

基于 LC-MS 代谢组学技术探究铅胁迫大麦苗粉代谢产物及通路分析

崔航^{1,2}, 曹冬梅^{1,2,3,4*}, 王冀菲¹, 娄雨豪¹, 杨建¹, 张东杰^{1,4,5}

(1. 黑龙江八一农垦大学食品学院, 黑龙江大庆 163319) (2. 国家杂粮工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319) (3. 黑龙江省农产品加工与质量安全重点实验室, 黑龙江大庆 163319) (4. 黑龙江省杂粮加工及质量安全工程技术研究中心, 黑龙江大庆 163319) (5. 北大荒现代农业产业技术省级培育协同创新中心, 黑龙江大庆 163319)

摘要: 通过模拟 Pb 污染区大麦种植, 本研究采用液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 代谢组学技术, 结合主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA)、层次聚类分析等多元统计学分析, 探究 Pb 在大麦中的代谢通路及对大麦代谢物的动态变化影响。实验选用成苗期大麦 (CMQ) 和经 Pb 胁迫大麦 (CMQPb) 两组样本。共定性出 84 个代谢物, 通过对显著代谢物进行筛选 ($p < 0.05$) 共得到 60 个差异代谢物, 发现 Pb 胁迫对大麦中有机酸及其衍生物、多酚类物质、多胺类物质、脂类及类脂质分子含量影响较大, 说明 Pb 胁迫会对大麦苗营养成分产生一定影响。通过 KEGG 代谢通路分析, 发现 Pb 胁迫对 β -丙氨酸代谢影响最大。 β -丙氨酸、二氢尿嘧啶、泛酸和尿嘧啶 4 个差异代谢物对大麦受 Pb 胁迫后的差异代谢分析具有重要意义。

关键词: 大麦苗粉; 铅胁迫; 液相色谱-质谱联用; 代谢组学; 通路分析

文章编号: 1673-9078(2022)11-111-121

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.11.1343

Metabolites and Pathway Analysis of Barley Seedling Powder under Lead Stress Based on LC-MS Metabolomics

CUI Hang^{1,2}, CAO Dongmei^{1,2,3,4*}, WANG Jifei¹, LOU Yuhao¹, YANG Jian¹, ZHANG Dongjie^{1,4,5}

(1. College of Food Science, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, China)

(2. Chinese National Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

(3. Key Laboratory of Agro-products Processing and Quality Safety of Heilongjiang Province, Daqing 163319, China)

(4. Heilongjiang Engineering Research Center for Coarse Cereals Processing and Quality Safety, Daqing 163319, China)

(5. Heilongjiang Province Cultivating Collaborative Innovation Center for the Beidaha, Daqing 163319, China)

Abstract: By simulating barley cultivation in Pb-contaminated area, this study used liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) metabolomics technology, combined with multivariate statistical analyses such as principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA), and hierarchical clustering analysis to explore the metabolic pathway of Pb in barley and its influence on the dynamic changes of barley metabolites. Two groups of samples of barley at seedling stage (CMQ) and Pb-stressed CMQ (CMQPb) were selected in the experiment. A total of 84 metabolites were identified, and 60 differential metabolites were obtained by screening the significant metabolites ($p < 0.05$). It was found that Pb stress had a great influence on the contents of organic acids and their derivatives, polyphenols, polyamines, lipids and lipid-like molecules in barley. These results indicate that Pb stress had a certain impact on the nutritional components of

引文格式:

崔航, 曹冬梅, 王冀菲, 等. 基于 LC-MS 代谢组学技术探究铅胁迫大麦苗粉代谢产物及通路分析[J]. 现代食品科技, 2022, 38(11): 111-121

CUI Hang, CAO Dongmei, WANG Jifei, et al. Metabolites and pathway analysis of barley seedling powder under lead stress based on LC-MS metabolomics [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(11): 111-121

收稿日期: 2021-11-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFE0206300); 杂粮及制品安全风险评估及标准体系建设项目 (2018YFE0206300-10); 黑龙江省优势特色学科资助项目 (黑教联[2018]4号); 黑龙江八一农垦大学研究生创新科研资助项目 (YJSCXZ2021-Y77)

作者简介: 崔航(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品安全, E-mail: cuihang0827@163.com

通讯作者: 曹冬梅(1969-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 农产品加工与质量安全, E-mail: caodong3018@sina.com

barley seedlings. Through the analysis of KEGG metabolic pathway, it was found that Pb stress had the greatest impact on β -alanine metabolism. The four differential metabolites of β -alanine, dihydrouracil, pantothenic acid and uracil are of great significance for the differential metabolic analysis of barley under Pb stress.

Key words: barley seedling powder; lead stress; liquid chromatography-mass spectrometry; metabolomics; pathway analysis

大麦不仅营养成分丰富,也是制作啤酒的主要原料^[1]。有研究表明,大麦营养含量最高的阶段是成长到幼苗期的大麦。将大麦幼苗加工成麦苗粉后进行冲服,其中含有的矿物质、蛋白质以及人体所需各种微量元素较为丰富,长期饮用大麦幼苗粉(青汁)可以改善酸性体质,提高机体抵抗力、免疫力和新陈代谢力^[2];同时具有抗菌,镇痛和抗氧化的作用。大麦还具有“三高两低”的特点^[3],制作成大麦苗饮后,具有良好的保健功效。现在研究发现大麦苗还具有抗癌的作用。我国作为发展中大国,人类活动向大气释放的有害气体导致大气沉降、工业活动产生的工业废水和日常生活中生污排放,在进行农业活动中使用的一些农用物资,诸如农药、化肥里含有的重金属成分以及农业地膜的长期不合理使用,均会导致土壤铅等重金属含量超标^[4]。

代谢组学(Metabolomics)是考察生物细胞、组织、器官或者生物体在不同状态下代谢物种类、数量及其小分子物质变化规律的科学^[5]。植物代谢组学指当植物受到外界干扰或刺激后,通过代谢组学技术对其产生的代谢物进行非靶向性或靶向定性定量分析,以此探究植物代谢网络以及相关基因功能的科学技术^[6]。目前,广泛应用于代谢组学分析的技术有¹H,¹³C-NMR技术、GC-MS技术、LC-MS技术、CE-MS技术以及DIMS技术等,其中由于LC-MS具有较高的灵敏度和分辨率,较宽的动态范围,适合通过非靶向技术手段对标本中未知代谢物进行探索研究,被广泛应用于代谢组学研究中^[7,8]。近年来代谢组学在植物研究中也获得了极大地进展,在农作物营养成分及质量评价等几个方面的均有着极大的研究进展^[9]。本研究预通过分析Pb胁迫下大麦苗粉中代谢物的变化,并找出其中的标志性代谢物,从而推导Pb胁迫的代谢机理,并从食品安全的角度出发,对大麦产地的Pb污染防治有重要指导性意义。本研究将对大麦食品安全及大麦农业产量提供一定的理论依据和数据基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与设备

