

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230440

基于广泛靶向代谢组学的主产区素心蜡梅 代谢产物比较分析

周 丹¹, 童宇航², 赵彦贝¹, 张林玉², 王梓煦¹, 李庆卫^{1*}

(1. 北京林业大学园林学院 林木资源高效生产全国重点实验室, 北京, 100083; 2. 北京市绿地养护管理事务中心, 北京, 100074)

摘要: [目的] 探讨主要产区素心蜡梅次生代谢物组分, 通过筛选和分析河南鄢陵和重庆北碚素心蜡梅的差异次生代谢物及其差异代谢途径, 为蜡梅的道地产区的科学种植提供理论依据。[方法] 采用基于超高效液相色谱串联质谱的广泛靶向代谢组学, 对两个产地盛花期的样本进行代谢组分析 [结果] 1) 两个产地的样本中共鉴定出 2 175 种次生代谢物, 按化学结构主要分为 13 类, 其中黄酮类物质种类占比最大, 共 387 种, 其次是酚酸类、脂质、生物碱、萜类、氨基酸及其衍生物、木脂素和香豆素、有机酸、核苷酸及其衍生物、醌类、鞣质和甾体。2) 相比于重庆素心蜡梅, 河南素心蜡梅共有 613 种显著差异代谢物, 其中 346 种代谢物的含量显著上调, 包括 79 种酚酸类, 52 种黄酮, 38 种生物碱, 32 种有机酸, 27 种氨基酸及其衍生物, 24 种萜类, 8 种脂质, 7 种醌类, 7 种核苷酸及其衍生物和 38 种其他类。3) 根据 KEGG 注释, 129 种差异代谢物被注释至 83 条代谢途径。其中, 苯丙烷生物合成、黄酮类生物合成、氨基酸生物合成、ABC 转运体等通路的差异代谢物富集较多, 苯丙烷的生物合成、苯丙氨酸代谢、二萜生物合成、黄酮类化合物生物合成、泛醌和其他萜类-醌生物合成 5 条代谢通路富集显著。[结论] 两个主产区素心蜡梅中共检测到 2 175 种次生代谢物, 不同产区素心蜡梅在次生代谢物物质方面表现出显著的差异性, 包括 613 种显著差异代谢物, 主要集中在酚酸类和黄酮类。其中, 杜仲脂素 A 和七叶树碱是区分两个主产区素心蜡梅的关键标志物。苯丙烷生物合成、黄酮类生物合成、氨基酸生物合成、ABC 转运体等通路的差异代谢物较多, 苯丙烷的生物合成、苯丙氨酸代谢和二萜生物合成的差异代谢物富集显著。

关键词: 比较代谢组学; 差异代谢物; 液相色谱-质谱联用; 功能化合物; 次生代谢物

中图分类号: S722

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)04-0117-10

蜡梅 (*Chimonanthus praecox* L.) 是我国珍贵的冬季香花观赏花木, 既是花茶窰制原料, 也是名贵药材, 可应用于药学、保健、美容和食品等多个领域。蜡梅的花、叶、种子富含多种生物活性成分如挥发油^[1]、生物碱^[2]、类黄酮^[3] 和酚酸^[4] 等, 表现出较高的医药保健研究价值和功能食品开发潜力^[5]。其中, 蜡梅花的精油和半挥发性成分具有抗微生物和抗氧化活性^[6], 甲醇提取物能够抑制黑色

素生成^[7], 其乙醇提取物表现出抗氧化和抗炎活性, 而其水提取物能显著增强免疫细胞功能^[8], 并且其倍半萜类化合物也具有抗菌活性等。此外, 现代药理学也揭示了蜡梅提取物在抗肿瘤、抗病毒以及免疫调节等方面的活性, 并且在临床上被用于治疗咳嗽和风湿性关节炎的药材^[9]。通过蜡梅的代谢组研究, 可以更系统和全面掌握其代谢物构成和生物活性, 进而充分利用蜡梅资源。

植物代谢组学作为天然植物产物分析的先进技

收稿日期: 2023-11-13 修回日期: 2024-05-24

基金项目: 国家重点研发计划 (2020YFD1000500); 北京园林绿化增彩延绿科技创新工程 (2019-KJC-02-10); 重点地区冬季景观树种蜡梅苗木储备驯化 (1100024T000003064556)

* 通讯作者: 李庆卫, 教授、博士生导师, 研究方向为园林植物应用与园林生态, E-mail: lqw6809@bjfu.edu.cn

术, 致力于揭示生物体在特定时空条件下的精确化学特征, 深入解析生物体内的生命活动和代谢规律^[10], 在作物产量、营养成分、医学药用、功能食品等领域广泛应用^[11-12]。基于超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 的广泛靶向代谢组学以其高灵敏度、高选择性、高分辨率、高通量、广覆盖度的特点^[13], 在植物代谢物的分析和鉴定领域广受欢迎。目前已经对不同情况下植物的代谢组进行研究, 主要集中在小麦 (*Triticum aestivum* L.)^[14]、水稻 (*Oryza sativa* L.)^[15] 等粮食作物上以及枸杞 (*Lycium barbarum* M.)^[16]、玉米 (*Zea mays* L.)^[17]、五味子 (*Schisandra chinensis* B.)^[18]、大豆 (*Glycine max* L.)^[19] 等经济作物上。研究揭示, 植物代谢物的积累受到基因组演化^[20]、遗传多样性^[21]、品种^[22]、发育阶段^[23]、组织差异^[24] 和环境刺激^[25] 等多重因素的综合影响, 共同促使代谢物在数量、种类、生理生化功能等方面表现出丰富的多样性和特异性^[26]。Lin^[27] 等通过检测 29 个大豆品种的代谢组, 筛选出 104 个代谢物的含量在不同品种间存在明显差异。Carrari^[28] 等通过分析番茄果实在开花后 11 个发育时间点的代谢谱, 揭示初生代谢物和次生代谢物在发育过程中的显著变化。Dong^[29] 等发现水稻中酚胺类物质在不同组织中的积累有所不同, 其在根中含量最高, 而在种子中含量最低, 在剑叶、茎秆和穗子中含量则逐渐降低。

虽然对蜡梅化合物的研究已取得诸多进展, 主要集中在化学成分的鉴定和粗提物的生物活性功能探究上。然而关于同一植物在不同产地代谢物的多样性的研究鲜有报道, 特别是结合代谢产物比较分析, 深入探讨不同地区蜡梅品种代谢差异物质的研究尚为空白。本研究以河南鄢陵和重庆北碚中国两大蜡梅之乡的素心蜡梅为研究对象, 采用超高效液相色谱-串联质谱联用的广泛靶向代谢组学技术, 检测次生代谢物种类及其相对含量, 结合差异代谢物分析关键代谢途径和代谢机制, 揭示其代谢差异。本研究为蜡梅功能性化合物的分离鉴定以及研究开发提供科学依据, 并为蜡梅优良品种的开发利用和产业化进程提供理论支持。

