

刺五加果实发育过程的代谢差异

孙菲阳¹, 郭晓瑞¹, 宋莹¹, 徐明远^{2,3*}, 张晶³, 唐中华¹, 倪红伟²

(1. 东北林业大学 化学化工与资源利用学院, 哈尔滨 150040;

2. 黑龙江省林业科学院, 哈尔滨 150040;

3. 黑龙江中医药大学 临床医学院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:研究不同发育阶段的刺五加果实中初生代谢产物及酚类次生代谢产物的变化规律,为刺五加果实资源的合理利用提供理论基础。方法:基于气相色谱与质谱联用(GC-MS)技术与液相色谱与质谱联用(LC-MS)技术测定不同发育阶段刺五加果实中的初生代谢产物与酚类次生代谢物,利用多元统计分析的方法比较不同发育阶段刺五加果实的代谢差异。结果:利用GC-MS非靶向代谢组学技术在不同发育阶段的刺五加果实中共扫描到274个色谱峰,通过多元统计分析筛选鉴定得到24个初生差异代谢物,差异代谢物主要富集于磷酸戊糖途径、半乳糖代谢以及抗坏血酸和醛糖代谢途径。其中,磷酸戊糖途径、半乳糖代谢在转色后被激活,糖类在此时累积较多。抗坏血酸和醛糖代谢途径在转色前较为活跃,其终产物抗坏血酸在此时有较高的累积。利用超高液相色谱质谱联用技术(UPLC-MS)靶向测定了不同发育阶段果实中的28个酚类物质,其中,黄酮类主要在转色前的绿熟期累积,酚酸类主要在转色后累积。结论:不同发育阶段的刺五加果实中初生代谢物及酚类的累积显著不同。

[关键词] 刺五加果; 代谢组学; 多元统计分析; 气相色谱-质谱联用; 液相色谱-质谱联用

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)21-0163-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221216

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220718.0913.002.html>

[网络出版日期] 2022-07-18 16:09

Metabolic Changes of *Acanthopanax senticosus* Fruits During Development

SUN Feiyang¹, GUO Xiaorui¹, SONG Ying¹, XU Mingyuan^{2,3*},

ZHANG Jing³, TANG Zhonghua¹, NI Hongwei²

(1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Resource Utilization, Northeast Forestry University,

Harbin 150040, China; 2. Heilongjiang Academy of Forestry, Harbin 150040, China;

3. School of Clinical Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study the changes of primary metabolites and phenols in the fruits of *Acanthopanax senticosus* at different development stages, so as to provide a theoretical basis for the rational utilization of *A. senticosus* fruit resources. **Method:** The primary metabolites and phenols in the fruits at different development stages were determined via gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and then compared by multivariate statistical analysis. **Result:** A total of 274 chromatographic peaks were obtained by GC-MS-based non-targeted metabonomics and 24 differential metabolites were screened out by multivariate statistical analysis. The differential metabolites were

[收稿日期] 2022-02-11

[基金项目] 国家科技基础资源调查专项(2019FY100502);国家林业局林业科学技术推广项目([2019]12);黑龙江省博士后基金项目(LBH-Z20091);黑龙江省中医药科研课题项目(ZHY2022-138);黑龙江省中医药经典普及化专项课题项目(ZYW2022-059);黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2022H084)

[第一作者] 孙菲阳,在读硕士,从事药用植物资源开发与利用研究,E-mail:1911289608@qq.com

[通信作者] *徐明远,博士,在站博士后,主管药师,从事中药资源开发与利用研究,E-mail:xumingyuan2000@163.com

mainly concentrated in pentose phosphate pathway, galactose metabolism, ascorbic acid and aldose metabolism pathways. After color conversion, the pentose phosphate pathway and galactose metabolism were activated and increasing sugars were accumulated. The ascorbic acid and aldose metabolism pathways were active before color conversion, with high accumulation of the end product ascorbic acid. The ultra-high liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS) identified 28 phenols in the fruits at different development stages. Flavonoids were accumulated mainly at the green ripening stage before color conversion, and phenolic acids were accumulated mainly after color conversion. **Conclusion:** The accumulation of primary metabolites and phenols in *A. senticosus* fruits varies significantly among different development stages

[Keywords] *Acanthopanax senticosus* fruit; metabolomics; multivariate statistical analysis; gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS); liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

刺五加是来源于五加科五加属的药用植物,原产于中国的北部、东部地区,在韩国、日本和俄罗斯的远东地区也有分布,其根及根茎经干燥处理后可入药,具有益气健脾、祛除风湿、补肾安神等功效^[1]。近年来,刺五加果实中的活性成分与药用价值逐渐受到关注,紫丁香苷、异嗪皮啶、绿原酸、齐墩果酸和熊果酸等药用活性成分的含量在果实中显著高于其传统用药部位根和茎^[2-10]。药理研究结果显示,刺五加果实具有保肝、抗肿瘤、抗心律失常、镇静催眠、抗疲劳、抑制肝脏脂肪积累等药理活性^[11-16]。目前,由于长期无限制地采挖,野生刺五加资源逐渐枯竭,对刺五加果实进行合理开发和利用对保护野生刺五加资源扩大药源具有重要的意义。