色谱级甲醇、乙腈、乙酸铵、氨水, CNM Technologies 试剂有限公司;硝酸铅, 郑州中天泓达化工科技有限公司;超纯水; Vanquish 超高效液相、

Q Exactive HFX 高分辨率质谱、Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μ m)液相色谱柱、 Heraeus Frescol17 离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; FOSS-KN295 组织研磨仪, 丹麦福斯仪器公司。

1.2 LC-MS 检测

本实验使用 Vanquish (Thermo Fisher Scientific) 超高效液相色谱仪,通过 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μ m)液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相,含 5 mmol/L 乙酸铵和 5 mmol/L 乙酸, B 相为乙腈。样品盘温度: 4 $^{\circ}$ C, 进样体积: 3 μ L。

Thermo Q Exactive HFX 质谱仪能够在控制软件(Xcalibur, 版本: 4.0.27, Thermo)控制下进行一级、二级质谱数据采集。详细参数如下:鞘气流速: 30 Arb, 辅助气流速: 10 Arb, 毛细管温度: 350 $^{\circ}$ C, Full MS 分辨率: 60 000, MS/MS 分辨率: 7 500, 碰撞能量: 10/30/60 (在 NCE 模式下), 喷涂电压: 4.0 kV (正)或-3.8 kV (负)。

1.3 大麦标准萌发实验

选取一定量籽粒饱满的优质 CK15 大麦,购自黑龙江省佳木斯农科院;使用去离子水将种子漂洗 4~6 次,再经体积分数 30%过氧化氢溶液消毒 10 min 后用去离子水反复冲洗 4~6 遍,充分晾干后备用。使用从前期萌发实验中确定的 Pb 浓度(1 600 mg/kg, 以土壤质量计)进行土壤拌种,将硝酸铅与土壤混合均匀后开始种植大麦。先取出适量均匀拌铅的土壤,根据盆内土量用适量去离子水将土充分湿润,再把种子撒在湿润土壤表面,种子之间保留 1~3 cm 间隙,最后将事先取出的土壤均匀覆盖在种子表面,完成种植。每 4 盆为 1 个处理,每个处理重复 3 次,盆栽置于室温中明暗交替培养至 10~15 d,大麦幼苗高度生长至 10~20 cm 时取样备用。同时做无铅胁迫对照组。

1.4 大麦苗粉制备

将取样后的大麦幼苗使用去离子水清洗干净,放在室温中通风干燥 24 h 后放入超低温冰箱中冷冻 12 h,用冻干机冷冻干燥 48 h,经高速粉碎机粉碎后备用。

1.5 样品处理

取样后将样品使用去离子水反复冲洗至无土壤残留,经液氮研磨后称取 20 mg 样品,加入 1 000 μL 提取液[甲醇:水=3:1 (V/V)];于 50 Hz 声波下研磨 5 min,冰浴超声 6~7 min (以上操作步骤重复进行三次);于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下静置 1 h;将样品 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 12 000 r/min 离心 15 min;使用移液枪吸取静置后上清液于进样瓶中上机检测,剩余样品分别吸取等量上清液混合成质控样品(QC)上机检测。LC-MS 上机 A 相为水相, B 相为乙腈(纯度 99.99%)。进样温度 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 样品体积 3 μL 。在 Thermo Q Exactive HFX 质谱仪控制下进行多级数据采集。

1.6 数据处理

原始数据使用 R 软件包进行峰识别、峰提取、峰对齐等处理^[10],先通过 PCA 对所有样本点数据分布情况进行概况预览,然后采用 OPLS-DA 对数据进行建模分析,根据 t 检验的 p 值 <0.05 ,同时 VIP 值 >1 ,进行差异性代谢物的筛选。筛选出的代谢物通过 Biotree DB (V2.1) 自建二级质谱数据库和 HMDB 人类代谢组数据库联合筛选匹配后定性, Cutoff 值设为 0.3;再将筛选出的差异代谢物进行 KEGG 注释和通路分析,通

过富集分析和拓扑分析检索出差异代谢物映射的关键代谢通路^[11]。

2 结果与分析

2.1 代谢物定性结果

由表 1 可知,成苗期大麦共定性出脂质和类脂质代谢物、多酚类代谢物、多胺类代谢物、有机杂环代谢物、有机酸及其衍生物、有机氧代谢物、苯丙烷和聚酮化合物、苯甲酸酯类代谢物、核苷及核苷酸类似物及少量有机氮代谢物、生物碱及其衍生物等共 84 个代谢物;其中脂质和类脂质、多酚类、多胺类、有机酸及其衍生物的含量发生了明显的变化。由于大麦在生长的过程中由于不断地长出新的叶片,所需能量增加、酶活增强^[12,13],从而导致脂类物质,有机酸、蛋白质的含量发生变化^[14,15]。有研究表明,多酚类代谢物、有机酸等是植物生长过程中主要发生变化的物质^[14],而多酚类代谢物的变化会导致大麦幼苗抗氧化能力也发生改变,机体食用后会影响其自由基清除能力;大麦中存在的多胺类代谢物是农作物中普遍存在的,多胺类代谢物作为植物细胞分裂和生长发育必需的物质^[16],在大麦受到非生物胁迫时能发挥重要作用^[17]。

表 1 代谢物定性结果

Table 1 Qualitative results of metabolites

序号	代谢物名称	保留时间/s	核质比	VIP	p -value	倍数变化	LOG ₂ 倍数变化
1	2-吡咯烷酮	14	86	0.07	0.978 680 806	0.99	-0.01
2	赖氨酸	40	147	0.99	0.017 713 009	0.84	-0.25
3	L-丝氨酸	42	106	1.31	6.940 84E-05	0.66	-0.60
4	L-苏氨酸	43	120	1.44	1.319 11E-08	0.64	-0.65
5	L-天门冬酰胺	43	133	1.44	3.578 5E-09	0.67	-0.58
6	D-谷氨酰胺	43	147	1.22	0.000 882 882	0.85	-0.24
7	甜菜碱	45	118	1.31	8.823 79E-05	0.81	-0.30
8	11-甲基黄连醇	45	379	1.23	5.004 91E-10	9.90	3.31
9	胡芦巴碱	46	138	1.18	0.000 854 792	1.21	0.27
10	未知物 543	47	543	1.34	1.399 64E-05	1.51	0.60
11	胞嘧啶	48	112	1.45	1.222 84E-06	0.34	-1.55
12	鸟嘌呤	49	152	1.40	0.000 896 401	0.31	-1.68
13	腐胺	59	89	1.06	0.016 909 338	1.34	0.42
14	1-吡咯啉	78	70	0.80	0.061 506 175	0.84	-0.26
15	腺嘌呤	82	86	1.38	5.067 83E-06	0.64	-0.63
16	吡咯烷	83	72	0.54	0.219 017124	0.94	-0.09
17	L-异亮氨酸	85	132	1.36	9.157 81E-07	0.56	-0.84
18	对氨基苯甲酸	88	138	0.48	0.319 563 06	1.20	0.26
19	N6-甲基腺苷	109	282	1.46	8.273 89E-08	0.44	-1.17
20	未知物 298	123	298	0.72	0.099 713 813	0.81	-0.30

