



## 基于广泛靶向代谢组学分析黑老虎不同部位成分差异

高渐飞, 周玮, 杨艳

引用本文:

高渐飞,周玮,杨艳. 基于广泛靶向代谢组学分析黑老虎不同部位成分差异[J]. *热带亚热带植物学报*, 2023, 31(3): 424–432.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4602>

---

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### [番石榴4个品种叶和幼果的生物活性和酚类成分研究](#)

Biological Activities and Phenolic Constituents in Extracts from Leaves and Young Fruits of Four Guava Cultivars

*热带亚热带植物学报*. 2021, 29(6): 694–702 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4416>

#### [接种丛枝菌根真菌对柑橘生长与次生代谢的影响](#)

*热带亚热带植物学报*. 2020, 28(1): 78–83 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4087>

#### [不同白化期的‘黄山白茶’代谢物差异分析](#)

Metabolites Profiling of Green Tea Processed from ‘Huangshanbaicha No. 1’ Cultivar at Different Albino Stages

*热带亚热带植物学报*. 2022, 30(2): 187–194 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4461>

#### [铁皮石斛醇溶性浸出物和六类物质的动态变化研究](#)

Dynamic Changes in Alcohol Soluble Components and Six Kinds of Substances from *Dendrobium officinale*

*热带亚热带植物学报*. 2017, 25(4): 370–378 <https://doi.org/10.11926/jtsb.3703>

#### [黄兰叶乙醇提取物的活性研究和成分分析](#)

Bioactivity and Chemical Composition of Ethanol Extract from *Michelia champaca* Leaves

*热带亚热带植物学报*. 2022, 30(1): 135–143 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4396>

向下翻页, 浏览PDF全文

# 基于广泛靶向代谢组学分析黑老虎不同部位成分差异

高渐飞<sup>1</sup>, 周玮<sup>2\*</sup>, 杨艳<sup>3</sup>

(1. 贵州科学院贵州省山地资源研究所, 贵阳 550001; 2. 贵州工业职业技术学院, 贵阳 550008; 3. 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550014)

**摘要:** 为提高黑老虎(*Kadsura coccinea*)资源的综合利用率, 采用广泛靶向代谢组学技术鉴定并分析了根、茎、叶代谢组分差异及高度富集成分。结果表明, 在根、茎和叶中分别鉴定出 642、650 和 619 个代谢物, 以酚酸、脂质、类黄酮和有机酸为主; 叶与根、茎与根的共有成分分别为 566 和 650 个, 显著差异成分有 442 和 393 个, 主要为酚酸、类黄酮和脂质, 差异代谢物在苯丙烷生物合成、黄酮与黄酮醇生物合成通路中显著富集。代谢物总丰度和次生代谢物丰度均表现为叶>根>茎, 叶中酚酸、类黄酮和脂质及茎中酚酸积累量显著高于根, 而氨基酸及其衍生物、萜类、木脂素、香豆素、生物碱的丰度在根中显著上调。因此, 黑老虎根、茎、叶有大量共有成分, 叶和茎中酚酸、叶中类黄酮和脂质高度富集, 含有新绿原酸、绿原酸、槲皮素等多个丰度较高且具有重要生物活性化合物, 具有较高利用价值。

**关键词:** 黑老虎; 代谢物; 酚类; 木脂素

doi: 10.11926/jtsb.4602

## Metabolic in Different Tissues of *Kadsura coccinea* by Using Widely-targeted Metabolomics

GAO Jianfei<sup>1</sup>, ZHOU Wei<sup>2\*</sup>, YANG Yan<sup>3</sup>

(1. Guizhou Mountainous Resources Institute, Guizhou Academy of Sciences, Guiyang 550001, China; 2. Guizhou Industry Polytechnic College, Guiyang 550008, China; 3. Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550014, China)

**Abstract:** To improve the comprehensive utilization of *Kadsura coccinea* resources, the differential and highly enriched metabolic components of root, stem and leaf were analyzed by using wide range of targeted metabolomics techniques. The results showed that there were 642, 650 and 619 metabolites identified from roots, stems and leaves, respectively, in which phenolic acids, lipids, flavonoids and organic acids were dominant in quantity. There were 566 and 650 common metabolites in leaves and roots, stems and roots, respectively, of which 442 and 393 were significantly different metabolites, mainly including phenolic acids, flavonoids and lipids. Moreover, these differentially metabolites were significantly enriched in pathways of phenylpropane biosynthesis, flavone and flavonol biosynthesis. The total and secondary metabolites abundances were in the order of leaf>root>stem. The accumulation of phenolic acids, flavonoids and lipids in leaves and phenolic acids in stems were significantly higher than those in roots; while the abundance of amino acids and their derivatives, terpenoids, lignans, coumarins and alkaloids were significantly up-regulated in roots. Therefore, there were a large number of common components in roots, stems and leaves of *K. coccinea*. Phenolic acids, flavonoids and lipids in leaves and stems were highly enriched, and several bioactive compounds, such as neochlorogenic acid, chlorogenic acid and

收稿日期: 2021-12-30 接受日期: 2022-03-30

基金项目: 贵州省科技计划重大专项(黔科合平台人才[2017]5411号); 国家重点研发计划课题(2016YFC0502601)资助

This work was supported by the Key Project for Science and Technology in Guizhou (Grant No. [2017]5411), and the National Key Research and Development Program of China (Grant No. 2016YFC0502601).

作者简介: 高渐飞(1985年生), 男, 高级工程师, 研究方向为生态保护与资源开发利用。E-mail: gaojf2010@163.com

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhouwei\_460@163.com

quercetin, were highly abundant and have high utilization value.