目前,对于不同发育阶段果实中代谢产物累积规律的研究,逐渐成为药用植物果实研究的热点。前人的研究结果显示,代谢物在不同发育阶段的药用植物果实中的累积显著不同,如陈旋勳等^[17]的研究结果显示,单宁类物质在山茱萸果实的不同发育阶段呈先增后减的变化趋势。王德富等^[18]研究结果显示,黄酮类物质花色苷主要在成熟期的黑枸杞中累积,原花青素主要在半紫半黑果期累积。初生代谢产物糖类(果糖及蔗糖)在不同发育时期的枸杞果实中的累积显著不同^[19]。但是,目前对刺五加果实的开发与利用尚处于初级阶段,主要以果糕、果酒及功能性饮料为主^[20-21],针对不同发育阶段刺五加果实次生代谢产物及初生代谢变化规律的研究仍是空白。

近年来,基于气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)以及液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)的植物代谢组学研究的发展十分迅速,已在药用植物的研究中得到了广泛的应用^[22-23]。因此,本文利用GC-MS和LC-MS技术分析不同发育阶段刺五加果实中的初生代谢产物和酚类次生代谢产物的相对含

量,分析不同发育阶段果实的代谢差异,总结了发育阶段对刺五加果实初生代谢以及次生代谢的调控机制。本文的研究结果可为更深入地研究该药用植物提供参考,同时为刺五加资源的合理利用及相关产品的高效开发提供新的思路。

1 材料

1.1 仪器 7890A-5975 C型气相色谱质谱联用仪[安捷伦科技(中国)有限公司], ACQUITY UPLC-Xevo G2-S Q Tof MS[®]液质连用仪[沃特世科技(上海)有限公司]; TGL-16型高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), BSA224S-CW型1/1万电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司], SHZ-82A型气浴恒温振荡器(常州金坛良友仪器有限公司), KQ500-DB型数控超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司,功率500 W,超声频率40 kHz), Xi-nyi-24型高通量组织研磨机(宁波新艺超声设备有限公司), DK-98-II A型电热恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司), ZLS-2型真空离心浓缩仪(湖南赫西仪器装备有限公司)。

1.2 材料 研究用果实样品采集自东北林业大学化学化工与资源利用学院人工温室,经东北林业大学化学化工与资源利用学院唐中华教授鉴定为5年生五加科植物刺五加 *Acanthopanax senticosus* 的果实。分别在刺五加果实的4个发育阶段,第一阶段为幼果期,第二阶段绿熟期,此时果实开始膨大处于绿色且较硬的状态,第三阶段半转色期,即果实刚刚开始出现色素沉着,第四阶段是果实完全变紫,即转色期。即8月25日、8月31日、9月16日、10月10日,在刺五加样地随机各采摘无病虫害大小基本一致的果实,混样重复至少3次,液氮速冻后-80℃保存。各发育阶段果实样品见图1。

实验所需对照品咖啡酸、肉桂酸、阿魏酸、儿茶酸、原儿茶酸、苯甲酸、香草酸、染料木苷、白杨素、

花旗松素、绿原酸、槲皮苷、异槲皮苷、木犀草素、染料木素、高良姜素、柚皮苷、大豆苷元、迷迭香酸、芹菜素、山柰酚、龙胆酸(中国食品药品检定研究院,批号分别为110885-200102、110786-201604、110773-201614、110877-201604、110809-201205、100419-201703、110776-201503、111709-201702、111701-201501、111816-201102、110753-201817、111538-201105、111809-201403、111520-202006、111704-201302、11701-200501、110722-201815、110780-200405、111871-201908、111901-202004、110861-201812、SH-1022);对羟基肉桂酸、芥子酸(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为20333、S30697);丁香酸、柚皮素、异甘草素、橙皮素(成都普菲德生物技术有限公司,批号分别为151020、17061301、19072401、170726);纯度均 $\geq 98\%$ 。色谱级甲酸、乙腈上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

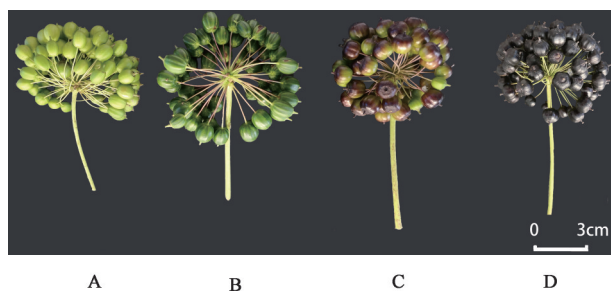


图1 不同发育阶段的刺五加果实

Fig. 1 Fruits of *Acanthopanax senticosus* at different development stages

2 方法

2.1 初生代谢产物测定的GC-MS色谱条件 初级代谢样品的制备以及具体色谱、质谱条件按照宋莹等^[24]的方法。GC-MS色谱条件:Agilent 5975C气相色谱-质谱仪以及非极性DB-5毛细管色谱柱(250 μm \times 30 m, 0.25 μm)分离后进入质谱检测。高纯氮气被用作载气,载气流速1.0 mL \cdot min⁻¹。初始柱温60 $^{\circ}\text{C}$,程序升温8 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min⁻¹, 60~125 $^{\circ}\text{C}$; 4 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min⁻¹, 125~210 $^{\circ}\text{C}$; 5 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min⁻¹, 210~270 $^{\circ}\text{C}$; 10 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min⁻¹, 270~305 $^{\circ}\text{C}$, 305 $^{\circ}\text{C}$ 维持3 min。进样口的温度260 $^{\circ}\text{C}$,电子轰击离子源(EI)温度260 $^{\circ}\text{C}$,电压-70 V。质量扫描范围 m/z 50~600,延迟5 min开始采集,采集速度为20谱/s。