1 材料及方法

1.1 试验材料

本试验以盛花期的素心蜡梅 (*Chimonanthus praecox*) 花为供试材料, 以河南鄢陵和重庆北

碚—中国两大蜡梅之乡为研究地点。鄢陵地区属于温带季风气候, 而重庆地区则为亚热带季风气候。这两种不同地理气候条件导致两地蜡梅的生长发育特性和形态存在显著差异: 鄢陵素心蜡梅花形小巧玲珑、色泽清雅; 相比之下, 重庆素心蜡梅花则表现为花径较大、色泽鲜艳。通过对比这两个主要产区的素心蜡梅进行研究, 可以揭示不同生长环境对蜡梅代谢的影响。在两个地区中所选样本在生长状况和管理措施上基本相同, 排除外界管理因素引起的变异。采样时间采集定于 2022 年 12 月 25 日, 该时期花朵处于完全开放状态, 代谢活跃, 能够反映其生理活性的峰值。每个地区选取 30 朵具有典型代表的素心蜡梅品种花进行随机采样, 每 10 朵花作为一个重复, 共计 3 个重复, 以保证结果具有统计学意义。采样后, 样品立即置于液氮中快速冷冻, 并在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存, 直到代谢组分析进行, 确保样品中的代谢物得到充分保护, 以便于后续的精准确分析。

1.2 样品处理

样本在真空冷冻干燥机 (Scientz-100F) 中进行冷冻干燥, 并用研磨机 (MM400, Retsch) 研磨成粉。粉末样本用电子天平 (MS105DU) 精确称量, 并与预冷的 70% 甲醇进行混合, 然后进行涡旋和离心处理。处理后的样品用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 以备后续 UPLC-MS/MS 分析。

1.3 UPLC-MS/MS 分析条件

1.3.1 液相条件 柱类型: Agilent SB-C18 ($1.8\text{ }\mu\text{m}$, $2.1\text{ mm} \times 100\text{ mm}$)。流动相组成: 含 0.1% 甲酸的超纯水 (A 相), 含 0.1% 甲酸的乙腈 (B 相)。梯度程序: 初始, B 相为 5%; 在 9.00 min 内线性增至 95%, 保持至 10.00 min; 10.00~11.10 min, B 相恢复至 5%, 并持续至 14 min 以稳定柱子; 流速为 $0.35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 注射量为 $2\text{ }\mu\text{L}$ 。

1.3.2 质谱条件 利用电喷雾离子源 (ESI) 进行离子化, 源温设定为 $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。喷雾电压在正离子模式为 5500 V, 负离子模式为 $-4\text{ }500\text{ V}$ 。离子源气体 I (GSI)、气体 II (GSII) 和气帘气 (CUR) 的压力分别为 50、60 和 25 psi。采用较高的碰撞诱导电离参数。在三重四极杆 (QQQ) 中使用多反应监测 (MRM) 模式, 碰撞气体 (N_2) 设为中等强度。通过优化去簇电压 (DP) 和碰撞能 (CE), 完成了各个 MRM 离子对的调整。根据代

谢物的洗脱时间, 每个时间段监测特定的 MRM 离子对组。

1.4 数据结果评估

依靠自建的 MWDB 数据库和二级质谱信息, 实现了代谢物的精准鉴定。分析中消除了同位素、 K^+ 、 Na^+ 和 NH_4^+ 离子的影响, 并剔除了大分子碎片离子的重复信号。利用保留时间和峰型信息对样本中代谢物色谱峰进行校正, 并用 Analyst 1.6.3 软件处理质谱数据。采用多元统计分析如 PCA、HCA 和 OPLS-DA 等方法, 进行数据评估, 确保数据的准确性和重复性。通过结合单变量和多变量统计分析, 筛选出差异代谢物。基于 P 值、FC 值和 VIP 值等标准, 最终确定显著差异的代谢物。并根据 KEGG 注释, 对筛选出的代谢物进行路径分类和分析。

2 结果与分析

2.1 蜡梅样品的代谢组总体分析

经代谢组学分析, 河南和重庆两地的素心蜡梅样品中共识别出 2 175 种次生代谢物, 并根据其化学结构被归纳为 13 个不同类别 (图 1)。在这些代谢物中, 黄酮类的种类最为丰富, 共 387 种占 17.8%, 其中包括 22 种查耳酮 (2,4,2',4'-四羟基-3'-异戊烯基查耳酮、醌式红花苷、根皮素、柚皮素查耳酮等), 48 种二氢黄酮 (橙皮素、高圣草酚、桉树素、柚皮素等), 14 种二氢黄酮醇 (乔松素-7-O-新橘皮糖苷、香蜂草苷、枸橼苷、橙皮素-7-O-葡萄糖苷等), 10 种花青素 (芍药花素-3-O-芸香糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、葡萄糖苷、锦葵色素-3-O-芸香糖苷等), 101 种黄酮 (牡荆素葡萄糖苷、野黄芩素、蜡梅苷、当药黄素等), 139 种黄酮醇 (槲皮素、异鼠李素、槲皮素-3-O-磺酸、山柰酚等), 26 种黄烷醇类 (儿茶素、表儿茶素苷、3'-甲氧基-表儿茶素、表没食子儿茶素等) 15 种其他类黄酮, 11 种异黄酮 (染料木素-7-O-半乳糖苷-鼠李糖、槐角苷、2-羟基-2,3-二氢染料木素、黄豆黄素等), 1 种橙酮类 (金鱼草素-4-O-葡萄糖苷)。紧接着是酚酸类 356 种占 16.4%, 脂质 209 种占 9.6%, 以及生物碱 196 种占 9.0%, 萜类 185 种占 8.5%, 氨基酸及其衍生物 169 种占 7.8%, 木脂素和香豆素 150 种占 6.9%, 有机酸 130 种占 6.0%, 核苷酸及其衍生物 72 种占 3.3%, 醌类 26 种占 1.2%, 鞣质 11 种占 0.5%,

