和B试验样本分离较远,说明厚朴根皮与干皮之间的代谢物和含量存在明显差距。根干反向生长模拟处理后根皮与干皮样品之间分布距离有所减小,说明根干反向生长模拟处理后根皮与干皮之间的代谢物种类和含量发生显著改变。



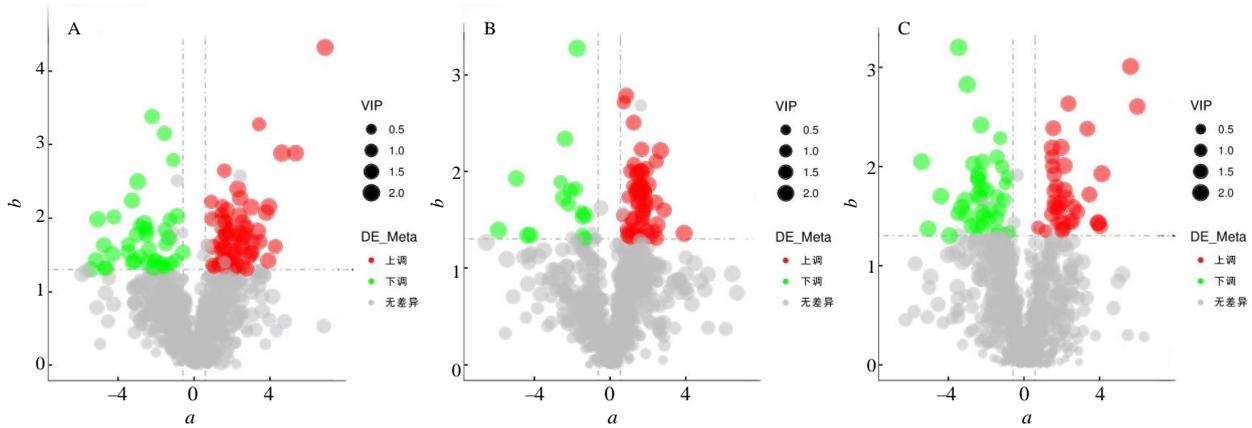
1、2、3 对照根皮;4、5、6 对照干皮;7、8、9 露晒根皮;10、11、12 包埋干皮;13 质控样本。

图2 根干反向生长模拟处理PCA分析结果

Fig.2 The results of PCA analysis were simulated by root trunk reverse growth

2.2.2 根干反向生长模拟处理后差异代谢物的筛选

以 $FC\geq 2$ 或 $FC\leq 0.5$,同时 $VIP>1.0$ 及 t 检验的 $P<0.05$ 为条件筛选差异代谢物。厚朴样品中检测到873种代谢物,未作任何处理时,对照根皮与对照干皮相比,鉴定出107个差异代谢物,上调66个,下调41个(图3-A);露晒根皮与对照干皮之间筛选出71个差异代谢物,上调55个,下调16个(图3-B);包埋干皮与对照根皮之间筛选出76个差异代谢物,上调40个,下调36个(图3-C)。差异代谢物主要包括脂质和类脂化合物、核苷、核苷酸和类似物、生物碱及其衍生物、有机杂环化合物、苯类化合物、苯丙类和聚酮类、有机酸及其衍生物、有机氧化物、有机氮化合物、木脂素、新木脂素及其相关化合物等。结果显示,根干反向生长模拟处理能诱导厚朴处理部位与模拟部位之间的差异代谢物数量显著降低,处理部位与模拟部位之间的代谢物差异减少。



A 对照根皮与对照干皮差异代谢物火山图; B 露晒根皮与对照干皮差异代谢物火山图; C 包埋干皮与对照根皮差异代谢物火山图
图注: a 表示 $\log_2(FC)$; b 表示 $-\lg P$ 。

图 3 厚朴根皮与干皮之间差异代谢物火山图

Fig. 3 Volcanic map of different metabolites between root bark and trunk bark of *Magnolia officinalis*