2.2 酚类代谢物测定的LC-MS色谱条件 测定刺五加果实中酚类物质样品制备方法、质谱和流动相条件按照吴可心^[25]的方法。为带有VanGuard BEH C₁₈预柱(2.1 mm \times 5 mm, 1.7 μm)的Acquity UPLC

BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μm);流速0.25 mL \cdot min⁻¹;色谱柱温度40 $^{\circ}\text{C}$;进样量5 μL ;流动相0.04%甲酸-水(A),0.04%甲酸-乙腈(B)。ESI-QTOF/MS质谱条件:使用正离子模式,在 m/z 50~1 200进行扫描,锥孔电压3 kV。流动相程序洗脱0~20 min, 95%~5%A; 20~22.1 min, 5%~95%A; 22.1~28 min, 95%A。

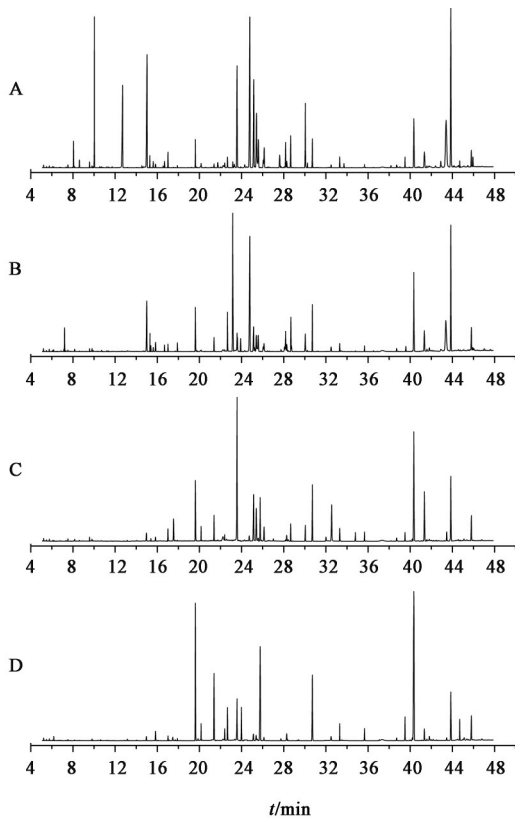
2.3 数据分析 采用XCMS软件包提取GC-MS特征峰的原始数据将预处理完毕的数据矩阵导入SIMCA-P(Version 13)软件进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘回归分析(PLS-DA)等多元统计分析,所有模型均采用了999次置换检验,避免模型出现过拟合现象,再依据变量对分组贡献得分(VIP得分) >1 和单因素方差分析显著性($P<0.05$)为差异性代谢产物的筛选标准。使用R语言软件包在NIST数据库和Wiley Registry数据库将差异初生代谢产物的保留时间、相对分子质量及碎片离子与代谢物进行匹配,将匹配度 >80 作为差异代谢物鉴定的标准,将差异代谢产物输入至MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/>)代谢通路富集。GC-MS代谢组学和UPLC-MS酚类相对含量的数据均使用Microsoft Excel 2019和SPSS 25.0软件进行统计分析,进行单因素方差分析(One-way ANOVA),使用R语言绘制热图。

3 结果与分析

3.1 不同发育阶段下刺五加果GC-MS测定结果

由图2可以看出,笔者建立的分析不同发育阶段刺五加果实样品的GC-MS方法色谱峰的基线较平稳,且色谱峰的分离度较高,不同发育阶段的色谱峰强度及数量不同。在4组果实样品中共扫描得到274个色谱峰,其中,在幼果期扫描到229个色谱峰,绿熟期扫描到207个色谱峰,半转色期中扫描到193个色谱峰,转色期中扫描到180个色谱峰。因此,该方法稳定、可靠,所得到的研究数据可进行后续统计分析和处理。

3.2 不同发育阶段果实初生代谢产物PCA模型分析结果 为直观分析不同发育阶段刺五加果实初生代谢产物的累积差异,将GC-MS扫描得到274个色谱峰面积数据输入到SIMCA-P软件中建立了非监督的PCA模型见图3。该模型参数为 $R^2X(\text{cum})=0.778$, $Q^2(\text{cum})=0.566$,两参数均 >0.5 ,说明PCA模型解释度较好,可以正确显示不同发育时期刺五加果的代谢差异。图3中可以看出4个发育时期的样本各自聚集,在第一主成分(PC1)中,幼果期、绿熟



注:A.幼果期;B.绿熟期;C.半转色期;D.转色期
图2 不同发育阶段刺五加果GC-MS总离子流色谱
Fig. 2 GC-MS chromatogram of *A. senticosus* fruit at different developmental stages

