南京中医药大学学报 2022 年 9 月第 38 卷第 9 期
J Nanjing Univ Tradit Chin Med Vol. 38 No. 9 Sep. 2022

2 种化学型的黄花蒿萜类代谢物及其相关基因表达分析

王婷婷[1,2],戴仕林[1,2],刘潺潺[1,2],蒋征[1],吴啟南[1,2,3]
(1. 南京中医药大学药学院,江苏 南京 210023;2. 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心,江苏 南京 210023;3. 中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心,江苏 南京 210023)

吴 啟 南

1964年生，男，江苏南通人。南京中医药大学教授，博士生导师，江苏省中药资源产业化过程协同创新中心副主任。江苏省高等学校中药资源化学科技创新团队带头人，国家一流专业中药资源与开发专业、国家级一流课程中药鉴定虚拟仿真实验项目负责人。兼任教育部高等学校中药学类专业教指委委员、中国自然资源学会中药及天然药物资源专业委员会副主任兼秘书长、世中联中药鉴定专业委员会副主任委员、中华中医药学会中药鉴定分会副主任委员等。曾获全国优秀科技工作者、江苏省“五一”劳动奖章等。长期从事中药资源生产、中药鉴定及药材品质形成机制等相关领域的教学与科研工作。主持国家科技支撑计划、国家自然科学基金等10余项国家级课题；在国内外学术期刊上发表论文200余篇，其中SCI论文40余篇；授权专利11项；获国家科技进步奖二等奖1项、省级科技进步奖3项。主编教材或专著5部，主编的专著《新编中国药材学》获第五届中国出版政府奖；获省级教学成果二等奖2项。

摘要:目的 分析 2 种化学型黄花蒿萜类代谢物及其转录组数据信息,探讨 2 种化学型黄花蒿差异代谢物及其可能形成原因。**方法** 采集江苏盱眙县、河南中牟县两地黄花蒿种子于同一条件下种植,通过顶空-气相色谱-三重四极杆串联质谱(HS-GC-QQQ-MS/MS)分析黄花蒿的挥发性成分,超快速高效液相色谱-三重四级杆飞行时间串联质谱(UFLC-Triple TOF-MS/MS)非靶向分析 2 种化学型黄花蒿的代谢物,并采用转录组测序分析挥发性成分相关萜类生物合成基因的表达。**结果** 依据挥发性主成分类别分型,江苏盱眙县种源黄花蒿为蒿酮型,河南中牟县种源黄花蒿为樟脑型。UFLC-Triple TOF-MS/MS 检测到的差异代谢物通过 KEGG 数据库分析可知蒿酮型和樟脑型黄花蒿分别在倍半萜、三萜生物合成和二萜生物合成路径显著上调。转录组数据中通向萜类骨架生物合成的甲基赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径和甲羟戊酸(MVA)途径注释到 11 个关键酶的 23 个候选基因具有显著差异。单萜合成路径中,1,8-桉树脑合酶(TPS-Cin)共检测到 10 个候选基因。此外,还发现 2 个冰片脱氢酶候选基因在樟脑型黄花蒿中高表达,3 个黄花蒿醇脱氢酶 2(ADH2)候选基因在蒿酮型黄花蒿中高表达。**结论** 该研究为揭示黄花蒿化学型形成分子机制提供科学数据。

关键词:黄花蒿;挥发性成分;化学型;萜类代谢物;生物合成
中图分类号:R284 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2022)09-0770-10
DOI:10. 14148/j. issn. 1672-0482. 2022. 0770
引文格式:王婷婷,戴仕林,刘潺潺,等. 2 种化学型的黄花蒿萜类代谢物及其相关基因表达分析[J]. 南京中医药大学学报,2022,38(9):770-779.

Expression Analysis of Two Chemical-Types of *Artemisia Annua* L. Terpenoids and Their Related Genes

***WANG Ting-ting*[1,2], *DAI Shi-lin*[1,2], *LIU Chan-chan*[1,2], *JIANG Zheng*[1], *WU Qi-nan*[1,2,3]**
(1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, *China; 2. Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization, Nanjing* 210023, *China; 3. National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing* 210023, *China)*

收稿日期: 2022-01-22
基金项目: 国家中医药管理局专项国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JS-31);国家中医药管理局道地药材生态种植及质量保障项目(2021)
第一作者: 王婷婷,女,硕士研究生,E-mail:wangtingt816@ 163. com
通信作者: 吴啟南,男,教授,博士生导师,主要从事道地药材生产与品质评价研究,E-mail:wuqn@ njucm. edu. cn