甾体 4 种占 0.2%。生物碱中共有 38 种酚胺类生物碱 (香兰素胺、多巴胺、4-氨基苯酚、2-氨基苯酚等), 11 种吡啶类生物碱 (烟酸甲酯、腊梅碱、3-吡啶-甲醇-O- β -D-吡喃葡萄糖基、葫芦巴碱等)、7 种喹啉类生物碱 (喹啉-4-羧酸、8-羟基喹啉、奎尼丁、2,4-二羟基喹啉等), 5 种异喹啉类生物碱 (Passicapsin、Tetraphyllin A、Passibiflorin、Glucosyl-6,7-di-O-methyl-N-deacetylisopecosidic acid 等)、38 种吲哚类生物碱 (吲哚-5-甲酸、3-吲哚丙酸、血清素; 5-羟色胺、N-羟基色胺等) 等。萜类中共有 68 种倍半萜类化合物 (白木香醛、密叶辛木素、脱水- β -莎草醇、异菖蒲酮等), 43 种倍萜类化合物 (柠檬醛、榄香三烯醇、望春玉兰脂素 C、地黄新萜 G 等), 39 种二萜类化合物 (日本花柏酸、松香酸甲酯、脱氢松香酸、日本花柏酸), 25 种三萜类化合物 (2-羟基熊果酸、二乙酸山芝烯二醇酯、齐墩果酸、3-O-乙酰基熊果酸等), 2 种三萜皂苷化合物 (Coeloginin、2,3,19-三羟基熊果-12-烯-23,28-二酸-28-O-葡萄糖苷), 8 种萜类化合物 (淫羊藿次苷 B1、异黑麦草内酯、囊状毛蕊花苷、土可玄参苷 F)。另外, 还检测出 86 种糖类, 25 种维生素, 18 种酮类化合物, 16 种醛类化合物, 11 种色酮类化合物, 9 种芪类化合物等其他类化合物。

2.2 次生差异代谢物分析与筛选

通过对素心蜡梅样本进行主成分分析 (PCA), 旨在揭示不同分组样本间及组内样本之间代谢物的

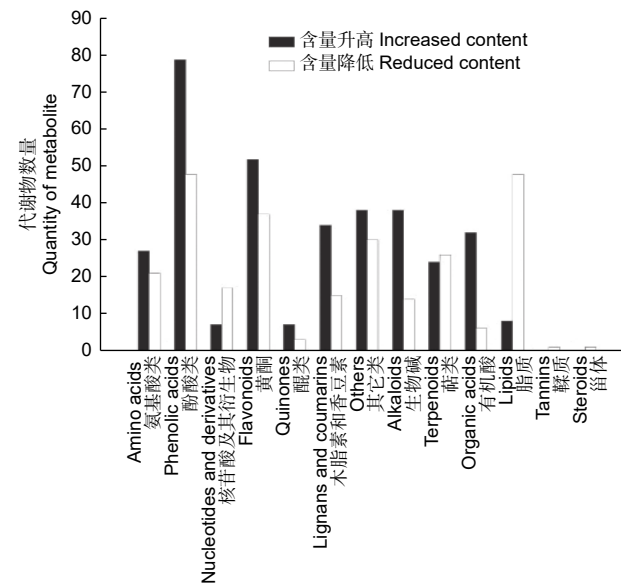
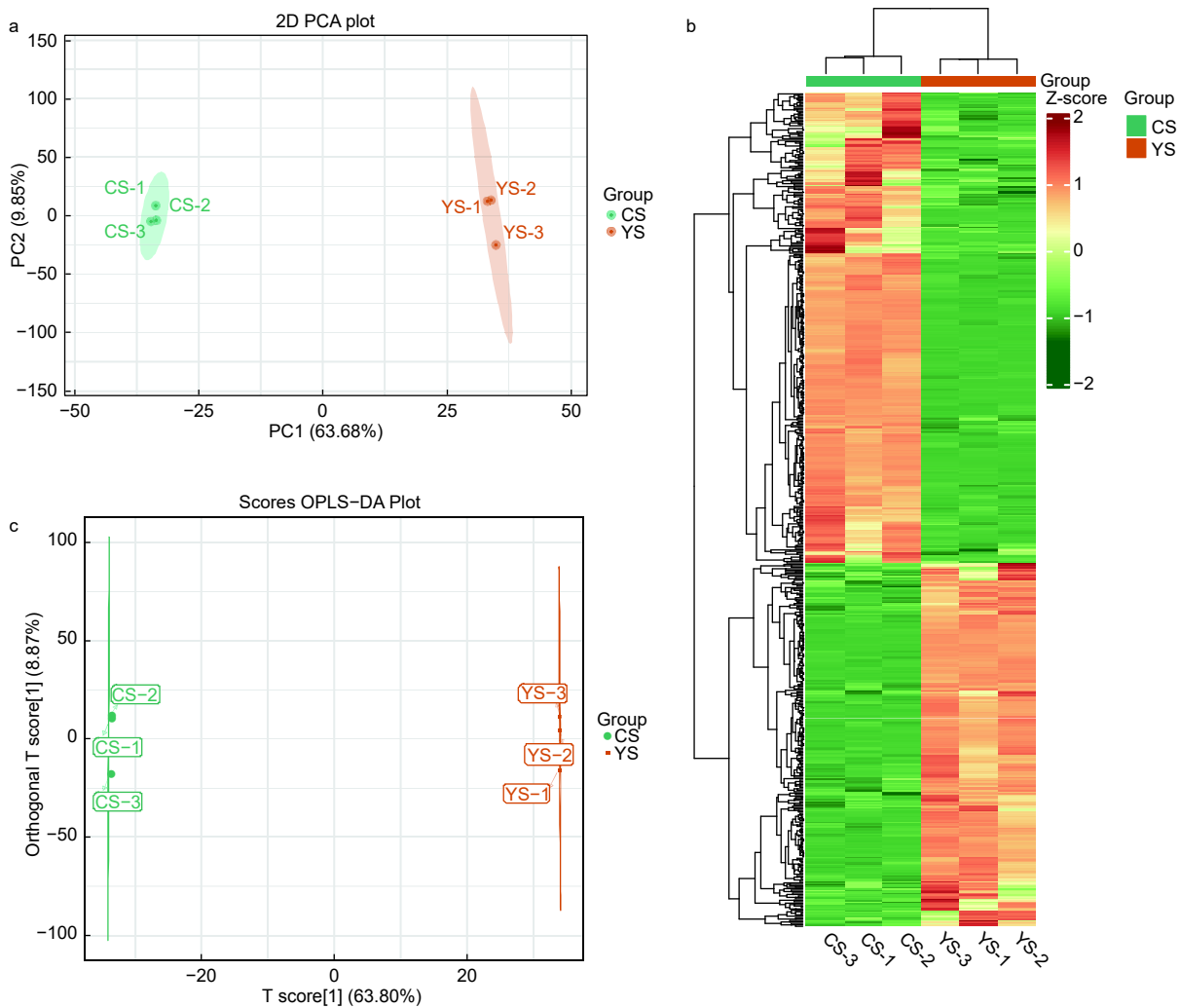