期处于PC1的左侧,半转色期、转色期在PC1的右侧;在第二主成分PC2中,幼果期、半转色期与转色期在PC2的上方,绿熟期在PC2的下方,半转色期和转色期处于同一象限。总体来看,刺五加果实初生代谢物的累积在不同生长发育时期具有显著差异,但半转色期和转色期的代谢物累积有一定的相似性。

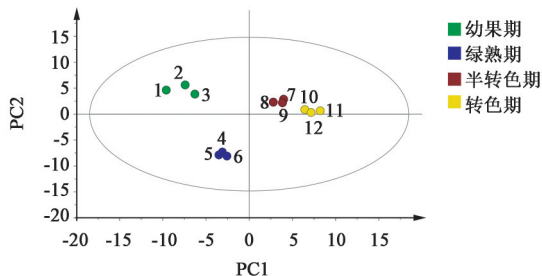
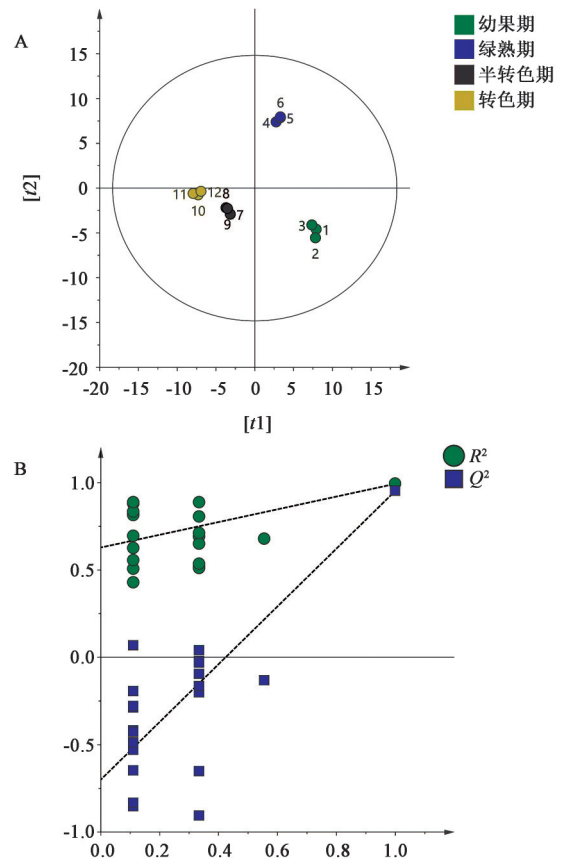


图3 不同发育阶段果实初生代谢物PCA模型得分
Fig. 3 PCA model scores of primary metabolites of fruit at different developmental stages

3.3 不同发育阶段果实初生代谢物PLS-DA分析
PCA模型分析结果显示刺五加果实生长发育的4个时期初生代谢物的累积存在明显差异,但

PCA分析是一种无监督的分析方法,其缺点是无法忽略组内误差,并消除与研究目的无关的随机误差。为更加准确地显示刺五加果实的代谢差异,寻找不同发育阶段的关键差异代谢产物,建立了有监督的PLS-DA模型进一步分析,见图4。由图4可知,PLS-DA分析结果同样显示刺五加果实初生代谢产物的累积在不同发育阶段具有显著的差异,但半转色期和转色期的代谢物累积有一定的相似性。该模型的模型参数 $R^2X(\text{cum})$ 的值为0.824, $Q^2(\text{cum})$ 的值为0.978,对PLS-DA模型进行999次置换验证,图中左侧的 R^2 和 Q^2 的实验值低于右侧的原始值,说明模型没有过拟合。综上说明本研究建立PLS-DA模型稳定、可靠,可用于进一步差异代谢物的筛选。



注:A.PLS-DA模型得分;B.置换检验结果
图4 不同发育阶段果实初生代谢物的PLS-DA模型分析
Fig. 4 PLS-DA model analysis of primary metabolites of fruit at different developmental stages

3.4 不同发育阶段果实差异代谢物的确定
基于PLS-DA分析的结果筛选得到VIP值>1的代谢物,再经过单因素方差分析筛选组间差异显著性 $P < 0.05$ 的代谢物,在NIST数据库和Wiley Registry以匹配度>80为鉴定标准,最终鉴定得到差异代谢物

24个。由表1可知,差异代谢物中包括了12种糖类物质,分别是阿拉伯呋喃糖、 α -乳糖、阿拉伯糖、果糖、半乳糖、5-磷酸核糖、GDP-*L*-半乳糖、GDP-甘露糖、核糖、蔗糖、木糖、 α -*D*-葡萄糖。7种有机酸,分

别是抗坏血酸、葡萄糖酸、核糖酸、苏糖酸、柠檬酸、草酸、戊二酸。2种氨基酸,分别是脯氨酸、天冬氨酸。3种醇类,分别是*D*-甘露醇和肌醇。其他类型化合物1种。

表1 不同发育阶段果实的差异初生代谢物

Table 1 Differential primary metabolites in fruit at different development stages

