

基于广泛靶向代谢组学技术与高通量测序技术探究 广陈皮陈化机制

胡媛¹, 吴蓓¹, 易达²,

陈鸿平¹, 杨放晴¹, 王福^{1*}, 刘友平^{1*}

¹成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137; ²南充市食品药品检验所, 南充 637000

摘要:采用广泛靶向代谢组学技术与高通量测序技术探究广陈皮共存微生物对次生代谢产物的影响规律, 为广陈皮的陈化机制提供科学依据。运用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ 色谱柱 (1.8 μm, 2.1 mm×100 mm), 流动相 0.04% 乙酸水溶液-乙腈梯度洗脱, 流速 0.4 mL/min, 选择电喷雾离子源在正、负离子模式下进行采集检测; 采用 CTAB 法对口腔拭子样品进行 DNA 提取, 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经 Qubit 和 Q-PCR 定量, 使用 HiSeq 2500 PE250 进行上机测序; 对代谢组检测出的差异代谢物和高通量测序比对出的差异微生物进行相关性分析。结果表明, 广泛靶向共鉴定出 386 种次生代谢产物, 包括酚酸类 79 种, 黄酮类 143 种, 萜类 4 种, 木脂素与香豆素 17 种, 鞣质 3 种, 生物碱 47 种, 萜类 6 种, 其他类 87 种。主成分分析 (PCA) 与热图分析 (Heatmap) 结果表明贮藏 1 年与贮藏 3 年样品次生代谢物含量存在明显差异, 可明显区分, 共筛选出 79 种差异代谢物; 高通量测序基因序列与微生物参考数据库进行比对可得到共 58 个属, 贮藏 1 年与贮藏 3 年样品微生物菌落结构相似, 但相对丰度与优势菌属不同。差异代谢物与差异微生物关联分析表明, 青霉属、曲霉属、耐干霉菌等优势真菌可显著影响广陈皮中黄酮类成分以及有香味化合物含量。广陈皮在陈化过程中优势微生物菌落结构的改变导致药材活性成分以及香气成分含量的变化可能是其陈化机制之一。

关键词: 广陈皮; 代谢组; 高通量测序; 相关性分析; 陈化机制

中图分类号: R28 文献标识码: A

Integration of high throughput sequencing and widely targeted metabolomics reveals the aging mechanism of *Pericarpium Citri Reticulatae* 'Chachiensis'

HU Yuan¹, WU Bei¹, YI Da, CHEN Hong-ping¹,

YANG Fang-qing¹, WANG Fu^{1*}, LIU You-ping^{1*}

¹ Department of Pharmacy, State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; ² Nanchong Institute for Food and Drug Control, Nanchong 637000, China

Abstract: Widely targeted metabolomics and high-throughput sequencing technologies were used to investigate

the effects of coexisting microorganisms on secondary metabolites in Pericarpium Citri Reticulatae 'Chachiensis' (PCRC), which will provide a scientific basis for the aging mechanism of PCRC. A Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈ column (1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) was used with 0.04% acetic acid-acetonitrile gradient elution as mobile phase at a flow rate of 0.4 mL/min. Electrospray ionization was selected for collection and detection in positive and negative ion modes. DNA was extracted from oral swab samples by CTAB method, and library construction kit was used for library construction. The library was quantified by Qubit and Q-PCR, and sequenced by HiSeq 2500 PE250. Correlation analysis was conducted between the differential metabolites and the differential microorganisms. The results showed that 386 kinds of secondary metabolites were identified, including 79 phenolic acids, 143 flavonoids, 4 anthraquinones, 17 lignans and coumarins, 3 tannins, 47 alkaloids, 6 terpenoids and 87 other kinds. Principal component analysis and heatmap analysis showed that the contents of secondary metabolites in the samples stored for 1 year and 3 years were significantly different. A total of 58 genera were obtained by comparing the gene sequences of high-throughput sequencing with the microbial reference database. The bacterial colonies of the samples stored for 1 year and 3 years were similar in structure, but the relative abundance was different from that of the dominant genus. The correlation analysis of differential metabolites and differential microorganisms showed that the dominant fungi, such as *Penicillium* and *Aspergillus* could significantly affect the content of flavonoids and aromatic compounds. The aging mechanisms may be closely related to the change of active components and aroma components affected by the coexisting microorganisms.

Keywords: Pericarpium Citri Reticulatae 'Chachiensis'; metabolomics; high-throughput sequencing; correlation analysis; aging mechanism

陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮，具有理气健脾，燥湿化痰的功效，为陈化中药的典型代表。陈皮之名首见于《食疗本草》，文献记载陈化时间不一。《雷公炮炙论》谓其：“年久者最妙”^[1]；《日用本草》载：“陈皮多年者更妙”等^[2]。《雷公炮炙药性解》云其：“收藏又复陈久，则多历梅夏而烈气全消，温中而无燥散之患，行气而无峻削之虞”^[3]；《药鉴》载：“陈皮须用隔年陈”；《怡堂散记》载：“(橘皮)新者气烈，须备广产，二三年者为上”。

中药陈化是指中药经适当的方法贮存后由新药变为陈药，其性能功效发生改变，从而更好地满足中医临床用药需求，历代本草皆有关于中药陈化的论述。《神农本草经》记载：“药有真伪陈新，并各有法”^[4]，说明“新”、“陈”各有其作用特点和规律，本经收录了橘皮但未提及是否陈化。《神农本草经集注》首次提出六大陈药：“凡狼毒、枳实、橘皮、半夏、麻黄、吴茱萸皆须陈久者良”^[5]。后世医家不断扩大陈药范围，《本草纲目》谓：“然大黄、木贼、荆芥、芫花、槐花之类，亦宜陈久，不独六陈也”^[6]；至清代《本草从新》：“皆以陈久者为佳，或取其烈性减，或取其火气脱也”，所载陈药近 40 味^[7]。现今中医亦强调某些中药陈用为佳。可见，中药陈化是基于临床实践的总结。但文献记载并未对陈化机制进行深入阐释。