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the differential metabolites of two chemical-types of *Artemisia annua* and their possible causes by analyzing the data of terpenoid metabolites and their transcriptome of two chemical-types of *Artemisia annua*. **METHODS** The seeds of *Artemisia annua* were collected from Xuyi County, Jiangsu Province, and Zhongmou County, Henan Province, in China, and grown under the same conditions. The volatile components of *Artemisia annua* were analyzed by headspace-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (HS-GC-QQQ-MS/MS), non-targeted analysis of the differential metabolites of 2 chemical-types of *Artemisia annua* were performed by ultra-fast liquid chromatography-triple quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry (UFLC-Triple TOF-MS/MS), and the expression of the biosynthetic genes of the volatile components was analyzed by transcriptome sequencing. **RESULTS** Based on the typing of volatile components, *Artemisia annua* from Xuyi County, Jiangsu Province was classified as artemisia ketone type, and *Artemisia annua* from Zhongmou County, Henan Province was classified as camphor type. The differential metabolites detected by UFLC-Triple TOF-MS/MS were significantly up-regulated in sesquiterpene, triterpene, and diterpene biosynthesis pathways by Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) database analysis for artemisia ketone type and camphor types of *Artemisia annua*, respectively. The 2-methyl-*D*-erythritol-4-phosphate (MEP) pathway leading to terpene skeleton biosynthesis and the mevalonate (MVA) pathway annotated 23 candidate genes for 11 key enzymes that were significantly differential in the transcriptome data. In the monoterpene synthesis pathway, 10 candidate genes were detected for 1,8-cineole synthase (TPS-Cin). In addition, two borneol dehydrogenase candidates were found to be highly expressed in camphor-type *Artemisia annua*, and three *Artemisia annua* alcohol dehydrogenase (ADH2) candidates were highly expressed in artemisia ketone-type *Artemisia annua*. **CONCLUSION** This study provides scientific data to reveal the molecular mechanism of *Artemisia annua* chemical-types formation.

KEYWORDS: *Artemisia annua* L.; volatile components; chemical type; terpenoids; biosynthesis

形态特征无明显差异的同种植物由于所含代谢物组成或含量的差异可被区分为不同的化学型,化学型是植物种内变异之一,体现了种内生物多样性[1]。化学型一般是由遗传因素和环境因素共同作用形成的,并且在药用植物中普遍存在。不同产地或不同品种间药用植物所含代谢物存在一定差异,进而对其药效产生影响。因此,化学型形成机制的研究对药材道地性的阐明、药材质量控制具有重要的理论意义和应用价值。

菊科植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 为一年生草本,干燥的全草入药为青蒿药材,有浓郁香气,是提取抗疟特效药青蒿素的原料。黄花蒿含有丰富的挥发性成分,以单萜、倍半萜为主,现有研究表明其具有良好的抗菌[2-5]、抗氧化[6-8]、解热[5]等作用。黄花蒿作为一种高抗逆性物种,分布广泛[9],不同地区的黄花蒿挥发性成分的组成和含量均差异明显,药理活性也各有侧重。

江苏和河南均为青蒿药材的传统产区[10],并且江苏盱眙产青蒿药材是品牌中成药的原料药之一[11],两地药材挥发性成分研究对黄花蒿药用资源的利用具有重要意义。本研究通过顶空-气相色谱-三重四极杆串联质谱(HS-GC-QQQ-MS/MS)分析 2 个产地黄花蒿的挥发性成分,超快速高效液相色谱-三重四级杆飞行时间串联质谱(UFLC-Triple TOF-MS/MS)非靶向分析不同化学型差异代谢物,并采用转录组测序分析相关萜类成分基因表达,以期为黄花蒿化学型形成机制研究提供基础。

1　材料

1.1　仪器

HS-GC-QQQ-MS/MS(7697A-7000C)(美国 Agilent 公司);SIL-20A XR 超快速液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司);Triple TOF™ 5600 System-MS/MS 高分辨四极杆飞行时间质谱仪(美国 AB Sciex 公司);万分之一电子分析天平(日本 Shimadzu 公司);SAGA-TY 纯水机(南京易普易达科技发展有限公司);冷冻离心机(美国 Beckman coulter 公司);冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);-80 ℃低温保存冰箱(青岛海尔生物医疗股份有限公司)。