**Key words:** *Kadsura coccinea*; Metabolites; Phenols; Lignans

黑老虎(*Kadsura coccinea*)又名冷饭团、布福娜、大叶南五味子等,为多年生常绿木质藤本,为五味子科(Schisandraceae)南五味子属植物,分布于贵州、广西、云南等地。其根为重要中药材,常用于治疗胃溃疡和肠胃炎、风湿性关节炎、跌打肿痛等<sup>[1-2]</sup>。研究表明黑老虎根茎的主要成分为木脂和萜类,已从中分离得到大量化合物<sup>[3-5]</sup>,其中一些还被证实具有抗肿瘤、抗 HIV、抗炎、保肝等重要活性作用<sup>[6-9]</sup>。此外,为了推动茎和叶的利用,有研究测定分析了所含氨基酸、脂肪酸、挥发性物质和矿物质元素等,显示其在保健和药用领域利用价值较高<sup>[10-11]</sup>。然而,目前对于黑老虎根、茎、叶中代谢物组分的全面解析,以及3个部位间成分的差异还鲜见报道。黑老虎生境较特殊,被列入 IUCN 红色名录,保护级别为易危<sup>[12]</sup>。而近 10 年来,因被作为新型水果种植,野生植株遭受任意采挖,生境破坏、资源锐减;与此同时,种植过程中因修剪有大量茎叶产生,目前多被丢弃<sup>[10-11]</sup>。因此,探究根、茎、叶联同利用或挖掘其中高度富集成分具有重要意义。广泛靶向代谢组学技术能高精度、高通量、广覆盖检测生物样本中的代谢物及含量,已得到广泛认可<sup>[13-15]</sup>。本研究利用广泛靶向代谢组学方法,基于超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)技术,鉴定黑老虎叶、茎、根中的代谢物,分析其多样性与富集特征,解析3个部位间显著差异代谢物及代谢途径,为拓宽资源利用深度和广度提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集与预处理

黑老虎植株为人工栽培,栽植于覆盖 80%遮阳网的塑料大棚,位于贵州省贵阳市乌当区下坝镇普渡村,定期修剪管理,长势良好;栽培 6 a,藤蔓已木质化。于 2020 年 7 月 29 日,选 3 株长势相近的取样。用小铲子辅助刨开土壤,每株剪下 2~3 个主根及细根作为根部样品,2~3 枝地表以上约 10 cm 起的主蔓之一为其茎部,5~6 片中下部长势较好的成熟叶片作为叶。分别用 10 mL 冻存管取 3 个重复,分别编号为 KR1~KR3 (根)、KS1~KS3 (茎)和 KL1~KL3 (叶);然后迅速置于液氮中,随后干冰保存转

运至实验室-80 °C 超低温冰箱中保存备用。

将 3 组供试样品放置于冻干机(Scientz-100F)中真空冷冻干燥,用研磨仪(MM 400, Retsch)研磨(30 Hz, 1.5 min)至粉末状;准确称取 100 mg 粉末溶解;每 30 min 涡旋 1 次,每次持续 30 s,共涡旋 6 次,样本置于 4 °C 冰箱过夜;在 13 600×g 离心 10 min 后,吸取上清,用微孔滤膜(0.22 μm)过滤样品,并保存于进样瓶中,用于 UPLC-MS/MS 分析。

### 1.2 色谱质谱采集条件

数据采集仪器系统主要包括超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC) (SHIMADZU Nexera X2, <https://www.shimadzu.com.cn/>)和串联质谱(tandem mass spectrometry, MS/MS) (Applied Biosystems 4500 Q TRAP, <http://www.appliedbiosystems.com.cn/>)。

液相条件:色谱柱:Agilent SB-C18 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm);流动相:A相为 0.1%甲酸-超纯水,B相为 0.1%甲酸-乙腈;洗脱梯度:0~9 min 5% B; 9~10 min 95% B; 10~14 min, 5% B;流速为 0.35 mL/min;柱温为 40 °C;进样量为 4 μL。

利用 AB4500 Q TRAP UPLC/MS/MS 系统(配备 ESI Turbo 离子喷雾接口)检测电喷雾离子源(ESI),由 Analyst 1.6.3 软件(AB Sciex)控制运行。ESI 源操作参数:离子源,涡轮喷雾;源温度 550 °C;离子喷雾电压(IS) 5 500 V (正离子模式)/-4 500 V (负离子模式);离子源气体 I (GSI)、气体 II (GSII)和帘气(CUR)分别设置为 50、60 和 25.0 psi,参数设置为高。

### 1.3 样本质控

质控样本(quality control, QC)由样本提取物混合制备而成,用于分析样本在相同的处理方法下的重复性。在仪器分析过程中,每 3 个检测分析样本中插入 1 个质控样本,以监测分析过程的重复性。

### 1.4 数据分析

基于迈维(武汉)生物技术有限公司 MWDB 数据库(Metware database)和代谢物信息公共数据库根据二级谱信息进行物质定性,采用三重四极质谱多反应监测模式(multi reaction monitor, MRM)对代谢物进行定量。获得不同样本的代谢物质谱分析数据

后, 利用软件 Analyst 1.6.3 对物质质谱峰进行峰面积积分, 并对其中同一代谢物在不同样本中的质谱出峰进行积分校正<sup>[16]</sup>。

根据正交偏最小二乘法判别模型(orthogonal partial least squares discriminant analysis, OPLS-DA)分析代谢组数据, 绘制各分组的得分图, 展示各组分间的差异<sup>[17]</sup>。评价模型的预测参数有  $R^2X$ 、 $R^2Y$  和  $Q^2$ , 其中  $R^2X$  和  $R^2Y$  分别表示所建模型对  $X$  和  $Y$  矩阵的解释率,  $Q^2$  表示模型的预测能力, 这 3 个指标越接近于 1 时表示模型越稳定可靠,  $Q^2 > 0.5$  认为是有效的模型,  $Q^2 > 0.9$  为出色的模型。基于 OPLS-DA 结果, 从获得的多变量分析 OPLS-DA 模型的变量重要性投影(variable importance in projection, VIP), 选取  $VIP \geq 1$ 、fold change  $\geq 2$  和 fold change  $\leq 0.5$  的代

谢物为差异代谢物(differential metabolites, DAMs)。

## 2 结果和分析

### 2.1 代谢物多样性与丰度

在黑老虎根、茎、叶中分别鉴定出 619、650 和 642 个代谢物, 共计 708 个; 其中叶与根共有成分 566 个, 茎与根共有 650 个, 3 个部位共有成分 555 个。基于结构分析, 代谢物可分为 11 类化合物, 3 个部位的代谢物均包含这 11 类成分, 数量上以酚酸、脂质、黄酮和有机酸为主(表 1); 其中, 酚酸类数量在根中大幅减少, 致其代谢物多样性低于叶和茎。叶、茎分别与根有 233 和 241 个共有次生代谢成分, 主要由酚酸和类黄酮组成。