续表 1

序号	代谢物名称	保留时间/s	核质比	VIP	<i>p</i> -value	倍数变化	LOG ₂ 倍数变化
21	胆碱	171	104	1.11	0.004 437 516	0.85	-0.23
22	烟酰胺	184	123	1.35	2.669 4E-05	0.75	-0.41
23	酵母膏	184	275	0.77	0.105 625 194	0.78	-0.35
24	2,3-丁二醇	186	73	1.08	0.007 231 874	0.79	-0.35
25	羟基嘌呤	187	137	1.04	0.007 002 899	0.62	-0.68
26	鸟嘌呤	189	284	1.46	5.491 92E-12	0.39	-1.35
27	6-甲基喹啉	192	144	1.31	7.476 35E-05	0.66	-0.60
28	苯丙氨酸	192	166	1.43	9.470 63E-08	0.64	-0.64
29	N-甲基酪胺	194	152	1.28	0.002 445 321	1.18	0.24
30	大麦芽碱	202	166	1.39	2.676 15E-06	1.34	0.42
31	新菊芋素	202	446	1.39	6.253 42E-07	0.63	-0.67
32	2-吡啶酮	204	100	0.82	0.053 297 322	0.89	-0.17
33	吡啶	209	80	1.37	1.562 23E-05	0.68	-0.56
34	腺苷酸	211	268	1.42	2.860 66E-07	0.62	-0.69
35	脱氧腺苷	216	252	1.43	1.233 77E-07	0.65	-0.63
36	二甲基鸟苷	221	312	1.46	1.065 04E-12	0.44	-1.19
37	咪唑	225	118	1.21	0.000 953 625	0.86	-0.22
38	2'-O-甲基腺苷	226	282	1.45	3.719 93E-09	0.36	-1.46
39	DL-丙二醇二苯甲酸酯	233	285	1.30	0.000 285 242	0.51	-0.99
40	雪腐镰刀菌烯醇	233	335	0.34	0.490 420 52	0.94	-0.10
41	苯胺	234	94	1.44	3.562 95E-09	0.58	-0.78
42	4-乙酰基-2-甲基吡啶	234	136	1.44	9.956 07E-09	0.54	-0.89
43	蜀黍苷	237	334	1.38	5.307 1E-06	0.69	-0.54
44	1H-咪唑-3-甲醛	245	146	1.45	1.293 63E-05	0.32	-1.66
45	未知物 377	249	377	1.21	0.006 591 816	0.29	-1.80
46	茴香武 VII	254	349	0.47	0.302 944 169	0.95	-0.07
47	银杏内酯	266	425	0.94	0.018 113 282	1.48	0.57
48	大豆黄酮	271	255	1.45	7.664 73E-05	11.07	3.47
49	咪唑-3-羧酸	281	162	1.28	0.000 224 445	0.81	-0.30
50	瘤胃苷	291	423	1.44	8.400 07E-06	0.48	-1.07
51	金雀异黄素	292	271	1.40	9.507 51E-12	11.17	3.48
52	山奈酚	292	287	1.24	5.087 1E-10	17.94	4.17
53	磷酸	299	99	0.22	0.666 765 008	1.02	0.03
54	苯乙烯苷	335	405	1.14	0.001 487 785	0.70	-0.52
55	孢子三醇	340	367	0.75	0.087 861 637	1.19	0.26
56	苜蓿龙胆苷	346	433	1.12	0.003 858 732	0.79	-0.35
57	未知物 795	352	795	1.42	4.949 06E-05	0.32	-1.65
58	栀子甙酸	355	375	0.92	0.026 055 287	0.86	-0.22
59	类萹草酮	358	349	1.05	0.018 930 299	1.30	0.37
60	γ -谷氨酰苏氨酸	363	249	1.25	0.000 345 139	0.85	-0.24
61	二磷酸盐	367	345	1.40	5.251 72E-07	0.72	-0.47
62	生长素 I2	387	353	1.36	2.127 11E-05	0.73	-0.46
63	生长素 E2	387	375	0.39	0.346 413468	0.87	-0.21

续表 1

序号	代谢物名称	保留时间/s	核质比	VIP	p-value	倍数变化	LOG_倍数变化
64	2-O-乙酰熊果苷	394	315	1.43	2.795 05E-09	0.59	-0.77
65	木犀草苷	402	329	1.38	2.421 72E-06	0.72	-0.48
66	单葡萄糖醛酸甘草次酸	409	647	1.41	4.774 64E-07	0.59	-0.75
67	2-甘油酯	413	427	0.66	0.170 595 017	1.22	0.28
68	无水喹啉	420	409	1.45	3.376 24E-09	0.45	-1.15
69	油酰胺	475	282	0.28	0.605 841 583	0.94	-0.09
70	9,10-DHOME	477	337	1.25	0.000 316 373	0.79	-0.33
71	7,18-二羟基考烯内酯	485	333	0.84	0.047 308 905	0.88	-0.19
72	未知物 437	489	437	0.09	0.877 994 648	0.98	-0.03
73	月桂酰二乙醇酰胺	492	288	1.31	0.000 105 642	0.88	-0.19
74	款冬酮	524	391	0.68	0.117 016 39	0.89	-0.17
75	咪喃甲状腺素	548	317	1.26	0.000 268 102	0.66	-0.61
76	甘油-3-磷酸	554	409	0.82	0.001 611 36	1.84	0.88
77	未知物 361	562	361	1.02	0.028 810 157	0.57	-0.81
78	15-KETE	575	341	1.27	0.000 137 438	1.45	0.53
79	雄烯二酮	592	287	1.41	0.000 139 226	0.60	-0.74
80	乙醇酰胺	616	376	0.75	0.103 990 389	1.23	0.30
81	D-吡啶酸	618	130	0.85	0.033 944 335	0.88	-0.18
82	1-甲酰新叶灵	621	357	0.61	0.174 109 71	1.30	0.37
83	二氢尿嘧啶	641	115	1.10	0.005 454 107	0.66	-0.59
84	2-丙基吡啶	793	128	1.02	0.012 483 392	0.86	-0.21

2.2 主成分分析 (PCA)