1.2　试药

江苏产黄花蒿种子由江苏盱眙青蒿药材基地提供(北纬 33.0°,东经 118.48°),样品编号:JXAa;河南产黄花蒿种子由实验室在河南中牟县收集(北纬 34.44°,东经 113.94°),样品编号:HZAa;家庭园艺营养土(美乐棵);甲醇(美国 Merck 公司);乙腈(美国 Merck 公司);乙酸(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。

2　方法

2.1　植物种植和取样

将两地黄花蒿种子撒于装土的方形盆(11 cm×11 cm×9.5 cm)中,在温度(25±2)℃,湿度 60%~70%的条件下萌发,长至 1 个月后,将幼苗移栽至方形盆(10 cm×10 cm×14 cm),每盆 1 株,待生长近 5 个月时,经南京中医药大学吴啟南教授鉴定为菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L.。JXAa 和 HZAa 各选 3 株,取其叶片,低温冷藏,用于后续转录组测序分析和化学成分分析。

2.2　样品制备

2.2.1　HS-GC-QQQ-MS/MS 样品制备　分别取 JXAa、HZAa 黄花蒿鲜叶各 200 mg,置于规格为 25 mL 配有聚四氟乙烯胶垫的顶空瓶中,压盖密封。

2.2.2　UFLC-Triple TOF-MS/MS 样品制备　分别取 JXAa、HZAa 黄花蒿鲜叶，冷冻干燥 2 d，粉碎，过 4 号筛，称取 100 mg 粉末，溶于 0.6 mL 70%甲醇提取液，置于 4 ℃条件下的摇床上振摇过夜。10 000 r·min^{-1} 冷冻离心 10 min，吸取上清，0.22 μm 微孔滤膜过滤，置于进样瓶。

2.3　HS-GC-QQQ-MS/MS 测定条件

2.3.1　顶空平衡条件　加热箱 65 ℃；样品平衡 40 min；进样持续时间 0.5 min；GC 循环 52 min；在加热箱中震荡样品瓶（71 min^{-1}）。

2.3.2　色谱条件　色谱柱：Agilent 19091S-433UI HP-5MS UItra Inert（30 mm×250 μm，0.25 μm）；流速：1.0 mL·min^{-1}；升温程序：初始温度 50 ℃，保持 2 min，以 4 ℃·min^{-1} 的速率升温至 110 ℃，以 8 ℃·min^{-1} 的速率升温至 130 ℃，以 3 ℃·min^{-1} 的速率升温至 180 ℃，以 10 ℃·min^{-1} 的速率升温至 240 ℃，保持 5 min；进样口温度：250 ℃；进样量：1.0 μL；分流比：30∶1[11]。

2.3.3　质谱条件　离子源温度：230 ℃；电子轰击能量：70 eV；离子扫描范围：50～450 aum；MS1 四极杆温度：150 ℃。

2.4　UFLC-Triple TOF-MS/MS 测定条件

2.4.1　色谱条件　色谱柱：Agilent ZORBAX Elipse Plus C_{18} Rapid Resolution HD（2.1 mm×50 mm，1.8 μm）。流动相：A 相为超纯水（加入 0.04%乙酸），B 相为乙腈（加入 0.04%乙酸）。洗脱梯度：0～10.00 min，5%～95%B；10.00～11.00 min，95%B；11.00～12.00 min，95%～5%B；12.00～14.10 min，5%B。流速 0.35 mL·min^{-1}；柱温 40 ℃；进样量 4 μL。

2.4.2　质谱条件　在正、负离子模式下采集数据；质量扫描范围 m/z：50～1 500；离子源温度（TEM）：550 ℃；帘气（CUR）流速：40 L·min^{-1}，雾化气（GS1）流速：60 L·min^{-1}；辅助气（GS2）流速：60 L·min^{-1}；喷雾电压（IS）正离子模式 5 500 V，负离子模式 -4 500 V；去簇电压（DP）正离子模式 100 V，负离子模式-100 V。