表 1 黑老虎根、茎、叶中的代谢物

Table 1 Metabolites in leaf, stem and root of *Kadsura coccinea*

类别 Type	数量 Number	器官 Organ			叶和根相同 Common in leaf and root	茎和根相同 Common in stem and root	根茎叶相同 Common in root, stem and leaf
		叶 Leaf	根 Root	茎 Stem			
氨基酸及其衍生物 Amino acid and derivative	68	63	67	66	62	65	60
酚酸 Phenolic acid	137	125	103	125	98	98	94
核苷酸及其衍生物 Nucleotide and derivative	40	40	39	40	39	39	39
黄酮 Flavonoid	85	80	67	75	62	63	61
木脂素和香豆素 Lignan and coumarin	45	28	37	29	20	23	20
单宁 Tannin	11	8	10	11	7	10	7
生物碱 Alkaloid	16	15	13	14	12	12	12
萜类 Terpenoid	41	36	39	36	34	35	34
有机酸 Organic acid	73	68	63	71	61	63	61
脂质 Lipids	132	122	125	126	117	120	115
其他 Others	60	57	56	57	54	54	52

从表 2 可见, 叶中代谢物总丰度最高, 为  $105.37 \times 10^7$ , 根次之( $104.41 \times 10^7$ ), 茎最低( $86.44 \times 10^7$ ); 次生代谢物丰度亦是叶( $62.49 \times 10^7$ ) > 根( $57.06 \times 10^7$ ) > 茎( $53.03 \times 10^7$ ), 叶、茎与根共有的次生代谢物丰度都高于根(叶  $58.47 \times 10^7$  > 根  $50.96 \times 10^7$ 、茎  $52.42 \times 10^7$  > 根  $51.87 \times 10^7$ )。叶和茎中酚酸的积累量显著上升, 而根部急剧下降; 黄酮和脂质类丰度在叶中显著上升, 至茎和根中则大幅下降; 而氨基酸及其衍生物、萜类、木脂素和香豆素、生物碱都在根中显著向上表达, 尤其后 2 类成分剧烈向上积累; 有机酸、核苷酸及其衍生物在 3 个部位中含量差异较小。

以丰度  $\geq 2.0 \times 10^7$  为标准分析含量较高的化合物, 共筛选出 33 个, 其中叶 19 个、茎 17 个、根仅有 7 个(表 3); 这些物质在 3 个部位的积累量差异

显著, 但累计丰度很接近(叶  $56.27 \times 10^7$ 、茎  $55.44 \times 10^7$ 、 $56.14 \times 10^7$ ), 且分别占各自部位代谢物总丰度的 53% 以上, 表明叶、茎、根中有基本一致的优势成分。新绿原酸、绿原酸、高香草酰奎宁酸等在叶中含量较高, 5-(2-羟乙基)-2-O-葡萄糖基苯酚、原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷、1-O-龙胆酰-D-葡萄糖则在茎中显著积累, 使得这 2 个部位的酚酸丰度较高; 叶中槲皮素-4'-O-葡萄糖苷和槲皮素-3-O-葡萄糖苷积累量较高, 而日本南五味子木脂素 G、五羟色胺、Kadcocclactone F 仅在根中富集。

### 2.2 差异代谢物分析

**主成分分析** 主成分分析(PCA)表明(图 1), PC1 和 PC2 两个主成分能很好反映样本的主要特征信息。第 1 主成分的贡献率为 50.3%, 第 2 主成分

表2 黑老虎根、茎、叶的代谢物丰度( $\times 10^7$ )Table 2 Abundance ( $\times 10^7$ ) of metabolites in leaf, stem and root of *Kadsura coccinea*

类别 Type	叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	叶和根共有 Common in leaf and root		茎和根共有 Common in stem and root	
				叶 Leaf	根 Root	茎 Stem	根 Root
				氨基酸及其衍生物 Amino acid and derivative	4.07	17.34	8.13
酚酸 Phenolic acid	31.57	11.39	31.14	30.48	11.36	30.84	11.37
核苷酸及其衍生物 Nucleotide and derivative	1.51	1.30	1.54	1.50	1.30	1.54	1.30
黄酮 Flavonoid	24.00	9.05	13.45	21.84	8.88	13.28	9.00
木脂素和香豆素 Lignan and coumarin	2.37	11.48	2.66	1.62	7.41	2.53	7.78
单宁 Tannin	0.13	3.29	2.42	0.13	3.19	2.42	3.29
生物碱 Alkaloid	0.72	14.44	1.63	0.71	14.43	1.62	14.43
萜类 Terpenoid	3.71	7.42	1.74	3.70	5.69	1.73	6.00
有机酸 Organic acid	9.70	10.39	11.65	9.66	10.39	11.59	10.39
脂质 Lipid	23.04	12.01	9.68	22.97	11.96	9.65	11.96
其他 Other	4.56	4.29	2.41	4.54	4.29	2.37	4.29

表3 黑老虎根、茎和叶中含量较高的成分

Table 3 Compounds with higher content detected in leaf, stem and root of *Kadsura coccinea*