已有中药陈化机制的研究报道较多，如：吴茱萸、蕲艾叶、麻黄、陈皮^[8-10]等中药，主

要集中在对不同陈化时间化学成分和药理作用比较方面,品质研究并不深入结论不一。本课题组借鉴烤烟^[11]、茶叶^[12]、白酒^[13]微生物的陈化与品质相关的思路,前期研究发现,陈皮在陈化过程中附着微生物的生长代谢与黄酮等活性成分的变化密切相关,认为陈皮附着优势微生物黑曲霉代谢促进黄酮类成分的增加^[14]。Liu^[15]研究了微生物代谢转化陈皮活性成分的机制,结果表明微生物参与了陈皮的陈化过程,且能够转化陈皮中化合物使其活性物质含量增加。另不同陈化时间广陈皮表面细菌和真菌多样性变化,认为陈皮陈化过程中微生物会引起药效物质基础的变化。大量研究均证实陈皮陈化过程中微生物与化学成分具有相关性,但未见基于代谢组与高通量测序联合分析整体剖析陈皮附着微生物与次生代谢产物相互作用的报道。本文首次基于 UPLC-ESI-MS/MS 广泛靶向代谢组学技术分析贮藏 1 年与贮藏 3 年广陈皮次生代谢产物,全面揭示比较组样品中次生代谢产物、共有代谢物以及差异代谢物;基于高通量测序技术,全面揭示了样品比较组样品附着微生物群落结构及其变化规律,并筛选差异微生物;对代谢组检测出的差异代谢物和高通量测序比对出的差异微生物进行相关性分析。研究结果为陈皮陈化机制深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

超高效液相色谱-质谱联用仪 (Applied Biosystems 6500 QTRAP, 美国应用生物系统公司); 色谱柱 (Waters T3 C₁₈ 1.8 μm, 2.1 mm×100 mm); FA2003 电子分析天平 (上海浦春); MM400 球磨仪 (德国莱驰); TGL-16 台式高速离心机 (湖南湘仪实验仪器有限公司); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); PTC200PCR 仪 (美国 BIO-Rad 公司); GelDox XR 凝胶成像系统 (美国 BIO-Rad 公司); DYY-8C 电泳仪 (北京六一仪器厂); BI3730XL 测序仪 (美国 Applied Bio-systems 公司)。植物 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China); 2×Taq PCR MasterMix (Tiangen Biotech Co., China)。建库试剂盒 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina 公司); QIAquick 胶回收试剂盒 (QIAGEN 公司); Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer (New England Biolabs 公司); 高效高保真酶 (New England Biolabs 公司)。乙腈 (美国 Fisher chemical, 色谱纯); 甲酸 (美国, MREDA Technology Inc); 甲醇、乙醇 (北京化工厂, 分析纯)。

1.2 实验材料

本实验所用广陈皮样品为广东新会陈皮村标准仓储陈皮,分别为贮藏 1 年与 3 年样品。实验样品均来自新会双水 (双水水库),地质为水田,树种为驳枝,树龄 8 年,采摘日期 2017 年 11 月,净选、取皮、干燥后入库,分别于 2018 年 11 月和 2020 年 11 月各取样 3 次,

共计 6 批次，并依据陈皮陈久者良原则，将贮藏 1 年的 3 批次样品列为对照样品（CK），贮藏 3 年样品列为实验样品（CP），并组成对照组 Versus 实验组比较组。所有样品抽真空无菌包装，编号，-80 °C 储藏，用于次生代谢检测与微生物高通量测序分析。

1.3 实验方法

1.3.1 样品制备

取贮藏 1 年与 3 年广陈皮干燥样品（过四号筛）100 mg，量取 1.0 mL 甲醇水溶液（70% 甲醇）溶解，超声 0.5 h，低温静置于 12 h，期间 3 次涡旋，离心并吸取上清，过滤，于进样瓶中备用。

1.3.2 色谱与质谱条件

质谱与色谱条件参考文献报道方法^[16]。液相条件主要包括：（1）色谱柱：Waters T3 C₁₈ 1.8 μm, 2.1mm×100mm；（2）流动相：A 相为超纯水（加入 0.1%的甲酸），B 相为乙腈（加入 0.1%的甲酸）；（3）洗脱梯度：0.00 min B 相比比例为 5%，9.00 min 内 B 相比比例线性增加到 95%，并维持在 95% 1 min, 10.00~11.10 min, B 相比比例降为 5%，并以 5%平衡至 14 min；（4）流速 0.35 ml/min；柱温 40°C；进样量 4 μL。质谱条件主要包括：三重四极杆（QQQ）扫描是在 AB6500 Q TRAP UPLC/MS/MS 系统上获得的，该系统配备了 ESI Turbo 离子喷雾接口，可由 Analyst 1.6.3 软件（AB Sciex）控制运行正负两种离子模式。ESI 源操作参数如下：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）/-4500 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 psi，碰撞诱导电离参数设置为高。在 QQQ 模式下分别用 10 μmol/L 聚丙二醇溶液进行仪器调谐和质量校准。QQQ 扫描使用 MRM 模式，并将碰撞气体（氮气）设置为中等。通过进一步的 DP 和 CE 优化，完成了各个 MRM 离子对的 DP 和 CE。根据每个时期内洗脱的代谢物，在每个时期监测一组特定的 MRM 离子对。