序号	t_R /min	代谢物中文名	代谢物英文名	VIP值	<i>P</i>	分类
1	28.657 9	阿拉伯呋喃糖	arabinofuranose	1.131	0.000	糖
2	43.852 0	α -乳糖	alpha-lactose	1.137	0.000	糖
3	44.700 1	阿拉伯糖	arabinose	1.021	0.014	糖
4	19.620 7	果糖	<i>D</i> -fructose	1.020	0.002	糖
5	30.709 8	半乳糖	<i>D</i> -galactose	1.033	0.000	糖
6	35.905 4	5-磷酸核糖	<i>D</i> -ribose 5-phosphate	1.071	0.000	糖
7	34.789 6	GDP- <i>L</i> -半乳糖	GDP- <i>L</i> -galactose	1.089	0.000	糖
8	25.760 2	GDP-甘露糖	GDP-mannose	1.219	0.000	糖
9	20.158 6	核糖	ribose	1.059	0.000	糖
10	40.345 6	蔗糖	sucrose	1.027	0.000	糖
11	33.313 4	木糖	<i>D</i> -xylose	1.041	0.013	糖
12	21.383 0	α - <i>D</i> -葡萄糖	alpha- <i>D</i> -glucose	1.135	0.000	糖
13	17.917 4	天冬氨酸	aspartic acid	1.110	0.000	氨基酸
14	15.615 3	脯氨酸	proline	1.042	0.000	氨基酸
15	23.986 5	甘露醇	<i>D</i> -mannitol	1.136	0.000	醇
16	30.040 3	肌醇	myo-inositol	1.032	0.000	醇
17	16.691 7	抗坏血酸	ascorbic acid	1.038	0.003	有机酸
18	28.163 6	葡萄糖酸	<i>D</i> -gluconic acid	1.114	0.000	有机酸
19	22.664 1	核糖酸	ribonic acid	1.148	0.000	有机酸
20	17.017 0	苏糖酸	tartaric acid	1.124	0.000	有机酸
21	23.566 0	柠檬酸	citric acid	1.032	0.033	有机酸
22	23.165 3	草酸	oxalic acid	1.122	0.000	有机酸
23	14.539 6	戊二酸	pentanedioic acid	1.088	0.000	有机酸
24	22.395 8	6-磷酸- <i>D</i> -葡萄糖酸盐	6-phospho- <i>D</i> -gluconate	1.086	0.000	其他

3.5 不同发育阶段果实差异初生代谢物通路分析

将差异代谢物输入MetaboAnalyst数据库进行代谢途径的富集和筛选,得到不同发育阶段刺五加果实的差异代谢通路气泡图,见图5。图中代谢途径的Impact、-lg*P*越大,差异初生代谢物与通路拟合程度越高,筛选出较好的通路有磷酸戊糖途径、半乳

糖代谢、抗坏血酸和醛糖代谢。由表2可见,拟合程度较高的途径中,差异化合物多为糖类物质,例如核糖、5-磷酸核糖、蔗糖、乳糖、半乳糖、 α -葡萄糖、GDP-甘露糖和GDP-*L*-半乳糖,有机酸类物质葡萄糖酸和抗坏血酸及其他类物质6-磷酸-*D*葡萄糖酸盐。

表2 不同发育阶段果实差异初生代谢产物所在通路

Table 2 Metabolic pathways of differential primary metabolites in fruits at different development stages

代谢路径	英文名称	差异代谢物
磷酸戊糖途径	pentose phosphate pathway	葡萄糖酸、6-磷酸- <i>D</i> 葡萄糖酸盐、核糖、5磷酸核糖
半乳糖代谢	galactose metabolism	肌醇、蔗糖、 α -乳糖、 α - <i>D</i> -葡萄糖半乳糖
抗坏血酸和醛糖代谢	ascorbate and aldarate metabolism	肌醇、GDP-甘露糖、GDP- <i>L</i> -半乳糖、抗坏血酸

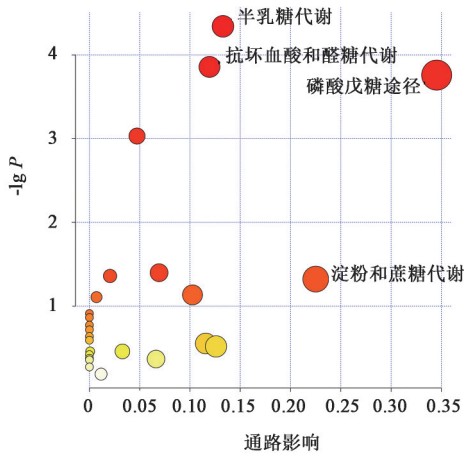


图5 不同发育阶段果实差异初生代谢物通路富集结果
Fig. 5 Pathway enrichment results of different metabolites in fruits at different developmental stages