图 1 为 CMQ-CMQPb 组主成分分析得分图, 拟合后方程 $R^2X=0.662>0.5$, 说明此方程拟合后稳定性较好。由图可知, 样本点均处于 95%置信区间内, 经 Pb 胁迫后与对照组相比, 两组样本组间区分效果十分显著, 无任何重叠现象。同组样本内存在部分重叠的现象, 推断是由于品种相同的大麦内部代谢物具有相似性造成的^[18]。

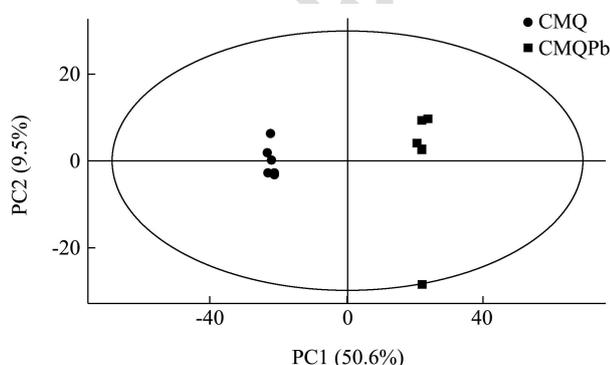


图 1 CMQ-CMQPb 组 PCA 得分图

Fig.1 PCA score chart of CMQ-CMQPb group

2.3 正交偏最小二乘-判别检验 (OPLS-DA)

PCA (主成分分析), 多用于考察样本之间相关性, 而对数据进行进一步精准分析还需要应用 OPLS-DA (正交偏最小二乘法), 这种数据分析方法可以通过正交化筛选数据信息中与类别信息无关的数据, 排除与分类无关的自变量, 从而更加精准的筛选出各类样本的特征变量^[19]。VIP 值也叫变量投影重要度, 是变量信息筛选过程中的一个重要评价指标, 能较好反映出 OPLS-DA 模型对各个化合物的评分。一般认为, 当 $VIP>1$ 时, 则表明该变量对于模型中类别的分类有着较为重要的意义^[20]。

由图 2 可知, 通过本次 OPLS-DA 判别分析共得到两个主成分, $R^2X=0.526$, $R^2Y=1$, $Q^2=0.982$; R^2Y 、 Q^2 两者均大于 0.5 说明模型可靠性较好。由图 2 可知, 两组样本分列于置信区间的两侧且样本间区分明显, 两组样本全部处于 95%置信区间内, 稍有部分重叠; 从分布形态上看, CMQ 组样本点离散程度要大于 CMQPb 组样本点。两组样本点区分显著, 但也各自存在组内聚集区, 因使用同一品种大麦, 所以内部成分

相差不大；组间不存在聚集区，可以看出 Pb 胁迫对大麦内部成分影响较大。

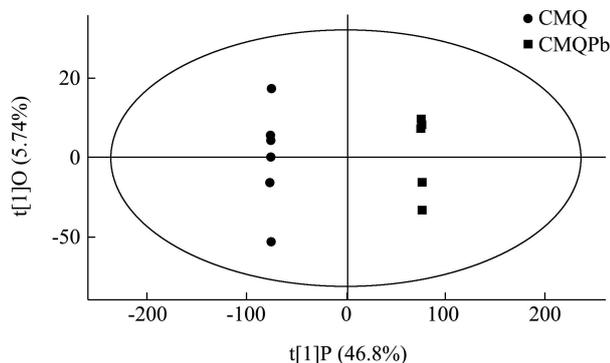


图2 CMQ-CMQPb 组 OPLS-DA 判别得分图

Fig.2 OPLS-DA discriminant score chart of CMQ-CMQPb group

2.4 正交偏最小二乘-判别置换检验

置换检验通过随机改变分类变量 Y 的排列顺序，多次（次数 $n=200$ ）建立对应的 OPLS-DA 模型以获取随机模型的 R^2 和 Q^2 值^[21]。

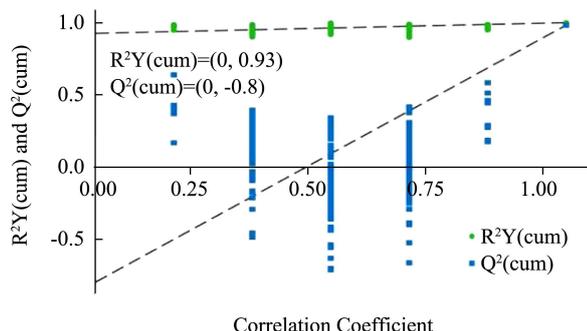


图3 CMQ-CMQPb 组 OPLS-DA 置换检验

Fig.3 OPLS-DA permutation test in CMQ-CMQPb group

图3为CMQ对CMQPb组OPLS-DA置换检验，原模型 $R^2Y=1$ ， $Q^2=0.982$ 大于 0.5 且接近于 1，证明原模型可以较好解释两组样本之间的差异^[22]。置换检验随机模型的 Q^2 值均小于原模型的 Q^2 值；同时随着置换 Y 变量比例增大，随机模型的 Q^2 逐渐下降。同时采用 200 次响应的置换检验，建立对应的 OPLS-DA 模型以随机获取模型的 R^2 和 Q^2 值，从而有效避免检验模型存在过拟合现象。说明原模型具有良好的稳健性，不存在过拟合现象^[23]。

2.5 差异代谢物筛选

将差异代谢物以火山图的形式进行可视化处理，筛选标准为正交偏最小二乘（OPLS-DA）模型 $VIP > 1$ 且 t 检验的 p 值 < 0.05 ，结合保留时间等条件在 Biotree

DB (V2.1) 自建二级质谱数据库中进行差异代谢物匹配，两组样本间差异代谢物定性结果如表 2 所示。

图4为差异代谢物筛选火山图，红色为含量上调的代谢物，蓝色为含量下调的代谢物，灰色为变化不显著差异代谢物。根据匹配度和 VIP (p -value) 值共筛选出高度匹配差异代谢物 60 个，如表 2。

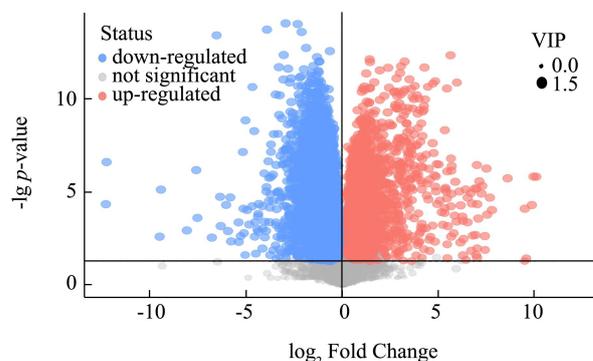


图4 CMQ-CMQPb 组差异代谢物筛选火山图

Fig.4 CMQ-CMQPb group differential metabolite screening volcano map

CMQ-CMQPb 组共筛选出了 60 个差异代谢物，多数为有机酸及其衍生物、多酚类代谢物、多胺类代谢物、脂质和类脂质分子以及少量的氧化物、有机化合物、生物碱和核苷酸等；其中 CMQ 组对比 CMQPb 组中相对含量上升的代谢物 11 个，多数为多酚类物质和多胺类物质；CMQ 组对比 CMQPb 组中相对含量下调的代谢物 49 个，多数为有机酸及其衍生物、脂质和类脂质分子、有机氧化物等。