1.3.3 代谢物定性定量原理

代谢物结构解析参考了 MassBank（<http://www.massbank.jp/>）、KNAPSACk（<http://kanaya.naist.jp/KNApSACk/>）、HMDB（<http://www.hmdb.ca/>）、MoToDB（<http://www.ab.wur.nl/moto/>）、METLIN（<http://metlin.scripps.edu/index.php>）、MWDB（metware database）等质谱数据库。代谢物定量是利用三重四级杆质谱的多反应监测模式（multiple reaction monitoring, MRM）分析完成。MRM 模式中，四级杆首先筛选目标物质的前体离子（母离子），排除掉其他分子量物质对应的离子以初步排除干扰；前体离子经碰撞室诱导电离后断裂形成很多碎片离子，碎片离子再通过三重四级杆过滤选择出所需要的一个特征碎

片离子, 排除非目标离子干扰, 使定量更为精确, 重复性更好。为了比较所检测到代谢物的含量差异, 对检测到的每个代谢物的质谱峰进行校正。获得不同样本的代谢物质谱分析数据后, 对所有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^[17]。

1.3.4 陈皮附着微生物的高通量测序方法

采用口腔拭子基因组的取样方式, 使用无菌棉签在橘皮表面擦拭, 以擦拭面积计 5 cm×5 cm 用 20 根棉签, 擦拭完后用剪刀将棉签部分从其杆上剪下, 采用 CTAB 法对其基因组 DNA 进行提取, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 取适量的样品于离心管中, 使用无菌水稀释样品至 10⁻⁶ g/L。以稀释后的基因组 DNA 为模板, 根据测序区域的选择, 使用带 Barcode 的特异引物, Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶进行 PCR, 确保扩增效率和准确性。引物对应区域 ITS5-1737F 和 ITS2-2043R。PCR 反应体系 (30 μL): Phusion Master Mix (2×) 15 μL, 正反引物 (2 μmol/L) 各 1.5 μL, gDNA (1 mg/L) 10 μL, H₂O 2 μL。PCR 反应程序: 98 °C 1 min; 98 °C 10 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物使用 2%浓度的琼脂糖凝胶进行电泳检测; 根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对目的条带使用胶回收。使用 TruSeq® DNAPCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量, 文库合格后, 使用 HiSeq 2500 PE250 进行上机测序^[18]。

1.4 数据处理

根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据, 截去 barcode 和引物序列后使用 FLASH v1.2.7 对每个样品的 reads 进行拼接, 得到的拼接序列为原始 tags 数据 (raw tags), Raw tags 经过滤处理得到高质量的 Tags 数据 (clean tags)。参照 QIIME v1.7.0 对 Tags 进行质量控制, 将处理后得到的 Tags 序列通过 UCHIME algorithm 与数据库 unite database 进行比对检测嵌合体序列, 去除其中的嵌合体序列, 得到最终的有效数据 (effective tags)。利用 UPARSE v7.0.1001 软件对所有样品的全部 effective tags 进行聚类, 默认以 97%的一致性将序列聚类成 OTUs (operational taxonomic units), 同时选取 OTUs 的代表性序列, 依据其算法原则, 筛选出 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列。用 QIIME 软件中的 BLAST 方法与 Unit 数据库对 OTUs 代表序列进行物种注释分析, 并分别在各个分类水平统计各样本的群落组成。以样品中数据量最少的为标准对各样品的数据进行均一化处理, 后续的 Alpha 多样性分析是基于均一化处理后的数据。使 QIIME 软件

计算 observed-species、Chao1、Shannon、Simpson、Ace 和 goods-coverage 指数。

2 结果与分析

2.1 样品中次生代谢产物的鉴定

经过分析本文共鉴定出 386 种次生代谢产物，包括酚酸类 79 种，黄酮类 143 种，蒽醌类 4 种，木脂素与香豆素 17 种，鞣质 3 种，生物碱 47 种，萜类 6 种，其他类 87 种。代谢物含量数据采用极差法进行归一化处理，通过 R 软件 (www.r-project.org/)，对代谢物在不同样本间的积累模式进行聚类分析 (hierarchical cluster analysis, HCA)。通过聚类分析 (图 1a) 图可知，贮藏一年广陈皮样品与贮藏 3 年广陈皮样品存在明显次生代谢物差异，不同贮藏年份样品次生代谢物变化较大；贮藏 1 年样品与贮藏 3 年样品分别聚为一类，可以明显区分。从热图可以判断，广陈皮在陈化的过程中次生代谢物变化较大，贮藏 3 年广陈皮次生代谢物相对含量普遍高于贮藏 1 年样品，且相对含量较高的次生代谢物数量占优。

主成分分析方法将次生代谢物的差异通过降维处理以直观反映样本之间的代谢物差异情况。图 1b 中可以看出，主成分 PC1、PC2 与 PC3 的占比分别达到了 59.62%、13.62% 和 12.61%，累积贡献率达到了 85.85%。贮藏 1 年样品与贮藏 3 年样品分别聚为一类，可明显区分，实验结果与聚类分析一致；正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 被广泛用于代谢组数据的分析，由于其分析方法可以最大化组间差异常被用于差异代谢物的筛选。在 OPLS-DA 分析中， Q^2 是一个重要的参数，若数值大于 0.9，则可以反映该模型的可靠性与稳定性。图 1c 中可以看出，贮藏 1 年样品与贮藏 3 年样品比较组 OPLS-DA 模型中 Q^2 分别为 0.999，其数值大于 0.90，证实该模型可以用以下一步的差异代谢物分析。