2.2.3 差异代谢物 KEGG 富集分析

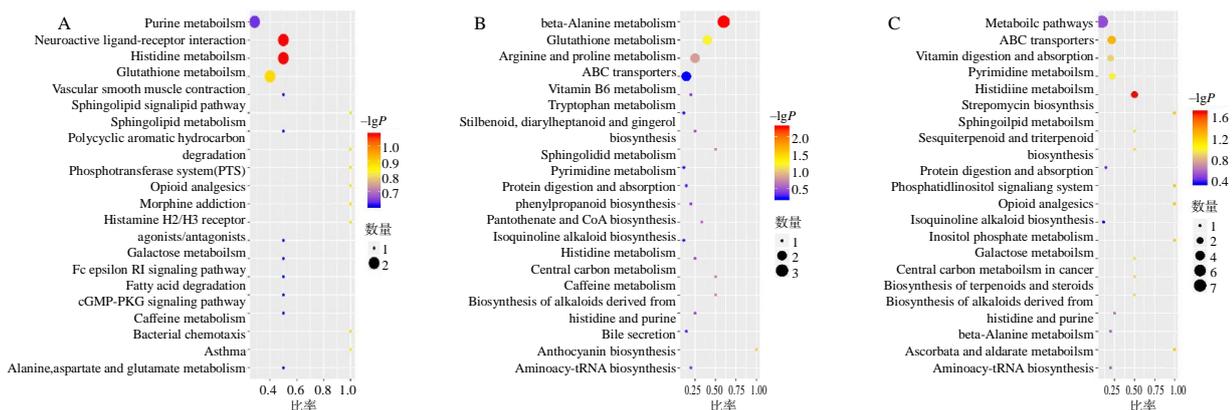
通过 KEGG 富集分析(图 4)发现, 对照根皮与对照干皮之间差异代谢物共富集在 44 条代谢途径上, 差异代谢物富集通路较显著的有 2 条(组氨酸代谢和神经活性配体-受体相互作用)。参与这 2 条代谢途径的差异代谢物有 3 种(组胺、尿酸和腺苷), 均表现为上调趋势。

露晒根皮与对照干皮之间的差异代谢物富集在 28 条代谢通路上, 其中极显著富集通路 1 条(β -丙氨酸代谢), 较显著富集通路 1 条(谷胱甘肽代谢), 参与这 2 条通路的差异代谢物有 4 种(L-组氨酸、

泛酸、亚精胺和 L-焦谷氨酸), 均表现上调。

包埋干皮与对照根皮之间的差异代谢物富集在 22 条代谢通路上, 其中较明显的富集通路有 2 条(组氨酸代谢、ABC 运转器), 参与这 2 条通路的差异代谢物有 4 种, L-组氨酸、尿酸和维生素 B₁₂ 表现为上调, 纤维醇表现为下调。

根干反向生长处理后, 处理部位与模拟部位之间的差异代谢物 KEGG 富集通路数量显著降低, 引起尿酸、L-组氨酸等代谢物积极响应, 并显著富集在 β -丙氨酸、组氨酸等代谢途径上。



A 对照根皮与对照干皮差异代谢物途径气泡图; B 露晒根皮与对照干皮差异代谢物途径气泡图; C 包埋干皮与对照根皮差异代谢物途径气泡图。

图 4 根干反向生长处理差异代谢物途径气泡图

Fig. 4 Bubble map of differential metabolite pathway treated by root trunk reverse growth

3 结论与讨论

本研究中, 厚朴根干反向生长模拟结果表明, 包埋干处理能诱导厚朴干皮总酚含量增加; 露晒根

处理后根皮总酚含量并没有表现出减少的变化趋势, 反而增加了 12.0%。推测其原因, 可能是根干反向生长模拟处理改变了厚朴根皮、干皮原来的栽培环境所致。SHIH 等^[11]研究发现, 栽培措施的改变