多酚类物质是大麦中一种重要的次级代谢产物，存在其各个部位中，随着大麦的生长，多酚类物质会发生一定的动态变化；已有研究表明，大麦幼苗中多酚类的变化，食用后可直接影响其对机体的抗氧化能力。多胺类物质的上升或下降，已通过转基因研究证明，其含量的动态变化可能作为植物提高耐胁迫能力的一种策略^[24]，可以通过调节植物体内的 HMs 进行螯合或者间接的刺激增强植物抗氧化系统的防御能力、诱导胁迫相关基因的特异性表达、影响植物内源生长调节物质的含量和离子的吸收和平衡^[25]。同时外源施用腐胺和亚精胺类物质也可以显著诱导植物遭受胁迫后响应基因的表达。当 Pb 不断对植物造成胁迫时，植物根系就会分泌有机酸来与重金属螯合，形成并分泌一种新的螯合物来保护植物根系，从而对抗重金属的胁迫，从而导致有机酸含量发生动态变化；脂类物质含量变化的原因可能是由于大麦受到 Pb 胁迫后在成苗期需要能量增加，呼吸作用增强，故会分解消耗更多的脂类物质来为大麦的生长提供能量。

表2 差异代谢物定性结果

Table 2 Differential metabolite qualitative results

序号	代谢物名称	保留时间/s	核质比	VIP	p-value	倍数变化	LOG ₂ 倍数变化	含量变化
1	L-丝氨酸	42.56	106	1.31	6.940 84E-05	0.66	-0.60	—
2	L-天门冬酰胺	43.03	133	1.44	3.578 5E-09	0.67	-0.58	—
3	L-苏氨酸	43.87	120	1.44	1.319 11E-08	0.64	-0.65	—
4	D-谷氨酰胺	43.88	147	1.22	0.000 882 882	0.85	-0.24	—
5	11-甲基黄连醇	44.82	379	1.23	5.004 91E-10	9.90	3.31	+
6	甜菜碱	44.87	118	1.31	8.823 79E-05	0.81	-0.30	—
7	胡芦巴碱	45.72	138	1.18	0.000 854792	1.21	0.27	+
8	未知物 543	47.29	543	1.34	1.399 64E-05	1.51	0.60	+
9	胞嘧啶	48.20	112	1.45	1.222 84E-06	0.34	-1.55	—
10	鸟嘌呤	49.86	152	1.40	0.000 896401	0.31	-1.68	—
11	腐胺	59.46	89	1.06	0.016 909 338	1.34	0.42	+
12	六氢吡啶	81.56	86	1.38	5.067 83E-06	0.64	-0.63	—
13	L-异亮氨酸	85.01	132	1.36	9.157 81E-07	0.56	-0.84	—
14	N6 甲基腺苷	109.69	282	1.46	8.273 89E-08	0.44	-1.17	—
15	胆碱	171.49	104	1.11	0.004 437 516	0.85	-0.23	—
16	烟酰胺	184.72	123	1.35	2.669 4E-05	0.75	-0.41	—
17	2,3-丁二醇	186.46	73	1.08	0.007 231 874	0.79	-0.35	—
18	次黄嘌呤	187.05	137	1.04	0.007 002 899	0.62	-0.68	—
19	鸟嘌呤	188.67	284	1.46	5.491 92E-12	0.39	-1.35	—
20	苯丙氨酸	192.09	166	1.43	9.470 63E-08	0.64	-0.64	—
21	6-甲基喹啉	192.83	144	1.31	7.476 35E-05	0.66	-0.60	—
22	N-甲基酪胺	194.22	152	1.28	0.002 445 321	1.18	0.24	+
23	大麦芽碱	201.82	166	1.39	2.676 15E-06	1.34	0.42	+
24	未知物 446	202.09	446	1.39	6.253 42E-07	0.63	-0.67	—
25	吡啶	208.73	80	1.37	1.562 23E-05	0.68	-0.56	—
26	腺苷	211.15	268	1.42	2.860 66E-07	0.62	-0.69	—
27	脱氧腺苷	215.52	252	1.43	1.233 77E-07	0.65	-0.63	—
28	二甲基鸟苷	221.22	312	1.46	1.065 04E-12	0.44	-1.19	—
29	吡啶	225.59	118	1.21	0.000 953 625	0.86	-0.22	—
30	2'-O-甲基腺苷	226.11	282	1.45	3.719 93E-09	0.36	-1.46	—
31	DL-丙二醇二苯甲酸酯	232.93	285	1.30	0.000 285 242	0.51	-0.99	—
32	苯胺	234.19	94	1.44	3.562 95E-09	0.58	-0.78	—
33	4-乙酰基-2-甲基吡啶	234.19	136	1.44	9.956 07E-09	0.54	-0.89	—
34	蜀黍苷	236.54	334	1.38	5.307 1E-06	0.69	-0.54	—
35	吡啶-3-甲醛	245.99	146	1.45	1.293 63E-05	0.32	-1.66	—
36	未知物 377	249.49	377	1.21	0.006 591 816	0.29	-1.80	—
37	大豆黄酮	271.39	255	1.45	7.664 73E-05	11.07	3.47	+
38	吡啶-3-羧酸	281.33	162	1.28	0.000 224 445	0.81	-0.30	—
39	瘤胃苷	290.54	423	1.44	8.400 07E-06	0.48	-1.07	—
40	山奈酚	291.62	287	1.24	5.087 1E-10	17.94	4.17	+
41	染料木素	292.21	271	1.40	9.507 51E-12	11.17	3.48	+
42	苯乙烯苷	334.87	405	1.14	0.001 487 785	0.70	-0.52	—