2.2 样品中差异代谢产物的筛选

本文结合单变量分析的差异倍数 (fold change) 与多变量分析 OPLS-DA 模型中变量重要性投影 (variable importance in project, VIP) 数值进行样品之间的差异代谢物筛选。筛选标准为选取 $\text{fold change} \geq 2$ 或 $\text{fold change} \leq 0.5$ 和 $\text{VIP} \geq 1$ 的差异代谢物，即代谢物在组间差异为 2 倍以上或 0.5 倍以下以及 $\text{VIP} \geq 1$ ，则认为差异显著。结果表明，贮藏 1 年样品与贮藏 3 年样品比较组共计筛选出 79 种差异代谢物，从图 1d 中可以看出，上调化合物 40 种，下调化合物 39 种。为进一步了解贮藏 1 年样品与贮藏 3 年样品比较组次生代谢物含量变化差异较大物质，筛选了差异代谢物相对含量变化前二十的化合物 (见表 1)，其中相对含量上调化合物 10 种，相对含量下调化合物 10 种，如：3',4',7-三羟基黄酮、儿茶素、柠檬素、槲皮素-O-芸香苷-己糖等黄酮类化合物具有显著的药理活性，可作为广陈皮品质相关代谢物的潜在质量标志物。图 2 可直观反应出各化合物相对含量的变化趋势。

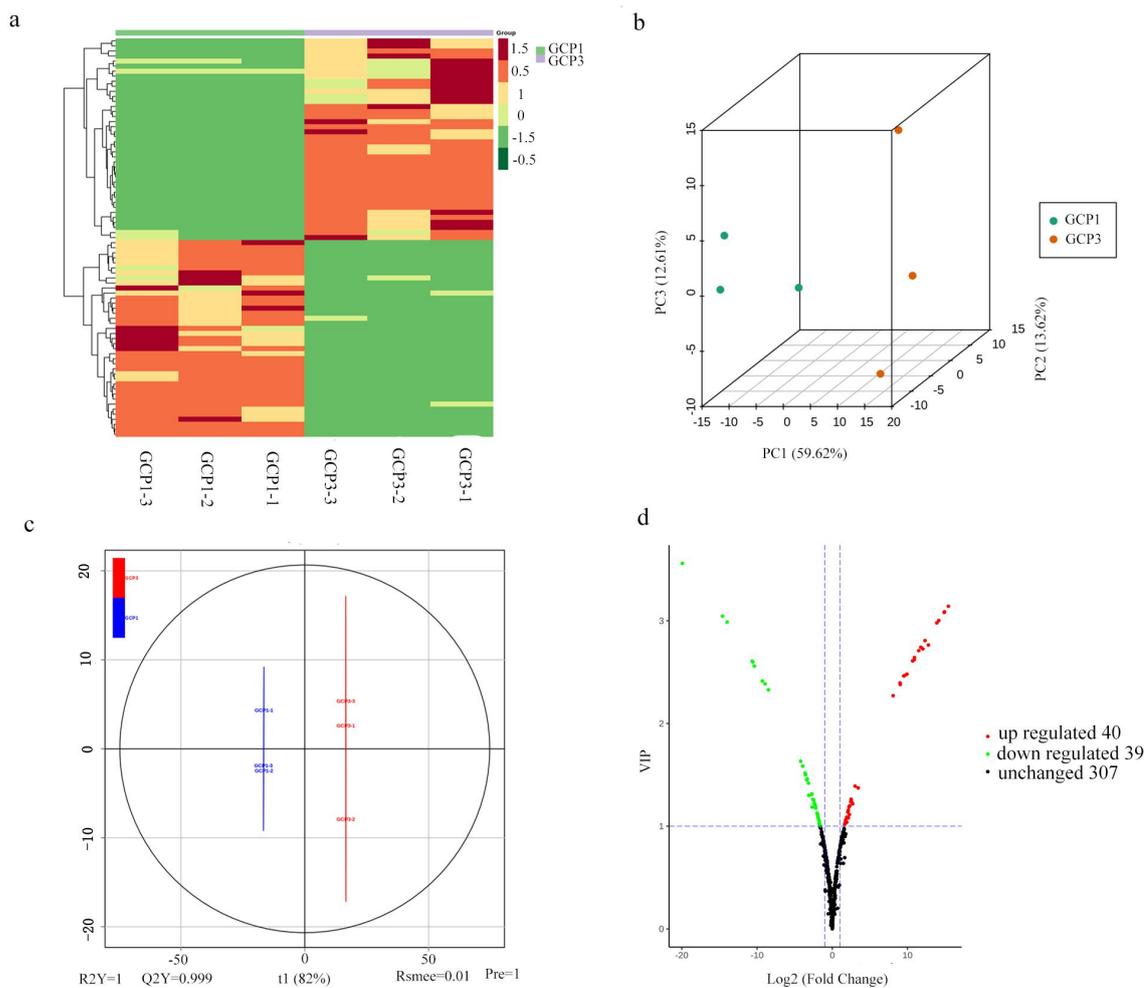


图 1 陈化 1 年与陈化 3 年广陈皮样品次生代谢物聚类热图 (a)、主成分分析三维图 (b)、正交偏最小二乘判别分析 (c) 与差异代谢物火山图 (d)

Fig. 1 Cluster heat map of secondary metabolites (a), three-dimensional map of principal component analysis (b), orthogonal partial least squares discriminant analysis (c) and volcano map of differential metabolites (d)

表 1 陈化 1 年与陈化 3 年广陈皮次生代谢物差异变化前二十的化合物

Table 1 The top twenty compounds in the variation of secondary metabolites of Pericarpium Citri Reticulatae aged for 1 year and 3 years

| 化合物 Compound | 分子式 Formula | 分类 Type | 参数 Parameter | | | 相对含量 Relative content |
|--|---|------------|--------------|-------------|-----------|--------------------------|
| | | | VIP | Fold_Change | LogFC | |
| 2-氨基乙烷磺酸 2-Aminoethanesulfonic acid | C ₂ H ₇ NO ₃ S | 其他类 | 2.41E+00 | 1.59E-03 | -9.30E+00 | 下调 |
| 3,5-二羟基-3-甲基戊酸 <i>Rs</i> -Mevalonic acid | C ₆ H ₁₂ O ₄ | 其他类 | 3.09E+00 | 3.06E+04 | 1.49E+01 | 上调 |
| 色胺 Tryptamine | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ | 生物碱 | 3.56E+00 | 1.00E-06 | -1.99E+01 | 下调 |
| 5,7-二羟基-1(3 <i>H</i>)-异苯并呋喃 -酮 5,7-Dyhydroxy-1(3 <i>H</i>)-isobenz | C ₈ H ₆ O ₄ | 其他类 | 3.14E+00 | 4.40E+04 | 1.54E+01 | 上调 |