图 1 差异代谢物分类

Fig. 1 Classification of differential metabolites

差异 (图 2a)。两组间第一主成分 (PC1) 的贡献值为 63.68%, 第二主成分 (PC2) 的贡献值为 9.85%, 明显表现出两组代谢物间的分离趋势。利用代谢物在不同样本间的积累模式进行聚类分

析,显示不同种蜡梅的次生代谢物可明显分为 2 个聚类, 样本间的次生代谢物积累有显著差异 (图 2b)。接着利用正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA), 进一步确认和验证了这些差异。



注: CS,重庆素心蜡梅; YS, 鄱陵素心蜡梅, 下同

Notes: CS, Chongqing *Chimonanthus praecox*; YS, Yanling *Chimonanthus praecox*. The same below

图 2 2 组样品的代谢组主成分分析 (a)、聚类热图 (b) 与偏最小二乘判别分析得分图 (c)
Fig. 2 PCA (a)、HCA (b) and OPLS-DA (c) of the 2 groups of samples

通过 OPLS-DA 模型, 展示了两个不同产地 (河南和重庆) 素心蜡梅代谢物的显著差异。模型经 200 次随机排列验证, 表现出良好的稳定性和预测性 ($R^2X=0.727$, $R^2Y=1$, $Q^2=0.98$)。从 OPLS-DA 得分图 (图 2c) 可知, 河南素心蜡梅与重庆素心蜡梅在代谢物上存在显著差异, 这一结果与 PCA 的分析结果相似。基于 OPLS-DA 模型和相关筛选标准 ($p < 0.05$, $VIP \geq 1$ 和 $FC \geq 2$ 或 ≤ 0.5), 共筛选出 613 种显著差异代谢物 (图 3)。

在河南素心蜡梅中, 346 种代谢物的含量较高, 包括 79 种酚酸类、52 种黄酮、38 种生物碱、32 种有机酸、27 种氨基酸及其衍生物、24 种萜类、8 种脂质、7 种醌类、7 种核苷酸及其衍生物、38 种其他类。而在重庆素心蜡梅中, 267 种代谢物的含量较高, 包括 48 种酚酸、48 种脂质、37 种黄酮、26 种萜类、21 种氨基酸及其衍生物、17 种核苷酸及其衍生物、15 种木脂素和香豆素、14 种生物碱、6 种有机酸;3 种醌类、1 种鞣质、

1 种甾体, 表明两个产地蜡梅的差异代谢物主要集中在黄酮、酚酸类和生物碱类物质。进一步结合差异倍数选取差异倍数 ≥ 2 和差异倍数 ≤ 0.5 的代谢物, 根据与重庆素心蜡梅相比, 河南素心蜡梅中某些特定代谢物的含量有显著提高或降低。图 3 精确展示了经过 $\log_2$ 转换差异倍数处理后, 排名前 20 的显著差异表达代谢物。相较于重庆素心蜡梅, 河南素心蜡梅在多种代谢物的含量上表现出显著的变化。在河南素心蜡梅中, 部分代谢物如其他类 (4 种)、有机酸 (3 种)、萜类 (3 种)、木脂素和香豆素 (2 种) 以及醌类 (1 种) 的含量相对较高。具体来说, 羟基香叶基 6-O-吡喃木糖基-吡喃葡萄糖苷、7-O-香叶基七叶树素、7-O-香叶基伞形酮的含量, 在河南素心蜡梅中比重庆素心蜡梅分别高出 8.4 倍、7.66 倍和 7.51 倍。相反, 也有一些代谢物如萜类 (3 种)、

其他类 (2 种) 和黄酮 (1 种) 在河南素心蜡梅中的含量降低。例如, 阿魏酰二氢法萆酸和对香豆酰基二氢法萆酸的含量, 在重庆素心蜡梅中分别是河南素心蜡梅的 7.72 倍和 6.87 倍。重庆素心蜡梅中特有代谢物有 11 种, 其中杜仲脂素 A 相对含量较高 ($> 1.00E + 06$); 河南素心蜡梅中特有代谢物有 6 种, 其中七叶树碱相对含量较高 ($> 1.00E + 06$)。因此, 杜仲脂素 A 和七叶树碱可作为区分河南素心蜡梅和重庆素心蜡梅的生物标志物。

2.3 差异代谢物 KEGG 功能注释及富集分析

为深入探讨源自两个不同产地的素心蜡梅中代谢通路的差异, 本研究采用了 KEGG 数据库对筛选出的显著差异代谢物进行了功能注释分析 (图 4)。在 613 个显著差异的代谢物中, 129 个被注释到了 83 个不同的生物合成通路, 其中包括苯丙烷生物合成途径、(Phenylpropanoid