续表 2

序号	代谢物名称	保留时间/s	核质比	VIP	p-value	倍数变化	LOG ₂ 倍数变化	含量变化
43	苜蓿基龙胆苷	345.53	433	1.12	0.003 858 732	0.79	-0.35	—
44	未知物 795	351.79	795	1.42	4.949 06E-05	0.32	-1.65	—
45	类萹草酮	358.71	349	1.05	0.018 930299	1.30	0.37	+
46	γ-谷氨酰苏氨酸	363.41	249	1.25	0.000 345 139	0.85	-0.24	—
47	磷酸氢盐	366.96	345	1.40	5.251 72E-07	0.72	-0.47	—
48	生长素 I2	387.42	353	1.36	2.127 11E-05	0.73	-0.46	—
49	2-O-乙酰熊果苷	393.68	315	1.43	2.795 05E-09	0.59	-0.77	—
50	木犀草苷	402.07	329	1.38	2.421 72E-06	0.72	-0.48	—
51	甘草次酸	409.79	647	1.41	4.774 64E-07	0.59	-0.75	—
52	无水喹啉	420.66	409	1.45	3.376 24E-09	0.45	-1.15	—
53	9,10-DHOME	477.47	337	1.25	0.000 316 373	0.79	-0.33	—
54	月桂酰二乙醇酰胺	491.74	288	1.31	0.000 105 642	0.88	-0.19	—
55	呋喃甲状腺素	548.55	317	1.26	0.000 268 102	0.66	-0.61	—
56	D5 抑制剂	562.45	361	1.02	0.028 810 157	0.57	-0.81	—
57	花生四烯酸	574.66	341	1.27	0.000 137 438	1.45	0.53	+
58	雄烯二酮	591.63	287	1.41	0.000 139 226	0.60	-0.74	—
59	二氢尿嘧啶	640.74	115	1.10	0.005 454 107	0.66	-0.59	—
60	2-丙基哌啶	793.10	128	1.02	0.012 483 392	0.86	-0.21	—

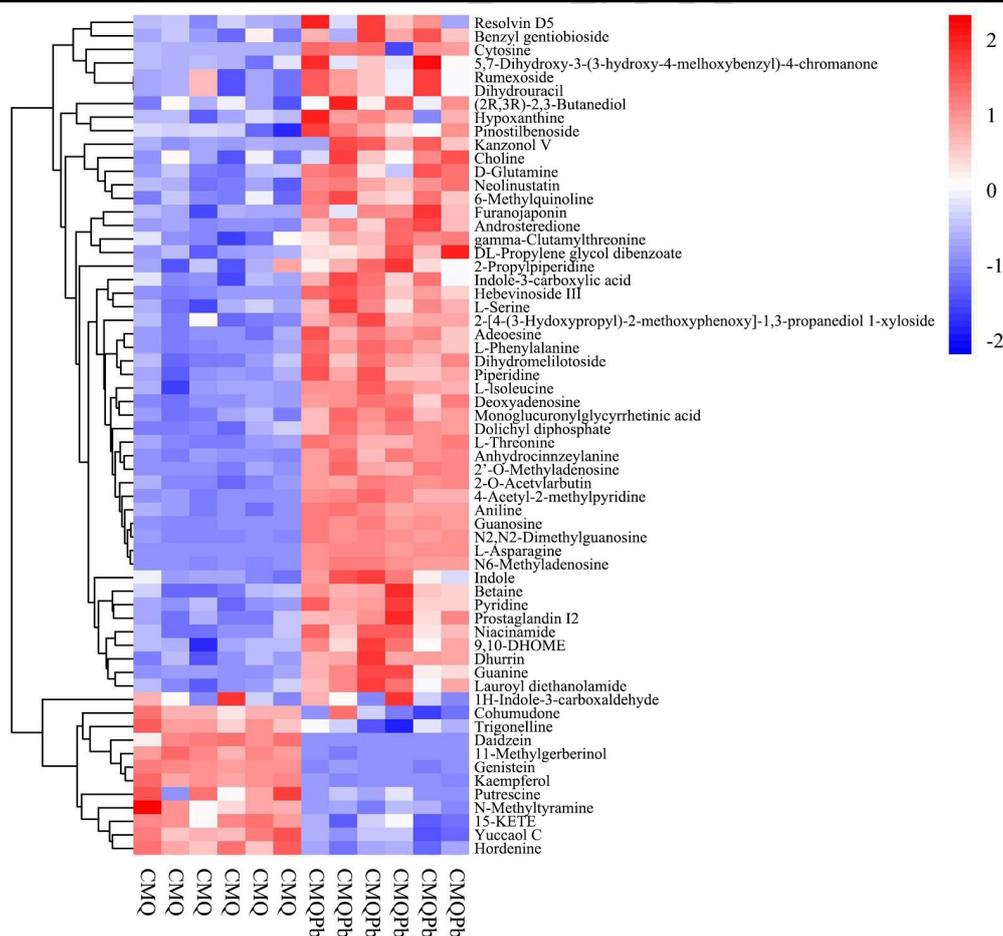


图 5 CMQ-CMQPb 组差异代谢物层次聚类热力图

Fig.5 CMQ-CMQPb group differential metabolite hierarchical clustering heat map

2.6 差异代谢物层次聚类分析

上述分析得到的差异代谢物，由于不同的代谢物可能会具有相似的生物特性或者受到同一个代谢通路的调控，最终导致差异代谢物之间特征区分不明显。层次聚类是将未明显区分的差异代谢物进行聚类，将具有相似生物特性的代谢物归到一类，以此来分析同类差异代谢物在样本间的明显变化特征。对差异代谢物的定量值进行计算欧式距离矩阵 (Euclidean Distance Matrix)，以完全连锁方法对差异代谢物进行聚类，并以热力图进行展示^[26]。结果如图 5 所示。

图 5 为 CMQ-CMQPb 组层次聚类热力图，热力图的颜色代表代谢物的丰值高低，红色为高表达区，蓝色为底表达区。红蓝区分度明显，说明聚类效果显著。图左侧 CMQ 组前 49 个差异代谢物的表达量明显低于 CMQPb 组，多数为有机酸及其衍生物、脂质和类脂质代谢物、有机氧等代谢物；其中含有 3 个数据库中检索不到的未知物，根据其核质比暂命名为未知物 377、未知物 446、未知物 795；暂对以上未知物进行定性推断，由于其在通路中的表达量于其余已知代谢物具有相似的高表达，故推断该未知物的结构也属于有机酸类代谢物、脂质类等代谢物。

从热图中可以看出经 Pb 胁迫后的大麦幼苗 (CMQPb 组) 中高表达代谢物明显高于未经 Pb 胁迫的大麦幼苗 (CMQ 组)，证明 Pb 胁迫可以增加大麦幼苗中差异代谢物的活跃度。图右侧下半部 CMQ 组后 11 个差异代谢物的表达量明显高于 CMQPb 组，多数为多酚类化合物、多胺类化合物等物质；其中含有 1 个数据库中检索不到的未知物，根据其核质比暂命名为未知物 543，由于其在代谢通路中表达量和其余已知