| | | | | | | | |
|---|--|-----|----------|----------|-----------|----|--|
| ofuran-one | | | | | | | |
| 五羟色胺 | C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O | 生物碱 | 3.04E+00 | 4.05E-05 | -1.46E+01 | 下调 | |
| Serotonin | | | | | | | |
| 芥子醇 | C ₁₁ H ₁₄ O ₄ | 酚酸类 | 3.08E+00 | 2.98E+04 | 1.49E+01 | 上调 | |
| Sinapyl alcohol | | | | | | | |
| 对羟基苯甲酰酒石酸 | C ₁₁ H ₁₀ O ₈ | 酚酸类 | 2.74E+00 | 3.54E+03 | 1.18E+01 | 上调 | |
| <i>p</i> -Hydroxybenzoyltartaric acid | | | | | | | |
| 3',4',7-三羟基黄酮 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 黄酮 | 2.81E+00 | 5.10E+03 | 1.23E+01 | 上调 | |
| 3',4',7-Trihydroxyflavone | | | | | | | |
| <i>N</i> -顺式-对香豆酰酪胺 | C ₁₇ H ₁₇ NO ₃ | 生物碱 | 2.61E+00 | 6.23E-04 | -1.06E+01 | 下调 | |
| <i>N</i> - <i>cis</i> -Paprazine | | | | | | | |
| 儿茶素 | C ₁₅ H ₁₄ O ₆ | 黄酮 | 2.98E+00 | 1.51E+04 | 1.39E+01 | 上调 | |
| Catechin | | | | | | | |
| <i>N</i> -乙酰葡萄糖胺 1-磷酸 | C ₈ H ₁₆ NO ₉ P | 其他类 | 2.39E+00 | 2.04E-03 | -8.94E+00 | 下调 | |
| <i>N</i> -Acetyl- <i>D</i> -glucosamine | | | | | | | |
| 1-phosphate | | | | | | | |
| <i>D</i> -赤式-鞘氨醇 | C ₁₈ H ₃₉ NO ₂ | 生物碱 | 2.33E+00 | 2.79E-03 | -8.48E+00 | 下调 | |
| <i>D</i> - <i>erythro</i> -Sphinganine | | | | | | | |
| <i>N</i> -反式阿魏酰酪胺 | C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ | 生物碱 | 2.60E+00 | 6.60E-04 | -1.06E+01 | 下调 | |
| <i>N</i> - <i>trans</i> -feruloyltyramine | | | | | | | |
| 柠檬素 | C ₁₇ H ₁₄ O ₈ | 黄酮 | 3.00E+00 | 1.82E+04 | 1.41E+01 | 上调 | |
| Limocitrin | | | | | | | |
| 异粗毛甘草素 D | C ₂₂ H ₂₆ O ₅ | 黄酮 | 2.56E+00 | 7.61E-04 | -1.04E+01 | 下调 | |
| Iso-glyasperin D | | | | | | | |
| 双脱氢百部新碱 B | C ₂₂ H ₂₉ NO ₅ | 生物碱 | 2.74E+00 | 3.45E+03 | 1.18E+01 | 上调 | |
| Bisdehydrostemoninine B | | | | | | | |
| <i>N</i> -(4- <i>O</i> -(β - <i>D</i> -吡喃葡萄糖基)- <i>E</i> -阿魏洛基)-酪胺 | C ₂₄ H ₂₉ NO ₉ | 生物碱 | 2.99E+00 | 6.16E-05 | -1.40E+01 | 下调 | |
| <i>N</i> -(4- <i>O</i> -(β - <i>D</i> -Glucopyranosyl)- <i>E</i> -feruloyl)-tyramine | | | | | | | |
| 金圣草黄素- <i>O</i> -乙酰基己糖苷 | C ₂₄ H ₂₄ O ₁₂ | 黄酮 | 1.63E+00 | 5.43E-02 | -4.20E+00 | 下调 | |
| Chrysoeriol- <i>O</i> -acetylhexoside | | | | | | | |
| 槲皮素- <i>O</i> -芸香苷-己糖 | C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁ | 黄酮 | 2.76E+00 | 6.96E+03 | 1.28E+01 | 上调 | |
| Quercetin- <i>O</i> -rutinoside-hexose | | | | | | | |
| 己糖基-金圣草黄素- <i>O</i> -芥子酰己糖苷 | C ₃₉ H ₄₂ O ₂₀ | 黄酮 | 2.73E+00 | 4.22E+03 | 1.20E+01 | 上调 | |
| <i>C</i> -Hexosyl-chrysoeriol- <i>O</i> -sinapoylhexoside | | | | | | | |

注：VIP：变量重要性投影；Fold Change：差异倍数；LogFC：取对数后的差异倍数。

Note: VIP: Variable importance projection; Fold Change: Differential multiplier; LogFC: The differential multiplier after logarithm.