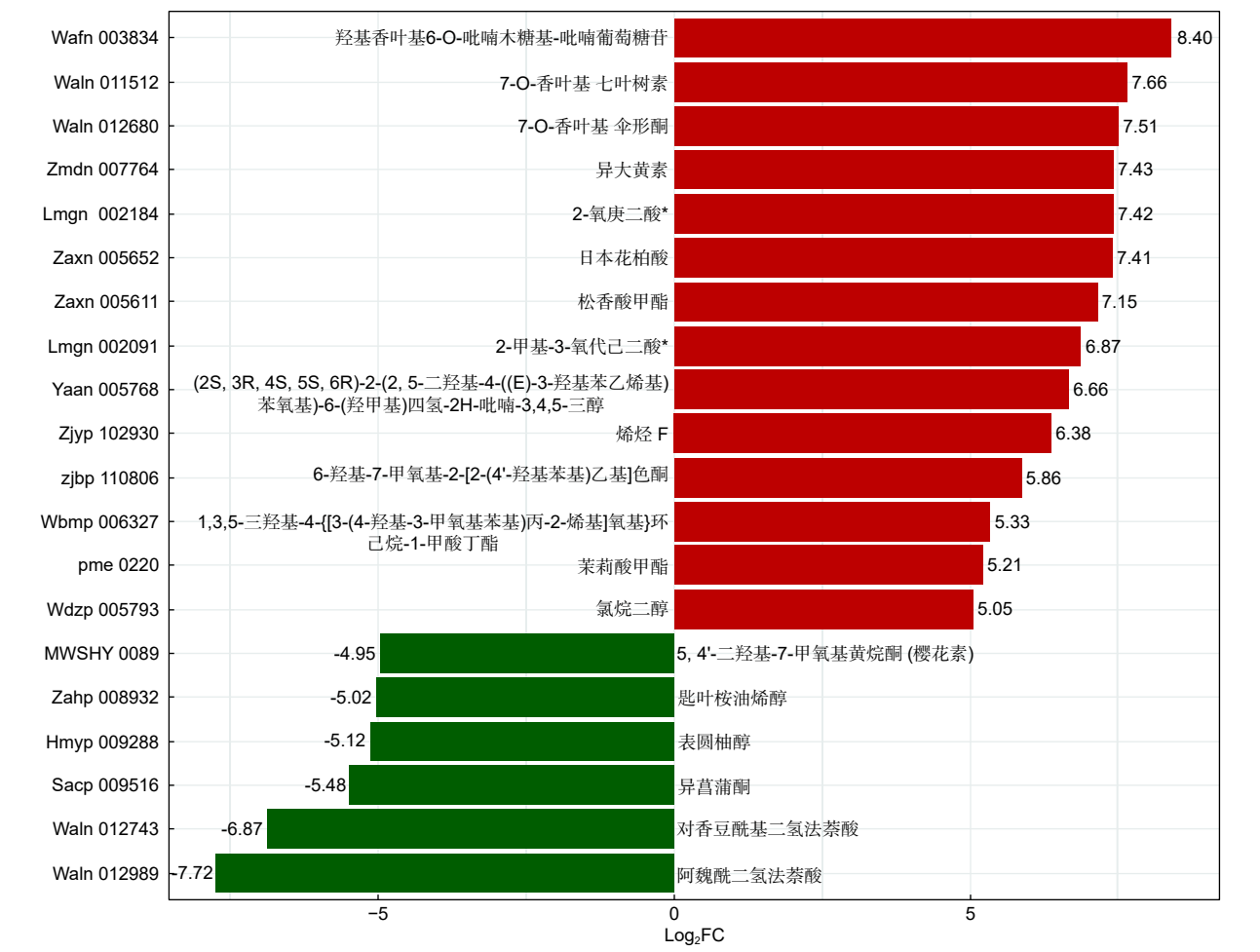


图 3 2 组样品排名前 20 差异代谢物差异倍数柱状图

Fig. 3 Histogram of the multiplicity of differences in the top 20 differential metabolites of the 2 groups of samples

biosynthesis)、苯丙氨酸代谢 (Phenylalanine metabolism)、二萜生物合成 (Diterpenoid biosynthesis)、黄酮类化合物生物合成 (Flavonoid biosynthesis) 以及泛醌和其他萜类-醌的生物合成 (Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis) 等为显著富集的 5 条代谢通路。通过对 KEGG 通路的注释分析, 结果表明苯丙烷生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis) 黄酮类化合物生物合成 (Flavonoid biosynthesis)、氨基酸生物合成 (Biosynthesis of amino acids)、ABC 转运体 (ABC transporters) 这 4 个通路在注释的代谢物数量占较大比重。从差异代谢物 KEGG 富集分析和代谢通路整体变化的分析结果可知, 河南素心蜡梅相对于重庆素心蜡梅在苯丙氨酸代谢 (Phenylpropanoid biosynthesis)、二萜生

物合成 (Diterpenoid biosynthesis) 路径中表现出显著的富集和上调趋势。相反, 在花青素生物合成 (Anthocyanin biosynthesis) 通路中表现出明显的富集和下调趋势。此外, 一些其他通路, 如半萜和三萜类化合物生物合成 (Sesquiterpenoidandtriterpenoidbiosynthesis)、糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚生物合成 (GlycosylphosphatidylinositolGPI)-anchorbiosynthesis)、甜菜素生物合成 (Betalainbiosynthesis)、二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜酚生物合成 (Stilbenoid, diarylheptanoidandgingerolbiosynthesis) 以及鞘脂代谢 (Sphingolipidmetabolism) 等, 虽然在富集程度不高, 但呈现出明显上调或下调趋势。苯丙烷生物合成 (Phenylpropanoid biosynthesis)、异喹啉生物碱生物合成 (Isoquinoline alkaloid