代谢物具有一定的高表达相似性，故推断该未知物的结构也属于多酚类、多胺类等代谢物。研究发现，大麦生长过程中根系分泌的有机酸能有效降低土壤对 Pb 的吸附并加强于土壤 Pb 的螯合，这一结论与徐卫红等^[27]的研究结果相符；通过有机酸与 Pb 螯合以此对抗 Pb 胁迫从而减轻外界非生物胁迫对大麦的毒害，并促使 Pb 从根部向地上部转移。而多酚类物质主要在于调控大麦幼苗的新陈代谢，促进其生长发育，经 Pb 胁迫后，大麦幼苗生长受到抑制，新陈代谢减慢，从而刺激多酚类物质的合成来维持大麦幼苗的正常生理活动。通过层次聚类热力图分析可以看出，Pb 胁迫会对大麦幼苗内部的不同种类代谢物具有一定的影响，而两组间筛选出的差异代谢物是大麦苗内部众多代谢物中因遭受非生物胁迫而导致含量变化显著的物质，对于探究大麦幼苗在 Pb 胁迫下的代谢物动态变化和代谢途径鉴别具有一定的参考意义，并从食品安全角度找出大麦种植区 Pb 污染防治办法。

2.7 关键代谢通路分析

KEGG 注释分析仅能匹配到差异代谢物参与的通路，并不能筛选出与本实验高度相关的关键代谢通路^[28]。因此，想要筛选出高度匹配的关键代谢通路，还需利用 Pathway 数据库对上述筛选出的差异代谢物其进行富集分析和拓扑分析^[29]，再通过 KEGG、PubChem 等权威代谢物数据库对差异代谢物进行映射。本实验共映射出 7 个高度匹配的差异代谢物，分别为： β -丙氨酸、二氢尿嘧啶、泛酸、尿嘧啶、酪氨酸、山奈酚、L-苯丙氨酸，且均为精确匹配。最后根据 $-\log(p)$ 值和 Impact 值综合分析，筛选出最为显著的 5 条代谢通路^[30]，如表 3 所示。

表 3 关键代谢通路分析表

Table 3 Analysis of key metabolic pathways

Pathway	Total	Hits	Raw p	$-\ln(p)$	Holm adjust	FDR	Impact	Hits Cpd
β -丙氨酸代谢	12	4	0.072 248	2.627 6	1	1	0.589 75	β -丙氨酸 cpd: C00099; 二氢尿嘧啶 cpd: C00429; 泛酸 cpd: C00864; 尿嘧啶 cpd: C00106
泛酸和 CoA 生物合成	16	4	0.171 55	1.762 9	1	1	0.378 38	二氢尿嘧啶 cpd: C00429; β -丙氨酸 cpd: C00099; 尿嘧啶 cpd: C00106; 泛酸 cpd: C00864
异喹啉生物碱的生物合成	6	1	0.593 36	0.521 95	1	1	0.5	酪氨酸 cpd: C00082
黄酮和黄酮生物合成	8	1	0.699 09	0.357 98	1	1	0.5	山奈酚 cpd: C05903
苯丙氨酸代谢	11	1	0.808 65	0.212 39	1	1	0.46	L-苯丙氨酸 cpd: C00079

对差异代谢物参与的代谢通路进行分析，分别为 β -丙氨酸代谢、泛酸和 CoA 生物合成、异喹啉生物碱的生物合成、黄酮和黄酮生物合成、苯丙氨酸代谢。说

明 Pb 胁迫大麦幼苗后，其内部代谢通路多数与氨基酸代谢有关，氨基酸是蛋白质的基本组成单位，也是人体重要营养素之一，在大麦幼苗受到 Pb 胁迫后，氨基酸

代谢可以参与调节离子转运、气孔关闭、氮代谢等解毒过程^[31]。这 5 条代谢通路共映射 7 个代谢物，其中 β -丙氨酸、二氢尿嘧啶、泛酸和尿嘧啶都分别参与了两条代谢通路，说明这 4 个差异代谢物对关键代谢通路的影响较大。从关键代谢通路映射出的差异代谢物可以看出，氨基酸类代谢物的变化可作为研究 Pb 胁迫后大麦幼苗内部响应的重要信号，则说明大麦幼苗在受到 Pb 胁迫后会对其中的氨基酸代谢产生一定影响。

图 6 中圆形气泡代表不同的代谢通路，气泡大小表示该条通路影响因子的大小；气泡所在纵坐标和气泡颜色表示富集分析的 p 值[取负自然对数，即 $-\ln(p)$]，气泡颜色由蓝到红，颜色越深富集程度越显著。

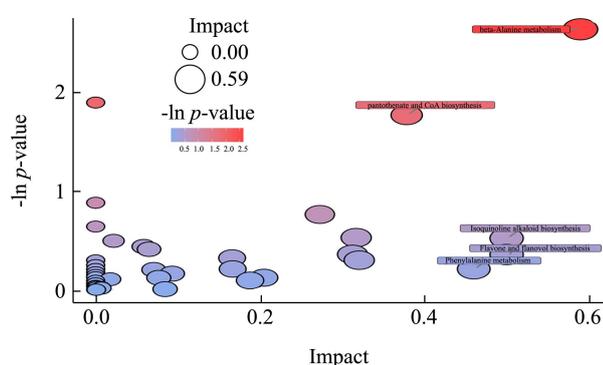


图 6 CMQ-CMQPb 组代谢通路分析气泡图

Fig.6 CMQ-CMQPb group Metabolic pathway analysis bubble chart

由图 6 可知， β -丙氨酸代谢处的气泡颜色为深红色、气泡相对较大。丙氨酸代谢的应激反应主要体现在对细胞内环境 pH 的调节，植物在生长过程中遭受到重金属胁迫后，蛋白质合成速率降低和丙氨酸转氨酶反应减缓引起的。说明 Pb 胁迫对大麦幼苗中的丙氨酸代谢影响较大。泛酸和 CoA 生物合成的颜色较浅，气泡稍小、说明此途径对 Pb 在大麦幼苗中的代谢影响也较大。CoA 在大麦萌发过程中提供 90% 的能量。主要参与糖基代谢、蛋白质代谢以及能量代谢，这与杨延辉等^[32]的研究结果相符。其次是异喹啉生物碱的生物合成，异喹啉类生物碱具有多种生物活性，存在于动植物细胞中可以抵抗生物或非生物胁迫；异喹啉类生物碱的生物合成途径是从 2 种酪氨酸衍生物的缩合开始^[33]，紧接着是一系列的反应形成反式心果碱^[34]（是大部分喹啉生物碱的中间或前体物质），生物碱和其它次生代谢物是通过 ABC 转运蛋白来转运和聚集的^[35]，其在转运蛋白上体现了重要的运输功能。最后是黄酮和黄酮生物合成和苯丙氨酸代谢；黄酮化合物是植物的次生代谢物，它能使植物适应环境压力，包括生物压力和非生物压力^[36]，其在植物的根、茎、叶中都有分布。植物所处温度、光照、水分和外源胁迫都可以调控植物中