质荷比 m/z	离子模式 Ion model	化合物 Compound	类型 Type	丰度 Abundance ( $\times 10^7$ )		
				叶 Leaf	茎 Stem	根 Root
178.0	[M + H] <sup>+</sup>	N-甲酰-L-蛋氨酸 N-Formyl-L-methionine	氨基酸及其衍生物 Amino acid and derivative	0.099	0.337	8.213
148.1	[M + H] <sup>+</sup>	L-谷氨酸 L-Glutamic acid	氨基酸及其衍生物 Amino acid and derivative	0.610	1.843	1.576
153.0	[M - H] <sup>-</sup>	原儿茶酸 Protocatechuic acid	酚酸 Phenolic acid	0.206	2.904	0.110
153.0	[M - H] <sup>-</sup>	2,4-二羟基苯甲酸 2,4-Dihydroxybenzoic acid	酚酸 Phenolic acid	0.143	1.977	0.073
279.2	[M + H] <sup>+</sup>	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	酚酸 Phenolic acid	2.489	3.136	1.465
279.2	[M + H] <sup>+</sup>	邻苯二甲酸二异丁酯 Diisobutyl phthalate	酚酸 Phenolic acid	2.408	3.112	1.389
315.1	[M - H] <sup>-</sup>	1-O-龙胆酰-D-葡萄糖 1-O-Gentisoyl-D-glucoside	酚酸 Phenolic acid	1.484	3.650	1.454
315.1	[M - H] <sup>-</sup>	原儿茶酸-4-O-葡萄糖苷 Protocatechuic acid-4-O-glucoside	酚酸 Phenolic acid	1.360	3.113	1.077
315.1	[M - H] <sup>-</sup>	5-(2-羟乙基)-2-O-葡萄糖基苯酚 5-(2-Hydroxyethyl)-2-O-glucosylphenol	酚酸 Phenolic acid	0.151	4.047	0.346
329.1	[M - H] <sup>-</sup>	3,4,5-三甲氧基苯基-1-O-葡萄糖苷 3,4,5-Trimethoxyphenyl-1-O-Glucoside	酚酸 Phenolic acid	0.165	2.080	2.043
279.2	[M + H] <sup>+</sup>	邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate	酚酸 Phenolic acid	2.489	3.136	1.465
279.2	[M + H] <sup>+</sup>	邻苯二甲酸二异丁酯 Diisobutyl phthalate	酚酸 Phenolic acid	2.408	3.112	1.389
337.1	[M - H] <sup>-</sup>	3-O-对香豆酰奎宁酸 3-O-p-Coumaroylquinic acid	酚酸 Phenolic acid	3.783	0.016	0.033
337.1	[M - H] <sup>-</sup>	1-O-对香豆酰奎宁酸 1-O-p-Coumaroylquinic acid	酚酸 Phenolic acid	3.979	0.007	0.010
353.1	[M - H] <sup>-</sup>	新绿原酸 Neochlorogenic acid	酚酸 Phenolic acid	2.366	0.006	0.002
353.1	[M - H] <sup>-</sup>	绿原酸 Chlorogenic acid	酚酸 Phenolic acid	2.336	0.006	0.002
355.1	[M - H] <sup>-</sup>	高香草酰奎宁酸 Homovanilloylquinic acid	酚酸 Phenolic acid	3.456	0.001	0.005
133.0	[M - H] <sup>-</sup>	L-苹果酸 L-Malic acid	有机酸 Organic acid	2.146	2.034	1.239
153.0	[M - H] <sup>-</sup>	2,3-二羟基苯甲酸 2,3-Dihydroxybenzoic Acid	有机酸 Organic acid	0.157	2.168	0.072
133.0	[M - H] <sup>-</sup>	L-苹果酸 L-Malic acid	有机酸 Organic acid	2.146	2.034	1.239
279.2	[M - H] <sup>-</sup>	亚油酸 Linoleic acid	脂质 Lipid	3.130	2.052	1.734
478.3	[M + H] <sup>+</sup>	溶血磷脂酰乙醇胺 18:2 LysoPE 18:2	脂质 Lipid	2.341	0.535	1.768
478.3	[M + H] <sup>+</sup>	溶血磷脂酰乙醇胺 18:2 (2n 异构) LysoPE 18:2 (2n isomer)	脂质 Lipid	2.344	0.552	1.772
279.2	[M - H] <sup>-</sup>	亚油酸 Linoleic acid	脂质 Lipid	3.130	2.052	1.734
289.1	[M - H] <sup>-</sup>	儿茶素 Catechin	黄酮 Flavonoid	0.728	4.814	4.503
305.1	[M - H] <sup>-</sup>	表没食子儿茶素 Epigallocatechin	黄酮 Flavonoid	2.114	2.955	1.925
463.1	[M - H] <sup>-</sup>	槲皮素-4'-O-葡萄糖苷 Quercetin-4'-O-glucoside	黄酮 Flavonoid	2.699	0.133	0.011
463.1	[M - H] <sup>-</sup>	槲皮素-3-O-葡萄糖苷 Quercetin-3-O-glucoside	黄酮 Flavonoid	3.151	0.160	0.013
305.1	[M - H] <sup>-</sup>	表没食子儿茶素 Epigallocatechin	黄酮 Flavonoid	2.114	2.955	1.925

续表(Continued)

质荷比 <i>m/z</i>	离子模式 Ion model	化合物 Compound	类型 Type	丰度 Abundance ( $\times 10^7$ )		
				叶 Leaf	茎 Stem	根 Root
305.1	[M - H] <sup>-</sup>	表没食子儿茶素 Epigallocatechin	黄酮 Flavonoid	2.114	2.955	1.925
543.2	[M - H] <sup>-</sup>	日本南五味子木脂素 G Kadsuralignan G	木脂素 Lignan	0.001	0.006	3.298
177.1	[M + H] <sup>+</sup>	<i>N</i> -羟基色胺 <i>N</i> -Hydroxytryptamine	生物碱 Phenolamine	0.066	0.244	4.865
177.1	[M + H] <sup>+</sup>	五羟色胺 Serotonin	生物碱 Plumerane	0.070	0.261	6.197
543.2	[M - H] <sup>-</sup>	Kadcocclactone F	萜类 Triterpene	0.001	0.006	3.193

的为 36.4%，两个主成分的累积贡献率为 86.7%。样本在图中表现出明显的分离趋势，表明对各样本数据处理结果可信，样本间存在明显差异。

**OPLS-DA 模型** 建立叶与根、茎与根之间的两组 PLS-DA 模型，结果表明，两组模型的  $R^2X$

分别为 0.870 和 0.877， $R^2Y$  均为 1， $Q^2$  均为 0.998，说明模型具有很好的预测能力和可靠性，能够很好地表现各组间代谢物的变化趋势。对 OPLS-DA 模型进行 200 次排列验证， $P < 0.005$ ，表明模型有统计学意义，可根据 VIP 值分析筛选 DAMs。

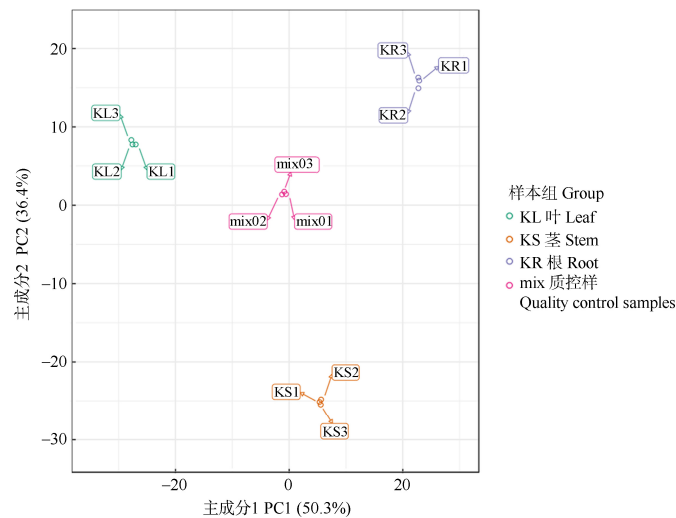


图 1 1 样本的 PCA 得分图

Fig. 1 PCA map of all samples

**差异代谢物分布** 基于 OPLS-DA 结果，根据 DAMs 筛选标准，叶与根 DAMs 数量为 442 个，茎与根为 393 个(表 4)。2 对照组中 DAMs 以下调模式占主导，酚酸、黄酮、脂质类是 DAMs 的主要成分，且酚酸和类黄酮的 DAMs 均以下调为主，是 2 组中下调 DAMs 的主要组分，使其在根中丰度显著下调；而木脂素和香豆素、萜类中 DAMs 上调的占优，得益于此 2 类物质在根中显著向上积累。