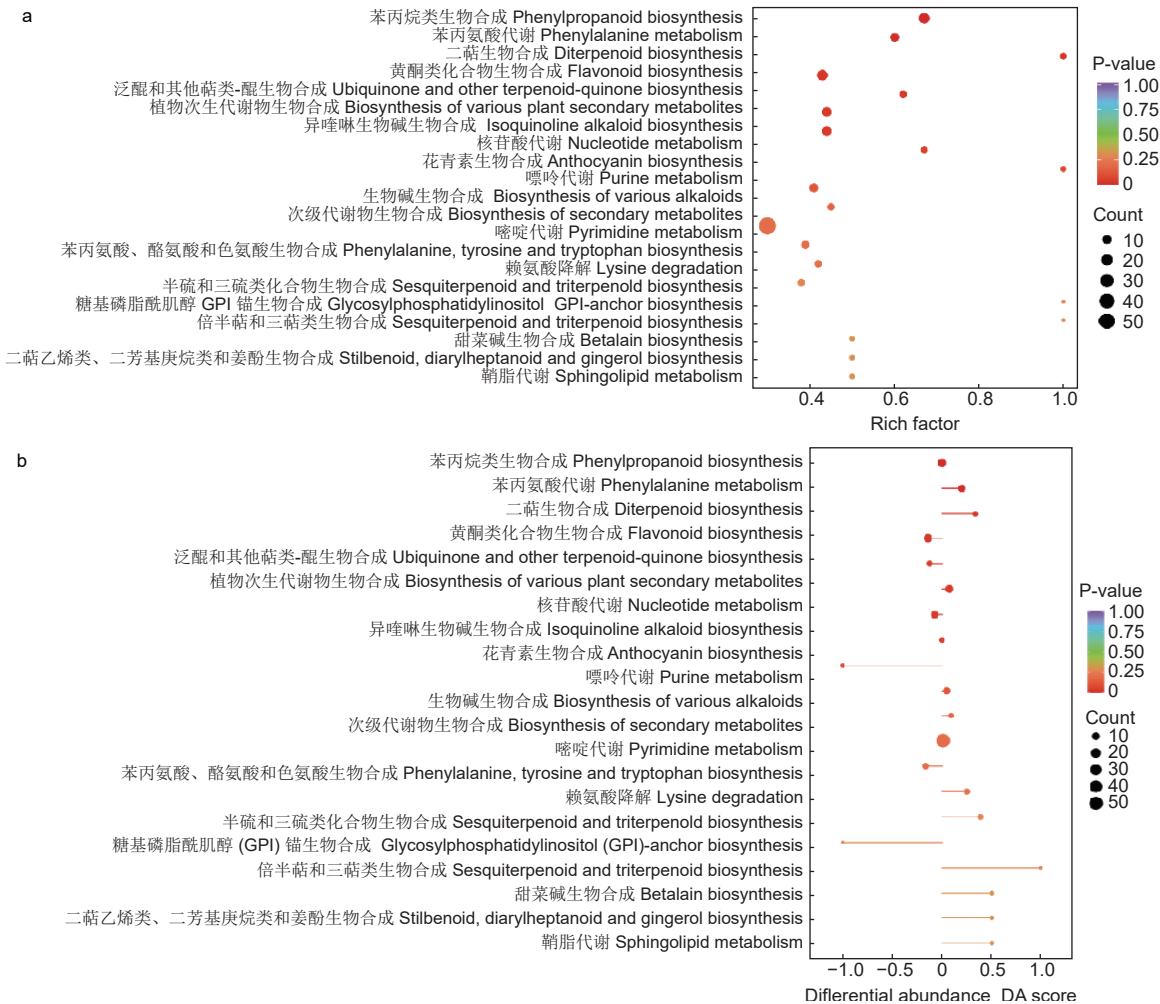


图 4 2 组样品差异代谢物 KEGG 富集图 (a) 及差异丰度得分图 (b)

Fig. 4 Differential metabolite KEGG enrichment plot (a) and differential abundance score plot (b) of the 2 groups of samples

biosynthesis)虽然富集程度较高,但尚未出现明显的上调或下调趋势。

3 讨论

为深入探究中国两大蜡梅之乡—河南鄢陵和重庆北碚的素心蜡梅花的代谢差异,本研究采用广靶 GC-MS 代谢组学分析,对两地素心蜡梅的代谢物进行全面系统分析,并通过 PCA 和 OPLS-DA 验证模型可靠。通过 PCA 分析发现河南鄢陵和重庆北碚的素心蜡梅盛花期样本间差异明显,这与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.)^[30]、红茶 (*Camellia sinensis* L.)^[31] 和枸杞 (*Lycium barbarum* M.)^[32] 在不同产地代谢产物存在差异的结果类似,表明植物的化学组成受其生长地理位置和环境条件的显著影响,反映了植物在幼苗建立及其后续生长阶段对环境 and 气候的响应^[33]。利用 OPLS-DA 模型,筛选出 613 种代谢物为两大主产区素心蜡梅花的代谢差异物。其中,79 种酚酸类、52 种黄酮、38 种生物碱等在河南鄢陵素心蜡梅中含量较高,而 48 种酚酸、48 种脂质、37 种黄酮等在重庆素心蜡梅中含量较高,表明河南素心蜡梅中含有较多的酚酸类、黄酮类和生物碱类化合物。已有大量研究表明,黄酮类、酚酸类、生物碱和香豆素是促进健康作用的功能活性物质,这些代谢物为素心蜡梅的为其在功能食品和医疗领域的应用提供了理论依据^[34]。因此,河南鄢陵的素心蜡梅相较于重庆北碚显示出更高含量的活性化合物,这可能由于其亚热带季风气候更有利于酚酸、黄酮及生物碱类化合物的合成与积累,这类物质在较低温度和适宜的水分条件下更为丰富。与此相对,重庆北碚的亚热带气候以及高雨量条件则可能更促进了脂质的合成。植物与环境之间的相互作用体现了其对生长环境的适应性以及代谢机制的多样性^[35]。值得关注的是,羟基香叶基 6-O-吡喃木糖基-吡喃葡萄糖苷、7-O-香叶基七叶树素、7-O-香叶基伞形酮的含量,在河南素心蜡梅中比重庆素心蜡梅分别高出 8.4 倍、7.66 倍和 7.51 倍。此外,杜仲脂素 A 和七叶树碱是区分河南素心蜡梅和重庆素心蜡梅的生物标志物。杜仲脂素 A 作为一种天然的二苯乙烯型化合物,能够促进超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 的活化,进而增加细胞清除自由基的能力^[36]。七叶树碱

具有抗氧化、神经保护、血管扩张、抗肿瘤等多种生物活性功能,能够通过抑制 PI3K/Akt 信号通路进而抑制膀胱癌细胞增殖和侵袭^[37]。

植物生长的代谢过程是一个综合性极强的系统,所有的代谢通路均在基因和环境的多重调控下进行,且各通路间存在复杂的相互联系^[34]。本研究探究了河南鄢陵和重庆北碚素心蜡梅的代谢差异,揭示了涉及苯丙烷生物合成、苯丙氨酸代谢、二萜生物合成、黄酮类化合物生物合成、泛醌和其他萜类-醌的生物合成途径等多个重要代谢途径。以上结果表明,河南鄢陵和重庆北碚的素心蜡梅在化学成分和生物学功能方面存在差异,这可以为蜡梅的道地产区的科学种植提供科学指导^[38]。此外,分析发现这两大主要产区的素心蜡梅在代谢过程中最大的差异表现在苯丙烷生物合成,这表明不同地理气候条件对苯丙烷类物质的影响较大,但其影响的机制目前尚不明确。植物苯丙烷生物合成途径是植物体内次生物质代谢的一条重要途径,由苯丙氨酸代谢到羟基肉桂酸(香豆酸)及其衍生物的合成途径,最终生成酚类、类黄酮和木质素等抗性物质,对植物生长发育和响应环境起到重要调控功能^[39]。参与苯丙烷的生物合成途径的物质有肉桂酸、对香豆酸、对香豆醛、松柏醇、绿原酸等、异丁子香酚、芥子酸等羧酸类物质以及 L-酪氨酸、L-苯丙氨酸等氨基酸及其衍生物等 16 种物质。苯丙素类生物合成是多途径共同作用的结果,其中 MYB 转录因子在苯丙素生物合成途径的调控中发挥重要作用^[38]。代谢通路分析发现 L-酪氨酸、L-谷氨酰胺、磷酸烯醇式丙酮酸、L-赖氨酸、O-乙酰丝氨酸等参与了多条代谢通路,说明这些物质对代谢通路影响较大,显示出其在代谢网络中的枢纽地位^[40]。

代谢组学作为研究生物系统中全部低分子化合物的学科,能够全面反映由环境变化或基因突变引发的基因表达和蛋白质功能的动态调整,进而展现出细胞或生物体的最终表型。此外,植物代谢物在人类健康方面也起着重要作用,可以给人类提供能量^[41]、营养^[42]、药物^[43] 和生物材料^[26]。考虑到单一分析平台的局限性,未来的研究可考虑整合多个分析平台,以获取更全面的代谢组数据。此外,基于代谢组的全基因组关联分析 (mGWAS) 也可作为后续研究的方向,有助于深入挖掘影响代谢物积累的关键基因,从而更为全面地解析素心蜡梅的代