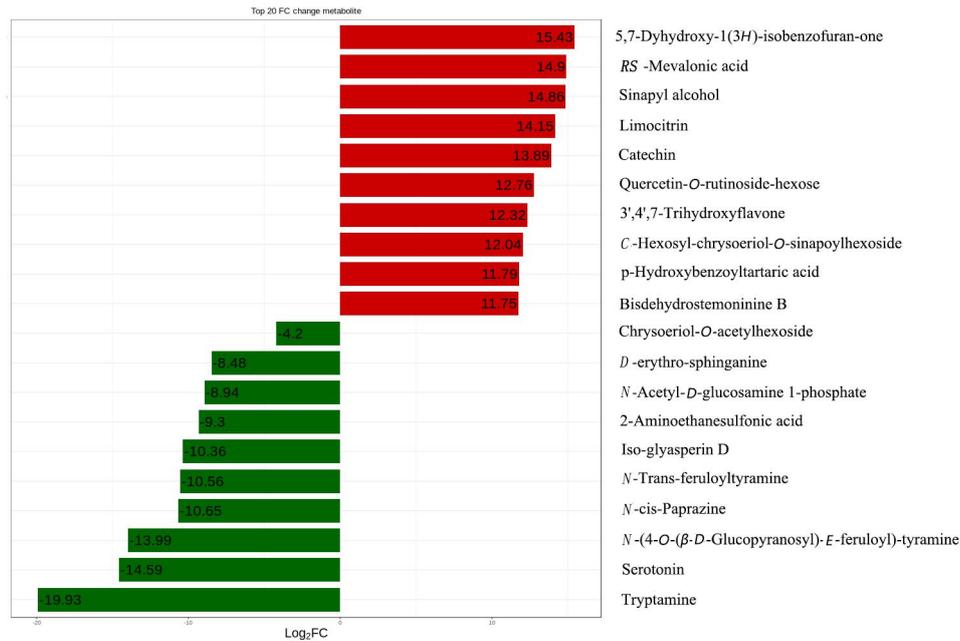


图 2 陈化 1 年与陈化 3 年广陈皮样品次生代谢物差异变化前二十的化合物条形图

Fig. 2 Bar chart of top 20 compounds of secondary metabolites in 1-year and 3-year aged *Pericarpium Citri Reticulatae* samples.

注：图中红色条形代表上调化合物，绿色的条形代表下调的化合物；图右侧为化合物英文名。Note: Red bars represent up-regulated and green bars represent down-regulated; On the right side of the figure is the English name of the compound.

2.3 广陈皮附着微生物的高通量测序结果

利用 Illumina HiSeq 测序平台得到下机数据 raw PE 后进行拼接和质控，得到 clean tags，再进行嵌合体过滤，得到可用于后续分析的有效数据，即 effective tags。对 effective tags 进行聚类，以 97%的一致性 (identity) 将序列聚类成为 OTUs (operational taxonomic units)，然后对 OTUs 的代表序列进行物种注释。将 OTU 的代表序列与微生物参考数据库进行比对可得到每个 OTU 对应的物种分类信息，进而在各水平统计各样品群落组成。从图 3 陈皮附着微生物属水平物种分布图可以看出，贮藏 1 年样品与贮藏 3 年样品微生物分布差异较大。

Alpha 多样性用于分析样品内 (within-community) 的微生物群落多样性，通过单样本的多样性分析可以反映样品内的微生物群落的丰富度和多样性，对分析指数 Shannon、Simpson、Chao1、Ace、Coverage 进行统计，Coverage 指各样本测序覆盖率，值越高，则样本中序列被检出的概率越大，而没有被检出的概率越小，直接代表样本测序结果的真实性^[19]。由表 2 结果可知，所有样本 Coverage 均高于 0.9990，说明测序对样本中真菌的覆盖率高、测序深度适合，可满足样本中真菌多样性分析的需要。Chao1 和 Ace 指数衡量物种丰度即物种数量的多少。Shannon 和 Simpson 指数用于衡量物种多样性，受样品群落中物种丰度和物种均匀度 (community evenness) 的影响。相同物种丰度的情况下，群落中各物种具有越大

的均匀度，则认为群落具有越大的多样性，Shannon 指数值越大，Simpson 指数值越小，说明样品的物种多样性越高^[20]。物种丰富度以 Ace 指数为评价指标，贮藏 1 年样品物种丰富度高于贮藏 3 年样品；综合 Simpson 指数与 Shannon 指数两个指标，贮藏 3 年样品物种多样性高于贮藏 1 年样品。结果表明，广陈皮在贮藏 1~3 年过程中，微生物物种数量逐渐减少，优势微生物菌落逐渐形成。如青霉属、曲霉属、耐干霉菌等。

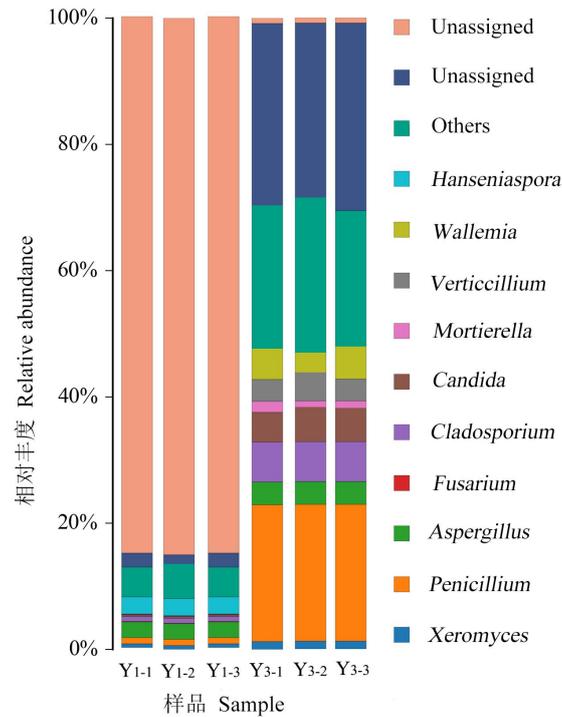


图 3 陈皮附着微生物属水平物种分布图

Fig.3 Horizontal species distribution of microorganisms attached to Pericarpium Citri Reticulatae samples

注：一种颜色代表一个物种，色块长度表示物种所占相对丰度比例。

Note: One kind of color represents a species, and the color patch length represents the proportion of species in relative abundance.