2.5　转录组测序

分别取 JXAa、HZAa 样品各 3 份作为生物学重复，委托武汉华大医学检验所有限公司高通量实验室使用 DNBSEQ 平台进行测序。

2.6　数据处理

2.6.1　HS-GC-QQQ-MS/MS 数据处理　使用 Agilent MassHunter Qualitative analysis B.07.00 软件进行分析，NIST14 标准质谱图库鉴定化合物。

2.6.2　UFLC-Triple TOF-MS/MS 数据处理　将原始数据通过 Analysis Base File Converter 转化为 abf 格式文件并导入 MS-DIAL 4.24[12]，设置一级质谱偏差为 0.01 Da，二级质谱偏差为 0.025 Da，最小峰高为 1 000，进行峰提取和峰识别；保留时间偏差为 0.05 min，进行峰对齐，最终获得由峰保留时间、峰质荷比、峰面积等构成的数据矩阵。将处理好的数据以 CSV 格式保存并导入 MetaboAnalyst 5.0[13]，在 Statistical Analysis 模块下进行峰面积归一化及对数转换，将数据进行 t 检验以及正交偏最小二乘分析（OPLS-DA），筛选差异数据。Functional Analysis 模块下导入筛选后的差异数据，通过 Plants 项下 *Arabidopsis thaliana*（KEGG）数据库进行代谢物鉴定。将鉴定好的差异代谢物导入 Pathway analysis 模块进行代谢物通路分析，选择散点图作为数据可视化方法，通路富集方法采用超几何分布检验，拓扑分析选择 Relative-betweeness centrality，数据库为 *Arabidopsis thaliana*（KEGG），并且选择数据库中所有化合物作为通路富集分析的参考。

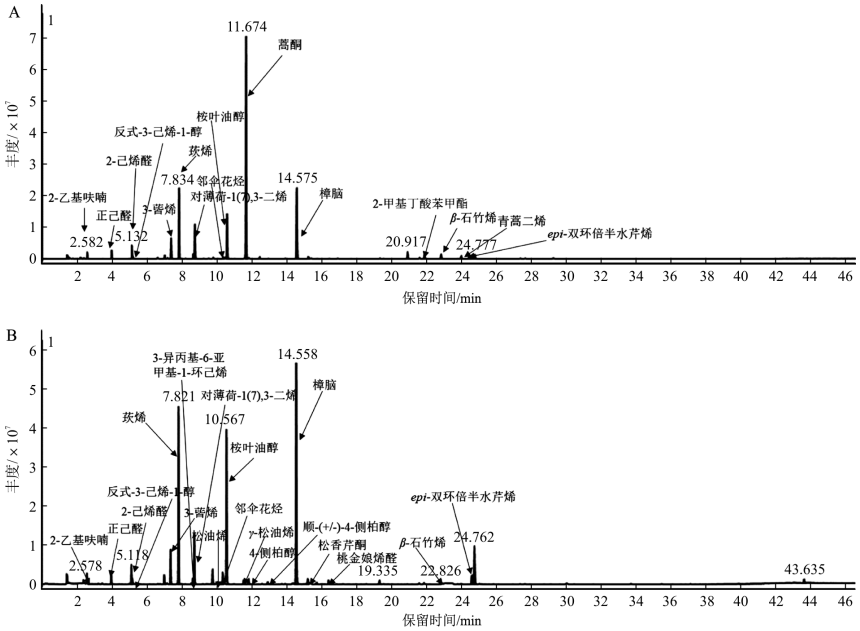
2.6.3　转录组数据处理　在测序所得的原始数据（Raw reads）中过滤低质量、接头污染以及未知碱基（N）含量过高的数据，然后将过滤后数据（Clean reads）比对到参考基因组（https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genbank/plant/Artemisia_annua/latest_assembly_versions/GCA_003112345.1_ASM311234v1/），检测不同样品之间的差异表达基因，结合 GO、KEGG 等数据库进行差异基因功能注释，随后对已注释的差异基因进行 GO 注释分析和 KEGG 代谢通路分析。使用 TBtools 软件[14]，以转录组数据作为数据库，用黄花蒿基因组中冰片脱氢酶和黄花蒿醇脱氢酶 2（ADH2）基因序列进行 blast 比对，寻找转录组数据中编码冰片脱氢酶和 ADH2 候选基因的表达数据。

3　结果

3.1　HS-GC-QQQ-MS/MS 结果分析

2 组样品共鉴定出 22 种化学成分，相同化合物 12 种，根据主成分相对含量占比，确定 JXAa 为蒿酮型、HZAa 为樟脑型，见图 1、表 1。蒿酮型共鉴定出 15 种成分，其中萜类 11 种，相对含量最高的是蒿酮（51.28%），其次是桉叶油醇（12.37%）。樟脑型共鉴定出 19 种成分，其中萜类 15 种，相对含量最高的