谢组学特征, 为其功能开发提供坚实的理论基础。

4 结论

本研究基于 UPLC-MS/MS 的广泛靶向代谢组学, 对不同地理气候条件的素心蜡梅次生代谢产物进行了深入剖析。在河南鄢陵和重庆北碚的素心蜡梅样本中, 共成功鉴定出 2 175 种次生代谢物, 主要集中在黄酮类、酚酸类和脂质等类别。通过多元统计分析, 识别出 613 种显著性差异代谢物包括羟基香叶基 6-O-吡喃木糖基-吡喃葡萄糖苷、7-O-香叶基七叶树素和 7-O-香叶基伞形酮等。结果表明, 河南鄢陵和重庆北碚两大主要产地的素心蜡梅次生代谢物在种类和含量方面存在显著差异。其中, 杜仲脂素 A 和七叶树碱是区分河南素心蜡梅和重庆素心蜡梅的关键标志物。此外, 通过 KEGG 代谢通路分析进一步揭示, 129 种差异代谢物被注释至 83 条具体的代谢途径其中, 苯丙烷生物合成、黄酮类生物合成、氨基酸生物合成、ABC 转运体等通路的差异代谢物富集较多, 苯丙烷的生物合成、苯丙氨酸代谢、二萜生物合成等代谢通路被标识为显著富集的路径。综上, 本研究不仅阐明了素心蜡梅在化合物组成、功效和代谢途径方面的特性, 还揭示了素心蜡梅对其生长环境的适应性差异, 为蜡梅道地产区的科学种植和蜡梅资源的综合开发利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] DENG C H, SONG G X, HU Y M. Rapid determination of volatile compounds emitted from *Chimonanthus praecox* Flowers by HS-SPME-GC-MS[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 2015, 59 (9-10): 636-640.
- [2] ZHANG J W, GAO J M, XU T, et al. Antifungal activity of alkaloids from the seeds of *Chimonanthus praecox*[J]. Chem Biodivers, 2009, 6 (6): 838-845.
- [3] YANG N, ZHAO K G, LI X, et al. Comprehensive analysis of wintersweet flower reveals key structural genes involved in flavonoid biosynthetic pathway[J]. Gene, 2018, 676: 279-289.
- [4] LI H Z, ZHANG Y Q, LIU Q, et al. Preparative separation of phenolic compounds from *Chimonanthus praecox* flowers by high-speed counter-current chromatography using a stepwise elution mode[J]. Molecules, 2016, 21 (8): 1016.
- [5] 李帅岚, 邹峥嵘. 蜡梅属植物中黄酮和香豆素类成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2018, 49 (14): 3425-3431.
- [6] Lv J S, ZHANG L L, CHU X Z, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts of the flowers of the Chinese plant *Chimonanthus praecox*[J]. Nat Prod Res, 2012, 26 (14): 1363-1367.
- [7] MORIKAWA T, NAKANISHI Y, NINOMIYA K, et al. Dimeric pyrrolidinoindoline-type alkaloids with melanogenesis inhibitory activity in flower buds of *Chimonanthus praecox*[J]. Nat Med, 2012, 68 (3): 539-549.
- [8] SHU R G, WAN Y L, WANG X M. Non-volatile constituents and pharmacology of *Chimonanthus praecox*: A review[J]. Nat Med, 2019, 17 (3): 161-186.
- [9] 徐金标, 潘俊杰, 吕群丹, 等. 蜡梅科植物化学成分及其药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43 (10): 1957-1968.
- [10] DIXON R A, STRACK D. Phytochemistry meets genome analysis, and beyond[J]. Phytochemistry, 2003, 62 (6): 815-816.
- [11] SCHAUER N, FERNIE A R. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism[J]. Trends Plant Sci, 2006, 11 (10): 508-516.
- [12] MICHEL H. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts[J]. Trends Plant Sci, 1998, 3 (4): 147-151.
- [13] WANG F, CHEN L, CHEN H P, et al. Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (citrus reticulata "dahongpao") using UPLC-ESI-MS/MS[J]. Molecules, 2019, 24 (15): 2680.
- [14] YIN B, JIA J Q, SUN X, et al. Dynamic metabolic-QTL analyses provide novel biochemical insights into the kernel development and nutritional quality improvement in common wheat[J]. Plant Communications, 2024, 5(5):100792.
- [15] CHEN W, GAO Y Q, XIE W B, et al. Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism[J]. Nature Genetics, 2014, 46 (7): 714-721.
- [16] ARIMURA G I, OZAWA R, KUGIMIYA S, et al. Herbivore-induced defense response in a model legume two-spotted spider mites induce emission of(E)- β -ocimene and transcript accumulation of(E)- β -Ocimene synthase in lotus japonicas[J]. Plant Physiol, 2004, 135 (4): 1976-1983.
- [17] FU J J, CHENG Y B, LINGHU J J, et al. RNA sequencing reveals the complex regulatory network in the maize kernel[J]. Nature Communications, 2013, 4: 2832.
- [18] WRIGHT G A, LUTMERDING A, DUDAREVA N, et al. Intensity and the ratios of compounds in the scent of snapdragon flowers affect scent discrimination by honeybees(*Apis mellifera*)[J]. J Comp Physiol A, 2005, 191 (2): 105-114.
- [19] WANG J, ZHOU P F, SHI X L, et al. Primary metabolite contents are correlated with seed protein and oil traits in near-isogenic lines of soybean[J]. Crop J, 2019, 7: 651-659.
- [20] TAYLOR L P, BRIGGS W R. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings[J]. Plant Cell, 1990, 2: 115-127.