表 2 Alpha 多样性指数值统计值

Table 2 Alpha diversity index numerical statistics

| 样品 Sample | OTU | Ace | Chao1 | Simpson | Shannon | Coverage |
|--------------|-----|-----------|-------|----------|----------|----------|
| Y1-1 | 110 | 529.386 4 | 162.5 | 0.695 7 | 1.032 6 | 0.999 9 |
| Y1-2 | 112 | 521.212 3 | 159.3 | 0.678 9 | 1.123 2 | 1 |
| Y1-3 | 112 | 520.218 8 | 154.2 | 0.658 7 | 1.0987 6 | 1 |
| Y3-1 | 176 | 328.671 2 | 210 | 0.051 9 | 4.070 3 | 0.999 9 |
| Y3-2 | 176 | 330.876 5 | 209 | 0.098 7 | 4.113 8 | 1 |
| Y3-3 | 169 | 332.453 8 | 211 | 0.0765 9 | 4.023 7 | 0.999 9 |

注：OTU 为分类操作单元。

Note: OTU is the operational taxonomic unit.

2.4 差异代谢物与差异微生物的相关性分析

and expressed by *.

3 讨论与结论

3.1 样品的收集

本实验所用实验样品为同一产地、同一批次、不同贮藏年份的标准仓储陈皮。标准仓储为产地原位仓储，季节性定期管理，并记录仓储温湿度变化，是一种良好的样品可追溯收集办法，可避免受环境以及年份不准确的影响。

3.2 次生代谢产物的分析

代谢组学技术可全面科学地分析中药整体化学成分，已经在中药品种品质评价中广泛应用，如：人参^[21]、黄芩^[22]、白芷^[23]、赤芍与白芍^[24]等。本文通过广泛靶向代谢组学技术，从整体检测了贮藏1年与贮藏3年广陈皮中的次生代谢产物，PCA分析、OPLS-DA分析与热图分析均可明显区分不同年份样品，综合化合物保留时间、特征离子(Q1与Q3)，经数据库共检索出386种次生代谢产物，包括酚酸类79种，黄酮类143种，萜醌类4种，木脂素与香豆素17种，鞣质3种，生物碱47种，萜类6种，其他类87种。与传统高效液相色谱技术(HPLC)以及液质联用技术(LC-MS)相比，具有鉴定化合物数量多的优势，可整体反映广陈皮次生代谢物谱。为确保每个化合物的相对含量准确无误，本实验在获得不同样本的代谢物质谱分析数据后，对所有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。本实验参考临床与药理实验设计方法，以贮藏1年广陈皮为对照组，贮藏3年广陈皮样品为实验组，选取 $\text{fold change} \geq 2$ 或 $\text{fold change} \leq 0.5$ 和 $\text{VIP} \geq 1$ 的差异代谢物，即代谢物在组间差异为2倍以上或0.5倍以下以及 $\text{VIP} \geq 1$ ，则认为差异显著，结果共筛选出79种差异代谢物，其中差异上调且相对含量排名靠前的化合物可认为广陈皮的品质相关代谢物。从陈化1年与陈化3年广陈皮次生代谢物差异变化前二十的化合物中，上调的化合物分别为：3,5-二羟基-3-甲基戊酸、5,7-二羟基-1(3H)-异苯并呋喃-酮、芥子醇、对羟基苯甲酰酒石酸、3',4',7-三羟基黄酮、儿茶素、柠檬素、双脱氢百部新碱B、槲皮素-O-芸香苷-己糖和C-己糖基-金圣草黄素-O-芥子酰己糖苷，其中儿茶素、柠檬素、3',4',7-三羟基黄酮具有抑菌、抗炎、抗氧化、抗癌等功效，均可作为潜在的品质评价标志性化合物。中药治疗疾病具有多成分、多靶点、多通路的特点^[25]，如何在众多成分中筛选出治疗疾病的靶点成分是中药品质评价与质量控制的关键，其中小分子化合物数据预测、血清药物化学、植物代谢组学等方法应用较为广泛，本实验结果表明，在合理分组的前提下，采用基于UPLC-ESI-MS/MS广泛靶向代谢组学技术可高效筛选广陈皮品质相关代谢物，但筛选化合物活性还需要进一步结合广陈皮传统功效进行验证。

3.3 陈皮的陈化机制

传统认为陈皮“陈久者良”，已报道文献普遍认为陈皮在陈化过程中，微生物的代谢转化作用于陈皮中的化学成分，从而促进活性成分的积累，进而达到陈久者良的目的，同时该结果与已报道陈久陈皮总黄酮含量增加相一致。本文对代谢组检测出的差异代谢物和高通量测序比对出的差异微生物进行相关性分析，结果也证实，优势菌属微生物确实可显著影响广陈皮中的活性成分，如曲霉属、青霉属、耐干霉属等真菌，与文献报道一致。课题组前期研究发现，广陈皮在陈化过程中，表面附着优势微生物类群在不断的演变，随着陈化时间的增加，优势微生物从以平脐疣孢属 (*Zasmidium*)、枝孢属 (*Cladosporium*)、*Symmetrospora*、镰刀菌属 (*Fusarium*) 为优势转变为以枝孢属 (*Cladosporium*)、短梗霉属 (*Aureobasidium*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、耐干霉属 (*Xeromyces*) 为主，如贮藏 1 年与贮藏 3 年样品间的一种差异微生物双孢旱霉 (*Xeromyces bisporus*) 为一种在较低水分活度条件下仍可存活的微生物^[26]，可以适应极低水分活度 (0.61) 生活环境，这与陈化年份较久的陈皮极为干燥情况较为吻合。同时实验结果表明，枝孢属、短梗霉属、曲霉菌属以及耐干霉属等差异微生物可同时影响桔皮素、香草酸、松柏苷以及酸类成分等多种活性成分与香气成分的相对含量。因此，综合判断可以得知：广陈皮样品中的差异微生物一方面可以促进活性成分桔皮素等黄酮类成分相对含量的增加，同时也可以改变香气类成分相对含量的增加或减少而调节广陈皮的气味。因此，陈皮“陈久者良”的科学内涵可能与差异微生物对次生代谢物相对含量的影响密切相关。