**主要差异代谢物** 两组差异倍数排在前 20 的差异代谢物中向上表达的多为木脂素和萜类(90%)，而向下积累的主要是酚酸和类黄酮，且有多个相同成分(图 2)。其中，乙酰表戈米辛 R、Kadcocclactone A、异五味子醇乙、狭叶南五味子素 I、五味子脂素 N、Kadcocclactone M、苯甲酰异五味子素 O 在两组中

均呈上调模式，下调 DAMs 中有 3 个相同代谢物：落叶松脂素-4'-*O*-葡萄糖苷、阿魏酰酒石酸、7*S*,8*S*-苏式-3',4,7,9-四羟基-3-甲氧基-8-*O*-4'-新木脂素-9'-*O*-鼠李糖苷。

**差异代谢物代谢通路分析** 利用 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 数据库对鉴定到的 DAMs 进行注释富集分析，获得 2 条显著富集的通路( $P$ -value  $\leq 0.01$ )。其在苯丙烷生物合成通路中富集最为显著，有 16 个 DAMs 注解，包括 15 个酚酸和 1 个有机酸类化合物(表 5)。绿原酸、5-*O*-对香豆酰奎宁酸和 2-羟基肉桂酸等 9 个酚酸类代谢物在叶中积累量显著上调。其次是黄酮与黄酮醇生物合成通路，12 个 DAMs 富集于此；其中 11 个成分在叶中丰度显著向上表达，异槲皮苷和三叶豆苷高度富集(表 6)。

表 4 差异代谢物

Table 4 Differentially accumulating metabolites

类型 Type	叶-根 Leaf vs root			茎-根 Stem vs root		
	总数 Total	上调 Up	下调 Down	总数 Total	上调 Up	下调 Down
氨基酸及其衍生物 Amino acid and derivative	48	40	8	36	27	9
酚酸 Phenolic acid	94	23	71	101	11	90
核苷酸及其衍生物 Nucleotide and derivative	18	9	9	15	8	7
黄酮 Flavonoid	67	12	55	59	12	47
木脂素和香豆素 Lignan and coumarin	41	27	14	42	22	20
单宁 Tannin	10	9	1	4	1	3
生物碱 Alkaloid	11	7	4	8	5	3
萜类 Terpenoid	15	9	6	17	12	5
有机酸 Organic acid	36	17	19	32	5	27
脂质 Lipids	71	26	45	59	33	26
其他类成分 Others	31	7	24	20	8	12

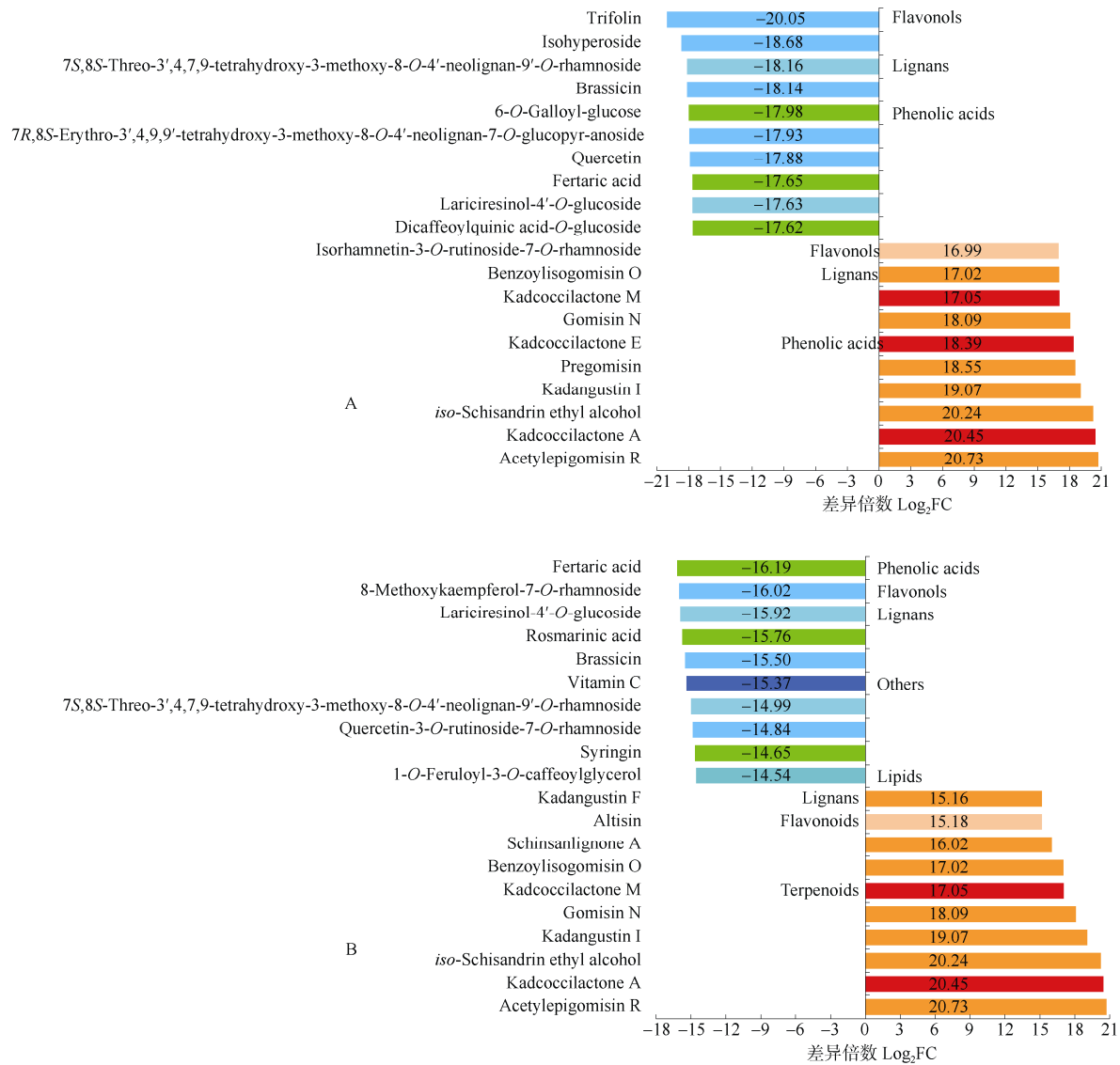


图 2 差异倍数最大的 20 种代谢物。A: 叶与根; B: 茎与根。

Fig. 2 Top 20 DAMs. A: Leaf vs Root; B: Stem vs Root.