- [21] HECTORS K, VAN OEVELEN S, GEUNS J, *et al.* Dynamic changes in plant secondary metabolites during UV acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Physiol Plant*, 2014, 152 (2) : 219-230.
- [22] CARDOSO C, ZHANG Y X, JAMIL M, *et al.* Natural variation of rice strigolactone biosynthesis is associated with the deletion of two *MAX1* orthologs[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111 (6) : 2379-2384.
- [23] FANG C Y, LUO J. Metabolic GWAS-based dissection of genetic bases underlying the diversity of plant metabolism[J]. *Plant J*, 2019, 97 (1) : 91-100.
- [24] SCHMELZ E A, HUFFAKER A, SIMS J W, *et al.* Biosynthesis, elicitation and roles of monocot terpenoid phytoalexins[J]. *Plant J*, 2014, 79 (4) : 659-678.
- [25] VERMA N, SHUKLA S. Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites[J]. *J Appl Res Med Arom Plant*, 2015, 2 (4) : 105-113.
- [26] RAI A, SAITO K, YAMAZAKI M. Integrated omics analysis of specialized metabolism in medicinal plants[J]. *Plant J*, 2017, 90 (4) : 764-787.
- [27] LIN H, RAO J, SHI J X, *et al.* Seed metabolomic study reveals significant metabolite variations and correlations among different soybean cultivars[J]. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56 (9) : 826-836.
- [28] CARRARI F, BAXTER C, USADEL B, *et al.* Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior[J]. *Plant Physiol*, 2006, 142 (4) : 1380-1396.
- [29] DONG X K, GAO Y Q, CHEN W, *et al.* Spatiotemporal distribution of phenolamides and the genetics of natural variation of hydroxycinnamoyl spermidine in rice[J]. *Mol Plant*, 2015, 8 (1) : 111-121.
- [30] NICHOLSON J K, HOLMES E, LINDON J C, *et al.* The challenges of modeling mammalian biocomplexity[J]. *Nature Biotechnology*, 2004, 22 (10) : 1268-1274.
- [31] 林洁鑫, 王鹏杰, 金 珊, 等. 基于广泛靶向代谢组学的不同产地红茶代谢产物比较分析 [J]. 食品工业科技, 2022, 43 (2) : 9-19.
- [32] WANG Y J, LIANG X J, LI Y K, *et al.* Changes in metabolome and nutritional quality of lycium barbarum fruits from three typical growing areas of China as revealed by widely targeted metabolomics[J]. *Metabolites*, 2020, 10 (2) : 46.
- [33] FANG X L, HAN Y P, LIU M S, *et al.* Modulation of evening complex activity enables north-to-south adaptation of soybean[J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64 (2) : 179-195.
- [34] ZHOU M C, SUN Y L, LUO L, *et al.* Road to a bite of rosehip: A comprehensive review of bioactive compounds, biological activities, and industrial applications of fruits[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2023, 136: 76-91.
- [35] CHRISTIE P J, ALFENITO, M R, WALBOT V. Impact of low-temperature stress on general phenylpropoid and anthocyanin pathways-Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings[J]. *Planta*, 1994, 194: 541-549.
- [36] LI Q, REN Y P, HUANG C J, *et al.* Antioxidant activity of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf extracts evaluated by different antioxidant assays[J]. *Natural Product Research*, 2013, 27(19): 1757-1760.
- [37] LI W, LIU M, XU Y F, *et al.* Aesculetin inhibits the proliferation and invasion of bladder cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt pathway[J]. *J Cancer*, 2021, 12(12): 3680-3689.
- [38] 张 琴, 董晓庆, 林 欣, 等. 基于 UPLC-MS/MS 的不同产地蜂糖李果实初生代谢差异分析 [J]. 食品科学, 2023, 44 (8) : 284-292.
- [39] 张 舒, 王长远, 冯玉超, 等. 气相色谱-质谱联用代谢组学技术分析不同产地稻米代谢物 [J]. 食品科学, 2021, 42 (8) : 206-213.
- [40] 史斌斌. 铁核桃多酚类物质含量与抗氧化活性、代谢相关酶活性的关系 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2017.
- [41] KEURENTJES J J. Genetical metabolomics: closing in on phenotypes[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 12 (2) : 223-230.
- [42] DE L V, SALIM V, ATSUMI S M, *et al.* Mining the biodiversity of plants: a revolution in the making[J]. *Science*, 2012, 336 (6089) : 1658-1661.
- [43] WURTZEL E T, KUTCHAN T M. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future[J]. *Science*, 2016, 353 (6305) : 1232-1236.

Comparative Analysis of Metabolites of *Chimonanthus praecox*
based on Extensive Targeted Metabolomics in the
Main Producing Areas

ZHOU Dan¹, TONG Yu-hang², ZHAO Yan-bei¹, ZHANG Lin-yu², WANG Zi-xu¹, LI Qing-wei¹

(1. National Key Laboratory for Efficient Production of Forest Resources, School of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083 China; 2. Beijing Green Space Maintenance and Management Affairs Center, Beijing 100074 China)

Abstract: [Objective] To explore the secondary metabolite profiles of *Chimonanthus praecox* from its main production areas, identify and analyze the variations in these metabolites and their metabolic pathways in *Chimonanthus praecox* from Yanling, Henan, and Beibei, Chongqing for providing a theoretical basis for the scientific cultivation of *Chimonanthus praecox*. [Method] Extensive targeted metabolomics based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS), metabolomic analysis was used to conduct on samples during the blooming period from two regions. [Result] 1) A total of 2 175 secondary metabolites were identified in the samples from the two origins, which were mainly classified into 13 categories according to their chemical structures. Flavonoids were the most predominant with 387 types, followed by phenolic acids, lipids, alkaloids, terpenes, amino acids and their derivatives, lignans and coumarins, organic acids, nucleotides and derivatives, quinones, tannins, and steroids. 2) Compared with Chongqing *Chimonanthus praecox*, Henan *Chimonanthus praecox* exhibited 613 significantly different metabolites, of which 346 metabolites were significantly upregulated. This included 79 phenolic acids, 52 flavonoids, 38 alkaloids, 32 organic acids, 27 amino acids and their derivatives, 24 terpenoids, 8 lipids, 7 quinones, 7 nucleotides and their derivatives, and 38 others. 3) According to KEGG annotation, 129 differential metabolites were annotated across 83 metabolic pathways. Metabolites associated with the phenylpropanoid biosynthesis, flavonoid biosynthesis, amino acid biosynthesis, and ABC transporter pathways were notably enriched. Significant enrichment was observed in five metabolic pathways: phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism, diterpenoid biosynthesis, flavonoid compound biosynthesis, and the synthesis of ubiquinone and other terpenoid-quinones. [Conclusion] A total of 2 175 secondary metabolites were detected in *Chimonanthus praecox* from two main production areas. *Chimonanthus praecox* in the two areas showed significant differences in secondary metabolites, including 613 significantly different metabolisms, mainly concentrated in phenolic acids and flavonoids. Among them, Eucommia lipid A and aescin are the key markers for distinguishing *Chimonanthus praecox* from the two main producing areas. There are many differential metabolites in phenylpropanoid biosynthesis, flavonoid biosynthesis, amino acid biosynthesis, ABC transporter and other pathways. The differential metabolites of phenylpropanoid biosynthesis, phenylalanine metabolism and diterpene biosynthesis are significantly enriched.

Keywords: comparative metabolomics; differential metabolites; liquid chromatography-mass spectrometry; functional compounds; secondary metabolites.

(责任编辑：张 研)