是樟脑(30.7%),其次是莰烯(21.38%)。2 组样品除挥发性成分樟脑以外,相同化合物的相对含量,蒿酮型占比为 44.91%,樟脑型占比为 58.81%。



注:A. JXAa;B. HZAa

图 1　黄花蒿 HS-GC-QQQ-MS/MS 总离子流色谱图

Fig. 1　Total ion chromatogram of *Artemisia annua* HS-GC-QQQ-MS/MS

表 1　黄花蒿挥发性成分($n=4$)

Table 1　List of volatile components of *Artemisia annua* samples($n=4$)

编号	CAS	英文名称	中文名称	峰面积百分比/%	
				JXAa	HZAa
1	3208-16-0	2-Ethylfuran	2-乙基呋喃	1.87±1.2	0.7±0.32
2	66-25-1	Hexanal	正己醛	2.95±1.63	0.92±0.23
3	505-57-7	2-Hexenal	2-己烯醛	3.35±2.15	1.51±0.57
4	544-12-7	*trans*-3-Hexen-1-ol	反式-3-己烯-1-醇	0.91±0.46	0.55±0.12
5	13466-78-9	3-Carene	3-蒈烯	1.9±1.25	4.55±0.59
6	79-92-5	Camphene	莰烯	5.46±5.25	21.38±0.96
7	555-10-2	β-Phellandrene	3-异丙基-6-亚甲基-1-环己烯	-	1.13±0.4
8	99-84-3	β-Terpinene	对薄荷-1(7),3-二烯	6.28±1.08	5.65±2.48
9	99-86-5	α-Terpinene	松油烯	-	0.37±0.05
10	527-84-4	*o*-Cymene	邻伞花烃	0.46±0.09	1.28±0.13
11	470-82-6	Eucalyptol	桉叶油醇	12.37±3.45	21.17±1.51
12	99-85-4	γ-Terpinene	γ-松油烯	-	0.73±0.15
13	546-49-6	Artemisia ketone	蒿酮	51.28±8.31	-
14	17699-16-0	4-Thujanol	4-侧柏醇	-	1.13±0.57
15	15537-55-0	*cis*-(+/-)-4-Thujanol	顺-(+/-)-4-侧柏醇	-	0.43±0.12
16	76-22-2	Camphor	樟脑	6.8±6.14	30.7±4.44
17	30460-92-5	Pinocarvone	松香芹酮	-	0.61±0.09
18	564-94-3	Myrtenal	桃金娘烯醛	-	0.45±0.14
19	56423-40-6	Butanoic acid,2-methyl-,phenylmethyl ester	2-甲基丁酸苯甲酯	0.52±0.23	-
20	87-44-5	β-Caryophyllene	β-石竹烯	0.99±0.47	0.4±0.16
21	92692-39-2	Amorpha-4,11-diene	青蒿二烯	0.53±0.17	-