表 5 富集于苯丙烷生物合成通路中的差异代谢物

Table 5 DAMs involved in phenylpropanoid biosynthesis pathway

质荷比 <i>m/z</i>	离子模式 Ion model	化合物 Compound	类型 Type	丰度 Abundance ( $\times 10^7$ )		
				叶 Leaf	茎 Stem	根 Root
165.1	[M + H] <sup>+</sup>	咖啡醛 Caffeic aldehyde	酚酸 Phenolic acid	0.010	0.003	-
165.1	[M + H] <sup>+</sup>	异丁子香酚 Isoeugenol	酚酸 Phenolic acid	0.008	0.001	0.020
179.1	[M + H] <sup>+</sup>	松柏醛 Coniferaldehyde	酚酸 Phenolic acid	0.004	0.007	0.004
179.0	[M - H] <sup>-</sup>	咖啡酸 Caffeic acid	酚酸 Phenolic acid	0.007	0.010	0.002
179.1	[M - H] <sup>-</sup>	松柏醇 Coniferyl alcohol	酚酸 Phenolic acid	0.002	0.034	0.012
193.1	[M - H] <sup>-</sup>	阿魏酸 Ferulic acid	酚酸 Phenolic acid	0.009	0.007	0.049
209.1	[M - H] <sup>-</sup>	芥子醇 Sinapyl alcohol	酚酸 Phenolic acid	-	0.007	-
321.1	[M + H] <sup>+</sup>	反式-5- <i>O</i> -对香豆酰莽草酸 <i>trans</i> -5- <i>O</i> -( <i>p</i> -Coumaroyl)shikimate	酚酸 Phenolic acid	0.069	0.026	0.003
335.1	[M - H] <sup>-</sup>	5- <i>O</i> -咖啡酰莽草酸 5- <i>O</i> -Caffeoylshikimic acid	酚酸 Phenolic acid	0.012	0.005	-
337.1	[M - H] <sup>-</sup>	5- <i>O</i> -对香豆酰奎宁酸 5- <i>O</i> - <i>p</i> -Coumaroylquinic acid	酚酸 Phenolic acid	0.343	0.010	0.002
341.1	[M + H] <sup>+</sup>	芥子酰苹果酸 Sinapoyl malate	酚酸 Phenolic acid	0.003	0.008	0.003
341.1	[M - H] <sup>-</sup>	松柏苷 Coniferin	酚酸 Phenolic acid	0.046	0.205	0.049
353.1	[M - H] <sup>-</sup>	绿原酸 Chlorogenic acid	酚酸 Phenolic acid	2.336	0.006	0.002
371.1	[M - H] <sup>-</sup>	紫丁香苷 Syringin	酚酸 Phenolic acid	0.045	0.023	-
385.1	[M - H] <sup>-</sup>	1- <i>O</i> -芥子酰-D-葡萄糖 1- <i>O</i> -Sinapoyl-D-glucose	酚酸 Phenolic acid	0.037	0.036	0.004
163.0	[M - H] <sup>-</sup>	2-羟基肉桂酸 2-Hydroxycinnamic acid	有机酸 Organic acid	0.039	0.029	0.014

-: 未检出。下同

-: Not detected. The same below

表 6 富集于黄酮与黄酮醇生物合成通路中的差异代谢物

Table 6 DAMs involved in flavone and flavonol biosynthesis pathway

质荷比 <i>m/z</i>	离子模式 Ion model	化合物 Compound	类型 Type	丰度 Abundance ( $\times 10^7$ )		
				叶 Leaf	茎 Stem	根 Root
345.1	[M - H] <sup>-</sup>	丁香亭 Syringetin	黄酮 Flavonoid	0.002	0.003	0.018
449.1	[M + H] <sup>+</sup>	木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷 (木犀草苷) Luteolin-7- <i>O</i> -glucoside (Cynaroside)	黄酮 Flavonoid	0.211	0.023	0.004
595.2	[M + H] <sup>+</sup>	木犀草素-7- <i>O</i> -新橘皮糖苷 (忍冬苷) Luteolin-7- <i>O</i> -neohesperidoside (Lonicerin)	黄酮 Flavonoid	0.307	0.039	0.006
593.2	[M - H] <sup>-</sup>	山奈酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷 (烟花苷) Kaempferol-3- <i>O</i> -rutinoside (Nicotiflorin)	黄酮 Flavonoid	0.272	0.022	0.002
285.0	[M - H] <sup>-</sup>	山奈酚 Kaempferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavone)	黄酮 Flavonoid	0.054	0.001	-
303.1	[M + H] <sup>+</sup>	槲皮素 Quercetin	黄酮 Flavonoid	0.217	0.018	-
329.1	[M - H] <sup>-</sup>	3,7-二- <i>O</i> -甲基槲皮素 3,7-Di- <i>O</i> -methylquercetin	黄酮 Flavonoid	0.000	0.002	0.006
447.1	[M - H] <sup>-</sup>	山奈酚-3- <i>O</i> -半乳糖苷 (三叶豆苷) Kaempferol-3- <i>O</i> -galactoside (Trifolin)	黄酮 Flavonoid	0.974	-	-
449.1	[M + H] <sup>+</sup>	山奈酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 (紫云英苷) (黄芪苷) Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside (Astragalin)	黄酮 Flavonoid	0.434	0.002	0.001
463.1	[M - H] <sup>-</sup>	槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷 (异槲皮苷) Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside (Isoquercitrin)	黄酮 Flavonoid	3.151	0.160	0.013
597.1	[M + H] <sup>+</sup>	槲皮素-3- <i>O</i> -桑布双糖苷 Quercetin-3- <i>O</i> -sambubioside	黄酮 Flavonoid	0.124	0.011	0.003
609.2	[M - H] <sup>-</sup>	槲皮素-3- <i>O</i> -芸香糖苷 (芦丁) Quercetin-3- <i>O</i> -rutinoside (Rutin)	黄酮 Flavonoid	0.267	0.117	0.008