3.6 不同发育阶段刺五加果实初生代谢途径中代谢物的分布差异 将表3中富集到代谢途径中的初生代谢产物的相对含量进行聚类分析,见图6。磷酸戊糖途径中除葡萄糖酸主要在幼果期和绿熟期累积外,6-磷酸-D-葡萄糖酸盐、核糖及5磷酸核糖均主要在转色期和半转色期累积;半乳糖代谢中,肌醇主要在幼果期累积, α -乳糖在幼果期和绿熟期均有较高的累积,葡萄糖和半乳糖同时也在半转色期和转色期累积,而蔗糖只在转色期累积。抗坏血酸和醛糖代谢,肌醇主要在幼果期累积,抗坏血酸在幼果期和绿熟期均有较高的累积,GDP-甘露糖同时也在半转色期和转色期累积,而GDP-L-半乳糖只在转色期累积。富集到代谢通路的8种糖类物质,除了乳糖在转色前累积外,另外7种糖类主要在转色后累积。

3.7 不同时期刺五加果实中酚类次生代谢产物的分布差异 将利用UPLC-Q-TOF-MS平台测得的28种酚类次生代谢产物的相对含量进行聚类分析,见图7。刺五加果实中酚类次生代谢产物在不同发育阶段的分布存在一定差异。幼果期主要积累的酚类物质有5种,分别是芹菜素、山柰酚、龙胆酸、对羟基肉桂酸、阿魏酸。绿熟期主要积累的酚类物质有11种,分别是槲皮苷、绿原酸、迷迭香酸、橙皮素、柚皮素、染料木素、异甘草素、高良姜素、木犀草素、柚皮苷和异槲皮苷。半转色期主要积累的酚类物质有8种,分别是香草酸、丁香酸、苯甲酸、芥子酸、白杨素、花旗松素、染料木苷、大豆苷元。转色期主要积累的酚类物质有4种,分别是咖啡酸、儿茶酸、原儿茶酸、肉桂酸。

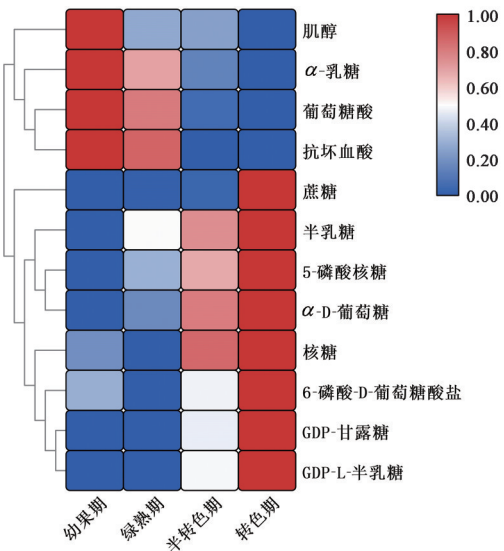


图6 不同发育阶段果实初生代谢途径中差异代谢产物的聚类分析
Fig. 6 Cluster analysis of differential metabolites in primary metabolic pathways of fruits at different developmental stages

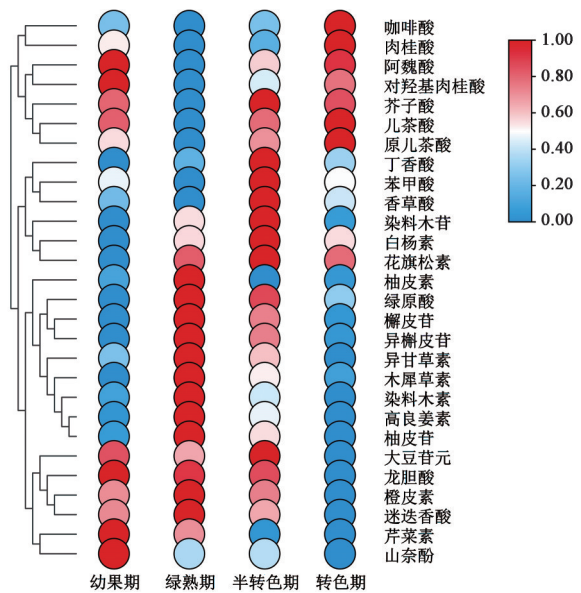


图7 不同发育阶段刺五加果实酚类次生代谢物的聚类分析
Fig. 7 Cluster analysis of phenolics in *A. senticosus* fruits at different developmental stages

4 讨论

本研究利用GC-MS技术在不同发育阶段的刺五加果实中扫描得到274个色谱峰,其中,在幼果期扫描到229个色谱峰,绿熟期扫描到207个色谱峰,半转色期中扫描到193个色谱峰,转色期中扫描到180个色谱峰。从色谱峰的数量上看刺五加果实中的初级代谢产物的累积是显著不同的,这与刘淑楨等^[26]对不同发育阶段蜜柑果实初生代谢产物的影响规律相似。PCA和PLS-DA等多元统计分析的结果也进一步验证了上述结果,本研究还发现初生代

代谢产物的累积在半转色期和转色期的果实中较为相似,表明果实在转色后初生代谢产物的累积较为稳定,但与转色前果实差异较大,其机制需要进一步研究和探讨。

将不同发育阶段刺五加果实间的24种差异初生代谢产物输入到MetaboAnalyst 5.0进行代谢通路富集,得到3个较为显著的代谢途径,包括磷酸戊糖途径、半乳糖代谢和抗坏血酸和醛糖代谢途径。磷酸戊糖途径和半乳糖代谢在植物遭受非生物胁迫时,可以维持细胞的氧化还原平衡,是植物抵抗低温胁迫的关键途径^[27-28]。本研究结果显示磷酸戊糖途径和半乳糖代谢途径中的糖类物质如葡萄糖,半乳糖、核糖和5磷酸核糖等代谢物的含量在半转色期后显著累积,这一现象与枸杞果实变化规律一致^[29]。该结果表明刺五加为应对果实发育期东北地区气温不断降低所导致低温胁迫,激活了磷酸戊糖途径和半乳糖代谢途径。同时,糖类累积研究结果还表明提取多糖成分时,刺五加的最佳采收时间是转色后。