变,一方面改变了群体生长的环境条件,另一方面又对个体产生了特定的刺激,从而引起植物群体和个体的次生代谢物含量的差异。根干反向生长模拟处理时,除了反向诱导作用外,还对厚朴植株产生了一定程度的刺激,即产生了一定程度的“胁迫”,而适宜程度的“胁迫”能刺激药用植物次生代谢产物含量增加^[12]。露晒根处理时,反向诱导的减少量被“胁迫”的增加量抵消,反而导致根皮总酚含量增加;而包埋干处理时,反向诱导的增加量与“胁迫”增加量协同,导致干皮总酚含量增加。刘倩^[7]对杜仲进行根干反向生长模拟处理后发现,包埋干处理不仅没有诱导干皮松脂醇二葡萄糖(PDG)含量减少,反而显著高于对照干皮的;另外,露晒根处理也能诱导根皮总酚含量增加。综合上述结果可知,皮类药用植物在根干反向生长模拟处理时,除了反向诱导作用,还存在“胁迫”互作,这种互作可能导致皮类药用植物有效成分含量增加。

根干反向生长模拟处理对植物的影响机制复杂,其中代谢物的变化是重要的内容。本研究中,根干反向生长模拟处理后,处理部位与模拟部位即厚朴根皮与干皮之间的差异代谢物、差异代谢物KEGG功能注释与富集途径数量均显著低于未作任何处理时的根皮与干皮,说明根干反向生长模拟处理能诱导根皮与干皮之间的差异代谢物数量减少,即根干反向生长模拟处理存在反向诱导作用。

氨基酸是植物对非生物及生物胁迫响应的关键小分子物质,在植株生长及生理代谢过程中起着极为重要的作用^[13]。氨基酸类物质在植物体内的积累,有助于维持植物体内细胞的稳定,保持渗透调节能力^[14]。本研究发现根干反向生长模拟处理引起L-组氨酸、L-焦谷氨酸等氨基酸类代谢物显著上调,KEGG代谢途径也显著富集在 β -丙氨酸代谢、组氨酸代谢等氨基酸类代谢途径上,表明根干反向生长模拟处理能引起氨基酸类物质积极响应。

但根干反向生长模拟处理的机理比较复杂,为进一步明确其机理,下一步可将根干反向生长模拟处理运用在其他皮类药用植物上,进一步探究反向

诱导与“胁迫”互作对皮类药用植物不同入药部位关键药用成分含量的诱导分子响应机制。

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.
- [2] 王梦晴,蔡皓,刘鑫,等. 杜仲盐炙前后主要活性成分在肾纤维化大鼠体内的药代动力学研究[J]. 药学学报,2023,58(6):1611-1618.
- [3] 张箬晦,陈耿,李伟光,等. 贮存时间对不同规格肉桂的挥发油含量及主要成分含量的影响[J]. 中国食品添加剂,2022,33(5):138-147.
- [4] 马将,张湘苑,胡诗宛,等. 重构本草:桑白皮[J]. 吉林中医药,2023,43(1):99-102.
- [5] 何嘉伟,江汉美,黄振阳,等. HS-SPME-GC-MS结合化学计量法分析刺五加不同部位的挥发性成分[J]. 南京中医药大学学报,2023,39(2):146-156.
- [6] 陈海平. 道县凹叶厚朴药性成分分析[J]. 绿色科技,2020(9):56-57.
- [7] 刘倩. 根干生长模拟对杜仲、厚朴皮功能成分含量的影响[D]. 长沙:湖南农业大学,2018.
- [8] FERNIE A R, SCHAUER N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement?[J]. Trends in Genetics, 2009, 25(1): 39-48.
- [9] HORGAN R P, KENNY L C. 'Omic' technologies: genomics, transcriptomics, proteomics and metabolomics[J]. The Obstetrician & Gynaecologist, 2011, 13(3): 189-195.
- [10] FIEHN O. Metabolomics: the link between genotypes and phenotypes[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48(1/2): 155-171.
- [11] SHIH M L, MORGAN J A. Metabolic flux analysis of secondary metabolism in plants[J]. Metabolic Engineering Communications, 2020, 10: e00123.
- [12] 郭兰萍,周良云,康传志,等. 药用植物适应环境胁迫的策略及道地药材“拟境栽培”[J]. 中国中药杂志,2020,45(9):1969-1974.
- [13] 刘红玲,张新婉,黄玮,等. 植物氨基酸转运子研究进展[J]. 植物科学学报,2018,36(4):623-631.
- [14] 郭华军. 水分胁迫过程中的渗透调节物质及其研究进展[J]. 安徽农业科学,2010,38(15):7750-7753.

责任编辑:毛友纯

英文编辑:柳正