### 3 结论和讨论

在黑老虎叶、茎和根中分别鉴定出 642、650 和 619 个代谢物，可分为氨基酸及其衍生物、酚酸类、木脂素等 11 类化合物，其中酚酸、脂质、黄酮和有机酸在各部位中均占主导。酚酸类化合物数量在根中减少，致其代谢物多样性略低于叶和茎。代谢物总丰度和次生代谢物丰度均为叶>根>茎，叶中酚酸、黄酮和脂质类积累量较高，而氨基酸及其衍生物、

萜类、木脂素和香豆素、生物碱都在根中显著上调，有机酸、核苷酸及其衍生物含量差异较小。

叶与根、茎与根中共有成分为 566 和 650 个，差异代谢物有 444 和 393 个。叶与根、茎与根的主要差异成分为酚酸、类黄酮和脂质，其在根中以下调模式为主；而木脂素和香豆素、萜类中的差异成分在根中以上调占优。差异代谢物在苯丙烷生物合成和黄酮与黄酮醇生物合成通路中显著富集，这有助于进一步了解黑老虎植株次生代谢物的生物合成



途径。如根中酚酸含量大幅减少可能是其在苯丙烷代谢途径各种酶的作用下合成了木脂素<sup>[18-19]</sup>, 从而使木脂素显著上调。

黑老虎叶和茎中积累量高的代谢物数量较多, 邻苯二甲酸二丁酯、邻苯二甲酸二异丁酯、L-苹果酸及表没食子儿茶素、表没食子儿茶素等同时存在于2个部位中; 而根中数量较少, 但鉴定到含量较高的木脂素和萜类代谢物。这些化合物中多个被证实具有重要药理活性和功效作用, 如绿原酸(叶中富集)有与VC相当的抗氧化活性<sup>[20]</sup>、可预防结肠癌、口腔癌等疾病的发生, 促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞生长<sup>[21]</sup>; 还对肝损伤有保护作用, 可预防对乙酰氨基酚引起的肝损伤<sup>[22-23]</sup>。儿茶素及衍生物(根、茎、叶均富集)有抗炎、抗菌、抗病毒及抗氧化等效用, 还可预防心脑血管疾病<sup>[24-25]</sup>, 以及保护肾脏、肝脏和神经系统等<sup>[26]</sup>; 此外, 还是茶叶的主要功能成分。槲皮素及其衍生物(叶中富集)具有优异的抗氧化特性<sup>[6]</sup>, 在神经系统疾病、炎症、肝脏疾病、心血管疾病、细菌和真菌感染<sup>[27]</sup>、抗癌<sup>[28]</sup>等疾病中具有重要药理作用, 对维持人体健康至关重要。日本南五味子木脂素G(根中富集)具有抗NO生成活性<sup>[29]</sup>。

综上, 黑老虎根中氨基酸及衍生物和生物碱含量较高, 主要功效成分木脂素和萜类也显著上调, 传统利用是否与此有关还有待进一步验证; 而叶和茎中酚酸、叶中类黄酮和脂质的丰度显著高于根, 含有多个高度富集化合物, 其生物活性和利用潜力值得关注。

## 参考文献

- [1] Chinese Herbal Medicine Editorial Committee of National Administration of Traditional Chinese Medicine. Chinese Herbal Medica, Vol. 2 [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999: 895. [国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草, 第2册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 895.]
- [2] SHU Y Z, CHENG L, YANG P M, et al. Advances in studies on chemical constituents in *Kadsura coccinea* and their pharmacological activities [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2011, 42(4): 805–813. [舒永志, 成亮, 杨培明. 黑老虎的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中草药, 2011, 42(4): 805–813. doi: cnki:sun:zeyo.0.2011-04-044.]
- [3] SHU Y Z, CHENG L, CHO J C, et al. Chemical constituents in roots and vine stems of *Kadsura coccinea* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2012, 43(3): 428–431. [舒永志, 成亮, 曹溶喆, 等. 黑老虎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2012, 43(3): 428–431. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.]
- [4] LI L, YANG L J, XU Y L, et al. Studies on the chemical constituents and functional effects of *Kadsura coccinea* in recent ten years [J]. Chin Med Mat, 2020, 43(1): 236–242. [李力, 汤立洁, 徐永莉, 等. 近十年黑老虎的化学成分及功能作用研究进展 [J]. 中药材, 2020, 43(1): 236–242. doi: 10.13863/j.issn1001-4454.2020.01.047.]
- [5] YANG Y P, HUSSAIN N, ZHANG L, et al. *Kadsura coccinea*: A rich source of structurally diverse and biologically important compounds [J]. Chin Herb Med, 2020, 12(3): 214–223. doi: 10.1016/j.chmed.2020.03.006.
- [6] PU J X, YANG L M, XIAO W L, et al. Compounds from *Kadsura heteroclita* and related anti-HIV activity [J]. Phytochemistry, 2008, 69(5): 1266–1272. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.11.019.
- [7] YAN Z H, CHENG L, KONG L Y, et al. Chemical constituents and their anti-oxidative activities of *Kadsura coccinea* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2013, 44(21): 2969–2973. [延在昊, 成亮, 孔令义, 等. 黑老虎化学成分及其抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(21): 2969–2973. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.21.005.]
- [8] SUN J, YAO J Y, HUANG S X, et al. Antioxidant activity of polyphenol and anthocyanin extracts from fruits of *Kadsura coccinea* (Lem.) A. C. Smith [J]. Food Chem, 2009, 117(2): 276–281. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.04.001.
- [9] BAN N K, VAN THANH B, VAN KIEM P, et al. Dibenzocyclooctadiene lignans and lanostane derivatives from the roots of *Kadsura coccinea* and their protective effects on primary rat hepatocyte injury induced by *t*-butyl hydroperoxide [J]. Planta Med, 2009, 75(11): 1253–1257. doi: 10.1055/s-0029-1185537.
- [10] YANG Y, GAO J F. Volatile components and their antioxidant activities in different parts of *Kadsura coccinea* [J]. Guihaia, 2018, 38(7): 943–952. [杨艳, 高渐飞. 冷饭团不同部位挥发性成分及抗氧化活性分析 [J]. 广西植物, 2018, 38(7): 943–952. doi: 10.11931/guihaia.gxzw.201708005.]
- [11] LIAO S Q, WANG L J, XIA X H, et al. Determination and evaluation of nutritional components in stem and leaves of *Kadsura cocinea* [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(5): 289–294. [廖苏奇, 王丽军, 夏祥华, 等. 黑老虎茎叶营养成分检测及评价 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(5): 289–294. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020040276.]
- [12] Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Information System of Chinese Rare and Endangered Plants [EB/OL]. (2021-09-14). [中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物信息系统 [EB/OL]. (2021-09-14). http://www.iplant.cn/rep/.]
- [13] LAU W, SATTELY E S. Six enzymes from mayapple that complete the biosynthetic pathway to the etoposide aglycone [J]. Science, 2015, 349(6253): 1224–1228. doi: 10.1126/science.aac7202.