参考文献

- 1 Lei J.Leigong Treatise on the Preparation(雷公炮炙论)[M].Shanghai:The press of Shanghai University of traditional Chinese Medicine,1986:52.
- 2 Li ZZ.Drug Properties of Leigong Preparation(雷公炮制药性解)[M].Beijing:Traditional Chinese Medicine Press,1998:136-137.
- 3 Wang J,Huang QW,Zhang YL,et al.Current situation of the long-stored TCM research and exploration of the ideas[J].China Pharm(中国药房),2012,23:1433-1435.
- 4 Gu GG.Sheng Nong's Herbal Classic(神农本草经)[M].Harbin:Harbin Publishing House,2007:71-72.
- 5 Tao HJ.Bencao Jizhu(本草经集注)[M].Kunming:Qunlian Press,1955:360-362.
- 6 Li SZ.Compendium of Materia Medica(本草纲目)[M].Tianjin:Old Book of Tianjing Press,1998:300.
- 7 Hang AW.Traditional understanding of traditional Chinese medicine[J].J Tradit Chin Med Liter(中医文献杂志),2007,25:10-12.
- 8 Jin R,Yu MM,Zhao BX,et al.Analysis on chemical compositions of Artemisia Argyi from Qichun of different

- years and moxa wool refined in different proportions[J].Chin Acupunct Moxibust(中国 针 灸),2010,30:389-392.
- 9 Xu YF,Wang K,Huang ZB,et al.Studies on the dynamic variation of chemical constituents in related Chinese medicinal herbs of "Liuchen" adopting acceleration experiment design[J].Strait Pharm J(海 峡 药 学),2014,26:18-21.
 - 10 Yan HJ.Component analysis on the volatile oils of Pericarpium Citri Reticulatae stored for different years[J].Lishizhen Med Mat Med Res(时珍国医国药),2005,16:218-219.
 - 11 Liu P,Zhang GM,Zheng XG,et al.Application of microorganism on tobacco leaves[J].Bull Microbiol(微生物 学通报),2003,30:105-110.
 - 12 Fu XJ.Study on predominant microorganism and enzyme and their relations to main functionality components during the fermentation process of puer tea[D].Tianjin:Tianjin University of Commerce(天 津 商 业 大 学),2012.
 - 13 Wei JL,Nie Y,Du H,et al.How trophic interactions drive the spontaneous construction of microbial community in traditional fermented foods:a review[J].Microbiol China(微生物学通报),2021,5:1-17.
 - 14 Wang F,Zhang X,Lu JY,et al.Study of reason of "the older, the better"of Pericarpium Citri Reticulatae(PCR) which contributed increase of flavonoids[J].China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2015,40:4890-4896.
 - 15 Liu LN.Study on the mechanism fo the active substance transformation of Citri Reticulatae Pericarpium aging based on microbial metabolism[D].Guangdong:Guangdong ocean university(广东海洋大学),2019.
 - 16 Li FQ,Wang F,Yang FQ et al.Analysis of flavonoids in Chuan Citrus Reticulata Pericarpium and its adulterant using UHPLC-ESI-MS/MS[J].Nat Pro Rec Dev(天然产物研究与开发).2020,32:1324-1330.
 - 17 Yang R,Li Y,Zhang Y,et al.Widely targeted metabolomics analysis reveals key quality-related metabolites in kernels of sweet corn[J].Int J Genomics.2021:2654546.
 - 18 Wang HY,Kang CZ,Wang S,et al.Research strategies for endophytes in medicinal plants based on high-throughput sequencing and traditional culture and isolation methods[J].China J Chin Mater Med(中国中 药杂志),2021,46:1910-1919.
 - 19 Grice EA,Kong HH,Blakesley RW,et al.Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome[J].Science,2009,324:1190-1192.
 - 20 Wang Y,Sheng HF,He Y,et al.Comparison of the levels of bacterial diversity in freshwater,intertidal wetland,and marine sediments by using millions of illumina tags[J].Appl Environ Microbiol,2012,78:8264-8271.

- 21 Chan EC, Yap SL, Lau AJ, et al. Ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics of raw and steamed *Panax notogin-seng*[J]. *Rapid Commun Mass Spectrum*, 2007, 21: 519-528.
- 22 Ma Q, Liang D, Song S, et al. Comparative study on the antiviral activity of Shuang-Huang-Lian injectable powder and its bioactive compound mixture against human adenovirus III *in vitro*[J]. *Viruses*, 2017, 9(4): 79.
- 23 Tianniam S, Bamba T, Fukusaki E. Pyrolysis GC-MS-based metabolite fingerprinting for quality evaluation of commercial *Angelica acutiloba* roots[J]. *J Biosci Bioeng*, 2010, 109: 89.
- 24 Yang QW, Yang L, Xiong AZ, et al. Metabolomics study of anti-platelet effect of *Radix Paeoniae Rubra* and *Radix Paeoniae Alba* by UPLC-MS[J]. *China J Chin Mater Med*(*中国中药杂志*), 2011, 36: 694-697.
- 25 Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11: 110-120.
- 26 Leong SL, Pettersson OV, Rice T, et al. The extreme xerophilic mould *Xeromyces bisporus*—growth and competition at various water activities[J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 145: 57-63.

收稿日期: 2021-09-13 接受日期:

基金项目: 国家自然科学基金 (81973436, 82104340)

*通信作者 E-mail: wangfuboy2019@126.com, liuyouping@163.com