抗坏血酸在植物中主要有2种生物学功能,一是作为抗氧化剂保护叶绿体免受光合作用和光呼吸过程产生的活性氧自由基导致的氧化损伤,二是直接或间接地参与植物细胞的增殖和伸长过程,促进植物的生长发育^[30]。因此,在本研究中抗坏血酸在幼果期和绿熟期显著累积的有2个原因:一方面,从幼果期到绿熟期果实细胞需要不断增殖,刺五加增加抗坏血酸的累积来促进果实的生长;另一方面,在这2个发育阶段外界光照较为充足,刺五加的光合作用较强会导致活性氧自由基产生过多对果实产生氧化损伤,刺五加为保护果实免受光合作用产生的氧化损伤而促进了抗坏血酸的生物合成。抗坏血酸在半转色期和转色期的果实中累积较少,其前体GDP-甘露糖和GDP-L-半乳糖则累积较多,其原因可能是这2个时期刺五加叶片已经枯萎,光合作用减弱产生的氧化胁迫减少,同时果实已从生长期进入到成熟期,细胞增殖减少,刺五加果实中的抗坏血酸和醛糖代谢途径被抑制。

酚类代谢物在刺五加果实中也显示出代谢特异性,黄酮类代谢物在未成熟的绿熟期中累积较多,这与梨、醋栗和蓝莓等果实成熟过程中物质变化规律一致^[31-33]。以槲皮苷、绿原酸为代表的黄酮类物质具有神经保护、抗心肌缺血、降压、改善学习记忆、抗炎及抗肿瘤以及降血糖等药理作用^[34-35]。因此,本研究的结果表明为获得更多的黄酮类药物

成分,刺五加果的最佳采收期是绿果期。11种有机酸类成分中,8种主要在果实变色后积累,使变色后的果实具有更强的抗氧化性^[36-37]。有研究表明,葡萄糖与葡萄糖酸有助于提高苯丙氨酸解氨酶的活性,促进羟基肉桂酸类衍生物生成^[38]。本研究结果显示,转色期后刺五加果实中累积了较多的糖类物质,因此,酚酸类物质累积增加的原因是成熟刺五加果实中为应对环境胁迫累积大量糖类物质引起。

5 结论

本文采用GC-MS和LC-MS技术分析了不同发育阶段刺五加果实初生代谢和酚类次生代谢产物的相对含量。研究结果显示,刺五加果实在变色前后的代谢差异显著。在果实变色前的绿熟期,黄酮类药用活性成分的累积显著较高,表明此时果实具有更强的神经保护、抗心肌缺血、降压、改善学习记忆以及抗炎活性。糖类和酚酸类在变色后特别是转色期显著累积,一方面,此时的果实可作为提取刺五加多糖和具有抗氧化活性的酚酸类代谢产物的原料;另一方面,该结果表明刺五加果实在转色期储存了大量的糖类和酚酸类防御物质是其为应对低温等环境胁迫作出的代谢调控。本研究找到了不同发育阶段刺五加果实初生代谢和酚类次生代谢产物的变化规律,分析了引起上述变化可能的机制,研究结果达到了作者的预期目的,可为刺五加资源的合理开发利用提供依据,也为进一步研究刺五加果实的药理活性提供研究基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[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] 王志睿,林敬明,张忠义. 刺五加化学成分与药理研究进展[J]. 中药材,2003,26(8):603-606.
- [3] 白雪,胡文忠,姜爱丽,等. 刺五加活性成分的研究进展[J]. 食品工业科技,2016,37(4):378-381.
- [4] 邵璟,狄留庆,谢新,等. HPLC法测定不同产地刺五加叶中绿原酸和金丝桃苷含量[J]. 中国中医药信息杂志,2009,16(10):41-43.
- [5] 张琳,刘洋,盖庆辉,等. HPLC-MS/MS法测定超声提取刺五加果实中刺五加苷B、E和异嗪皮啶的含量[J]. 上海中医药大学学报,2014,28(4):90-95.
- [6] 佟潇禹,薛蓓,刘振东,等. 刺五加果中齐墩果酸、熊果酸的提取工艺优化[J]. 生物技术,2020,30(5):481-488,510.
- [7] ZHANG P P, GUO Z F, ZHANG P H, et al. Eleutheroside B, a selective late sodium current