- [14] XU L, XU Z Z, WANG X, et al. The application of pseudotargeted metabolomics method for fruit juices discrimination [J]. Food Chem, 2020, 316(30): 126278. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126278.
- [15] SUN W L, ZHAO H P, WANG X H, et al. Analysis on differential metabolites of Cervi Cornu Pantotrichum based on metabolomics [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2019, 50(20): 5047–5053. [孙伟丽, 赵海平, 王雪华, 等. 基于代谢组学技术分析不同区段鹿茸差异代谢分子物质 [J]. 中草药, 2019, 50(20): 5047–5053. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.029.]
- [16] FRAGA C G, CLOWERS B H, MOORE R J, et al. Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics [J]. Anal Chem, 2010, 82(10): 4165–4173. doi: 10.1021/ac1003568.
- [17] THÉVENOT E A, ROUX A, XU Y, et al. Analysis of the human adult urinary metabolome variations with age, body mass index, and gender by implementing a comprehensive workflow for univariate and OPLS statistical analyses [J]. J Proteome Res, 2015, 14(8): 3322–3335. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00354.
- [18] KUANG F Y, WU G B, ZHANG K, et al. Simultaneous determination of 5 phenolic acids involved in the phenylpropanoid pathway of postharvest wax apple [*Syzygium samarangense* (Blume) Merrill & L. M. Perry] by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2020, 41(8): 165–170. [匡凤元, 吴光斌, 张坤, 等. HPLC 法同时测定采后莲雾果实木质素代谢途径中 5 种酚酸的含量 [J]. 食品科学, 2020, 41(8): 165–170. doi: 10.7506/spkx1002-6630-20190303-014.]
- [19] MA Y, WEI Y, WANG M, et al. A review of process in understand biosynthesis pathway and metabolic regulation of phenolic acids in cereals [J]. Food Sci, 2019, 40(15): 269–276. [马燕, 魏媛, 王冕, 等. 谷物酚酸合成途径及代谢调控研究进展 [J]. 食品科学, 2019, 40(15): 269–276. doi: 10.7506/spkx1002-6630-20180918-198.]
- [20] KAWADA M, OHNO Y, RI Y, et al. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice [J]. Anti-Cancer Drugs, 2001, 12(10): 847–852. doi: 10.1097/00001813-200111000-00009.
- [21] WANG L P, GUO D, WANG G, et al. Advancement of chlorogenic acid in traditional Chinese medicine [J]. Lishizhen Med Mat Med Res, 2011, 22(4): 961–963. [王丽萍, 郭栋, 王果, 等. 中药绿原酸的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 961–963. doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2011.04.080.]
- [22] ALI N, RASHID S, NAFEES S, et al. Protective effect of chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach [J]. Chem Biol Interact, 2017, 272(25): 80–91. doi: 10.1016/j.cbi.2017.05.002.
- [23] PANG C, SHENG Y C, JIANG P, et al. Chlorogenic acid prevents acetaminophen-induced liver injury: The involvement of CYP<sub>450</sub> metabolic enzymes and some antioxidant signals [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16(7): 602–610. doi: 10.1631/jzus.b1400346.
- [24] NANCE C L, SIWAK E B, SHEARER W T. Preclinical development of the green tea catechin, epigallocatechin gallate, as an HIV-1 therapy [J]. J Allergy Clin Immunol, 2009, 123(2): 459–465. doi: 10.1016/j.jaci.2008.12.024.
- [25] NAKANISHI T, MUKAI K, YUMOTO H, et al. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors [J]. Eur J Oral Sci, 2010, 118(2): 145–150. doi: 10.1111/j.1600-0722.2010.00714.x.
- [26] YAN X, LIU H Q, ZOU Y Q, et al. Physiological activities and research advance in synthesis of flavonoids [J]. Chin J Org Chem, 2008, 28(9): 1534–1544. [延玺, 刘会青, 邹永青, 等. 黄酮类化合物生理活性及合成研究进展 [J]. 有机化学, 2008, 28(9): 1534–1544.]
- [27] YAO L H, JIANG Y M, SHI J, et al. Flavonoids in food and their health benefits [J]. Plant Food Hum Nurt, 2004, 59(3): 113–122. doi: 10.1007/s11130-004-0049-7.
- [28] CHOU C C, YANG J S, LU H F, et al. Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells [J]. Arch Pharm Res, 2010, 33(8): 1181–1191. doi: 10.1007/s12272-010-0808-y.
- [29] MURAKAMI A, NAKAMURA Y, TORIKAI K, et al. Inhibitory effect of citrus nobiletin on phorbol ester-induced skin inflammation, oxidative stress, and tumor promotion in mice [J]. Cancer Res, 2000, 60(18): 5059–5066.
- [30] REN W G, ZHANG C Y. Research progress of *Schisandra chinensis* and predictive analysis of Q-marker [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2020, 51(11): 3110–3116. [任伟光, 张翠英. 五味子的研究进展及质量标志物(Q-marker)的预测分析 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3110–3116. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.031.]
- [31] QI X Z, LIU J B, CHEN J B, et al. Lignans and triterpenoids from roots of *Kadsura longipedunculata* [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2017, 48(11): 2164–2171. [齐新柱, 刘佳宝, 陈佳宝, 等. 南五味子根中木脂素和三萜类化学成分的研究 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2164–2171. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.002.]