的黄酮生物合成。而苯丙氨酸解氨酶是本代谢途径中重要的酶基因启动因子，其只存在于植物和微生物中，能够应答生物和非生物胁迫。由此可见，苯丙氨酸代谢途径可以增强大麦遭受 Pb 胁迫时的耐受能力。

3 结论

本文应用大麦为实验材料进行模拟大麦种植区铅污染盆栽实验，经 Pb 胁迫生长到成苗期（三叶幼苗）后将其制成大麦苗粉，应用 LC-MS 代谢组学技术来探究大麦幼苗遭受 Pb 胁迫后的代谢机理。本实验对大麦幼苗（CMQ）和 Pb 胁迫大麦幼苗（CMQPb）样本进行检测，通过主成分分析、正交偏最小二乘法判别分析等多元统计学方法，共筛选出 60 个差异代谢物，主要为有机酸及其衍生物、多酚类和多胺类代谢物、脂质和类脂质分子和少量的氧化物、有机化合物、生物碱和核苷酸等；层次聚类热力图结果表明，CMQPb 组有 49 个差异代谢物表达量明显高于 CMQ 组，多数为有机酸及其衍生物、脂质和类脂质分子；CMQPb 组有 11 个差异代谢物表达量明显低于 CMQ 组，多数为多酚类物质和多胺类物质。证明 Pb 胁迫会导致大麦幼苗中多酚类物质、多胺类物质、有机酸及其衍生物和脂质和类脂质分子的含量发生显著变化。通过 KEGG 通路分析发现，Pb 胁迫会对大麦幼苗中氨基酸代谢有显著影响， β -丙氨酸、二氢尿嘧啶、泛酸和尿嘧啶是影响代谢通路的关键差异代谢物。本研究使用 LC-MS 代谢组学技术探究 Pb 胁迫对大麦苗粉代谢产物的影响切实可行，从食品安全的角度对大麦种植和 Pb 污染防治具有一定指导性意义。

参考文献

- [1] 卢伟,耿楠,陆宁.大麦苗粉营养成分及其制品研究进展[J].包装与食品机械,2018,36(1): 63-67
- [2] 周传林.粗粮细吃更健康[M].北京:中医古籍出版社,2007
- [3] 刘丹,尹显锋.大麦苗的开发利用概述[J].内江科技,2014,35(2):93-94
- [4] 陈世川.土壤中铅污染的危害与治理[J].广西节能,2020,4: 26-27
- [5] Nicholson J K, Lindon J C, Holmes E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data [J]. Xenobiotica, 1999, 29(11): 1181-1189
- [6] 王佳钰.重金属胁迫下植物代谢组学研究进展[J].绿色科技, 2020,1:2
- [7] Lenz E M, Wilson I D. Analytical strategies in metabonomics

- [J]. Journal of Proteome Research, 2007, 6(2): 443-458
- [8] 徐天润,刘心昱,许国旺.基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学分析方法研究进展[J].分析测试学报,2020,39(1):10-18
- [9] 靖汝楠,冯静茹,王一孝,等.植物代谢组学及其在淫羊藿药材研究中的应用[J].特产研究,2021,43(2):79-84,90
- [10] Smith C A, Want E J, O Maille G, et al. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification [J]. Anal Chem, 2006, 78(3): 779-787
- [11] 王静.基于代谢组学的藏药多血康胶囊对 HAPC 网络调控机制研究[D].成都:成都中医药大学,2017
- [12] Huang X, Cai W, Xu B. Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max L.*) and mung bean (*Vigna radiata L.*) with germination time [J]. Food Chemistry, 2014, 143(2): 268
- [13] 郑丽娜,赵莹.绿豆发芽过程中营养成分的变化[J].中国农学通报,2008,24(2):125-128
- [14] Tang D, Dong Y, Guo N, et al. Metabolomic analysis of the polyphenols in germinating mung beans (*Vigna radiata*) seeds and sprouts [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2014, 94(8): 1639-1647
- [15] Bolívar C C, Luis C Z. Impact of germination on phenolic content and antioxidant activity of 13 edible seed species [J]. Food Chemistry, 2010, 119(4): 1485-1490
- [16] Handa A K, Mattoo A K. Differential and functional interactions emphasize the multiple roles of polyamines in plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(7): 540-546
- [17] Bouche R A, Aziz A, Larher F, et al. Polyamines and environmental challenges: recent development [J]. Plant Science, 1999, 140(2): 103-123
- [18] 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
- [19] 王俊,许多宽,肖勇,等.基于化学指标的烟叶产区正交偏最小二乘判别分析[J].中国烟草科学,2017,38(1):91-96
- [20] 李俭,钟八莲,姚锋先,等.顶空气相色谱-质谱法分析3种柚子果皮精油成分[J].食品研究与开发,2020,41(24):173-180
- [21] 薛佳艺.口腔鳞状细胞癌患者的唾液代谢组学研究[D].青岛:青岛大学,2018
- [22] 夏从奕.中医高血压阴阳两虚证的代谢组学研究[D].南京:南京中医药大学,2017
- [23] 姚诗琪,莫国艳,韩林涛.基于代谢组学研究鹅掌草三萜皂苷抑制肝癌初步作用机制[J].湖北中医药大学学报,2020,22(4):5-9
- [24] Alcazar R, Marco F, Cuevas J C, et al. Involvement of polyamines in plant response to abiotic stress [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(23): 1867-1876
- [25] 曾小英,康小虎,李师翁.生长调节物质在重金属污染植物中的应用研究进展[J].环境科学与技术,2016,39(1):32-37
- [26] Kolde R. Pheatmap: pretty heatmaps [J]. R Package Version, 2012, 61
- [27] 徐卫红,黄河,王爱华,等.根系分泌物对土壤重金属活化及其机理研究进展[J].生态环境,2006,1:184-189
- [28] Xia J, Sinelnikov I V, Han B, et al. Metabo analyst 3.0 - making metabolomics more meaningful [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43(W1): W251-W7
- [29] Ogata H, Goto S, Sato K, et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 27(1): 29-34
- [30] Xu J, Zhu Y Y, Ge Q, et al. Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress [J]. New Phytologists, 2012, 196(1): 125-138
- [31] Sharma S S, Dietz K J. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(4): 711-736
- [32] 杨延辉,肖春玲.泛酸的功能和生物合成[J].生命的化学,2008,28(4):448-452
- [33] Facchini P J, De Luca V. Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants [J]. Plant, 2008, 54: 763-784
- [34] De Luca V, St-Pierre B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis [J]. Trends Plant Sci, 2000, 5: 168-173
- [35] Wink M. Plant secondary metabolites: biochemistry, function and biotechnology [J]. Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, 2014, 2: 377-392
- [36] Liu Z, Liu Y, Pu Z, et al. Regulation, evolution, and functionality of flavonoids in cereal crops [J]. Biotechnol Lett, 2013, 35(11): 1765-1780