- inhibitor, suppresses atrial fibrillation induced by sea anemone toxin II in rabbit hearts[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(2):209-217.
- [8] 王聪,付士朋,金司阳,等. 不同产地刺五加果实中5种活性成分的含量测定及聚类分析[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(8):1982-1984.
- [9] 姚慧敏,关颖丽,朱俊义,等. UPLC法同时测定野生刺五加果和根中5种主要成分的含量[J]. *中国药房*, 2016, 27(12):1668-1671.
- [10] 张海丰,孙健,滕坤,等. HPLC法同时测定刺五加果实中齐墩果酸和熊果酸的含量[J]. *中国药物警戒*, 2010, 7(12):708-710.
- [11] 闫兆威. 刺五加果肉化学成分及其药理活性的研究[D]. 长春:吉林大学, 2011.
- [12] 佟潇禹. 刺五加果多糖的提取纯化及其体外抗肺癌活性研究[D]. 哈尔滨:黑龙江大学, 2021.
- [13] 佟丽,李吉来. 刺五加多糖研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 1999(1):87-92.
- [14] 粘成贺. 刺五加果实口服液的制备及其睡眠功能的研究[D]. 长春:长春师范大学, 2018.
- [15] 丛登立,王浩天,高笑一,等. 刺五加的抗疲劳作用[J]. *吉林大学学报:医学版*, 2010, 36(5):891-894.
- [16] SAITO T, NISHIDA M, SAITO M, et al. The fruit of *Acanthopanax senticosus* (Rupr. et Maxim.) Harms improves insulin resistance and hepatic lipid accumulation by modulation of liver adenosine monophosphate-activated protein kinase activity and lipogenic gene expression in high-fat diet-fed obese mice[J]. *Nutr Res*, 2016, 36(10):1090-1097.
- [17] 陈旋勳,张岗,高静,等. 山茱萸果实发育过程中单宁物质的分布与积累特征[J]. *西北植物学报*, 2021, 41(11):1834-1842.
- [18] 王德富,杨锋,崔丽艳,等. 栽培黑果枸杞活性成分生物合成关键基因克隆及表达分析[J]. *山西农业大学学报:自然科学版*, 2020, 40(4):27-35.
- [19] 赵建华,李浩霞,尹跃,等. 不同果色枸杞果实糖积累特征及其与蔗糖代谢酶活性的关系[J]. *西北植物学报*, 2016, 36(4):706-714.
- [20] 何文兵,徐晶,邵信儒,等. 长白山区刺五加果糕的配方及工艺研究[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(5):289-291.
- [21] 姜瑞平,徐晶,朱俊义. 刺五加果实的综合利用现状[J]. *人参研究*, 2009, 21(2):25-26.
- [22] 王斌,张腾霄,赵倩,等. 植物代谢组学在药用植物中的应用进展[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(5):28-31.
- [23] KARAHALIL B. Overview of systems biology and omics technologies [J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(37):4221-4230.
- [24] 宋莹,吴可心,邵文达,等. 刺五加和短梗五加叶片初生代谢的发育特异性调控研究[J]. *植物研究*, 2022, 42(2):268-277.
- [25] 吴可心. 刺五加叶片生理代谢对UV-B辐射的组织特异性响应[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2019.
- [26] 刘淑楨,韩静雯,云泽,等. 国庆1号温州蜜柑果实成熟过程中极性代谢物的变化[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(21):4437-4446.
- [27] 田宇. 冬小麦 TaG6PDH 和 Ta6PGDH 响应低温胁迫的生理分子机制[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2019.
- [28] 贾祥. 西藏野生垂穗披碱草对低温胁迫的抗性和适应[D]. 拉萨:西藏大学, 2021.
- [29] 冯美. 枸杞果实生长发育及化学成分积累规律的研究[D]. 银川:宁夏大学, 2005.
- [30] 巩素娟,赵智慧,刘孟军. 植物抗坏血酸的合成代谢及其生物学功能[C]//第八届全国干果生产、科研进展学术研讨会论文集. 河北保定, 2013:254-256.
- [31] 王鑫,姜喜,于军,等. '绿宝石'梨果实发育期酚类物质的动态变化及其抗氧化活性[J]. *塔里木大学学报*, 2021, 33(2):25-31.
- [32] 孙晶. 醋栗果实发育中有机酸和类黄酮含量及体外抗氧化活性的动态分析[J]. *黑龙江农业科学*, 2021(4):99-103.
- [33] 彭舒,张婷婷,李丽,等. 蓝莓果实发育过程中品质的动态变化[J]. *现代园艺*, 2021, 44(3):9-11.
- [34] 祁建宏,董芳旭. 黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. *北京联合大学学报*, 2020, 34(3):89-92.
- [35] HUANG J, ZHOU L, CHEN J, et al. Hyperoside attenuate inflammation in HT22 cells via upregulating SIRT1 to activities Wnt/ β -catenin and sonic hedgehog pathways[J]. *Neural Plast*, 2021, 2021:8706400.
- [36] 刘瑞,于章龙,孙元琳,等. 电解水对荞麦芽酚含量及抗氧化能力的影响[J]. *核农学报*, 2022, 36(3):635-642.
- [37] 陈金祥. 酚酸抗氧化活性的构效关系及抗氧化机制的研究[D]. 太原:中北大学, 2020.
- [38] 邓科,孔维府,战吉宸,等. 糖诱导桃果实园片果实苯丙氨酸解氨酶活性上升和酚类物质积累的研究[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(25):162-167.

[责任编辑 顾雪竹]