22	54274-73-6	*epi*-Bicyclosesquiphellandrene	*epi*-双环倍半水芹烯	1.57±1.21	0.7±0.41

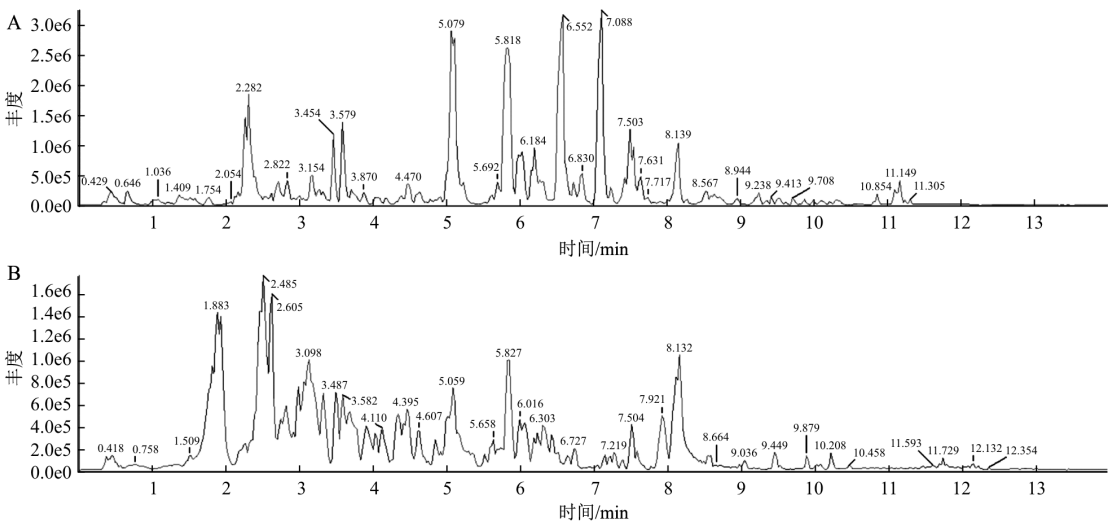
注:-表示未检测出该成分。

3.2　UFLC-Triple TOF-MS/MS 结果分析

2 种化学型在正、负离子模式下 UFLC-Triple TOF-MS/MS 基峰图,见图 2~3。2 种化学型黄花蒿在 PCA、OPLS-DA 图中均分离明显,OPLS-DA 模型验证发现正、负离子模式下 Q^2 回归线与 Y 轴相交低于零,负离子模式下 R^2 绿点基本上低于最右 R^2 绿点,即原始点,说明模型稳定性较好,见图 4~5。

VIP 可以衡量代谢物对 OPLS-DA 模型的重要程度,通常作为筛选差异代谢物的指标之一。本实验以 $VIP \geqslant 1$ 和 $P<0.05$ 作为筛选差异代谢物标准。在正、负离子模式下共筛选出 253 个差异代谢物,其中蒿酮型上调的差异代谢物有 182 种,樟脑型上调的差异代谢物有 71 种。

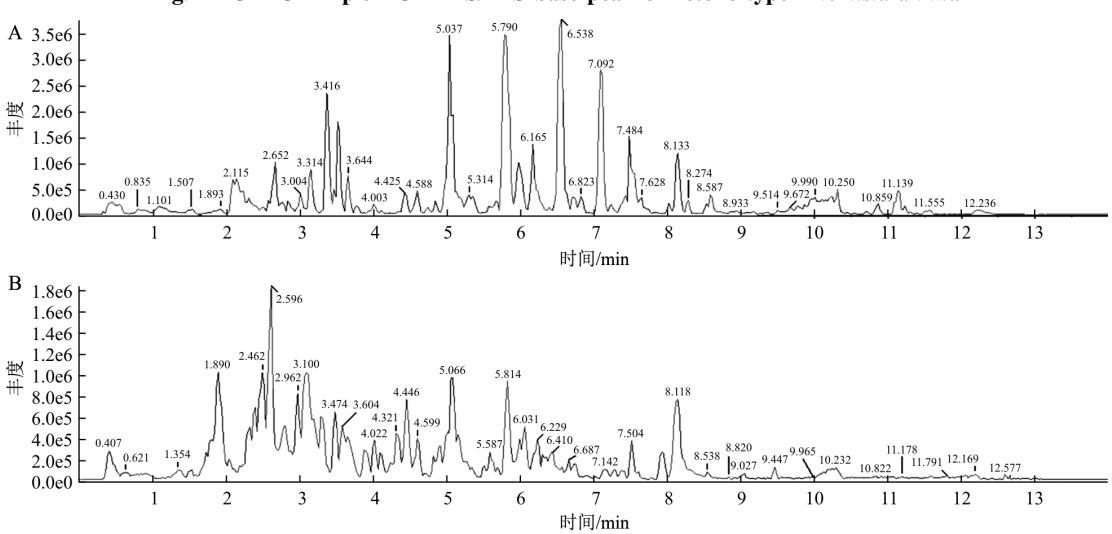
在代谢通路图中,圆圈代表代谢通路,圆圈大小表示样品中所含该通路的代谢物对代谢通路的影响,圆圈颜色表示显著性(P 值)大小,P 值越大,圆圈颜色越红。蒿酮型黄花蒿排名靠前的萜类代谢通路中有挥发性成分相关的倍半萜、三萜生物合成,见图 6A;樟脑型黄花蒿排名靠前的萜类代谢通路主要是二萜生物合成,见图 6B,其中二萜生物合成代谢通路上调化合物主要是赤霉素合成通路上的物质 *ent*-7α-Hydroxykaur-16-en-19-oic acid、Kaur-16-en-18-ol、Kaur-16-en-18-al、香叶基芳樟醇[(*E*,*E*)-Geranyllinalool]等,见表 2。



注:A. 正离子模式;B. 负离子模式

图 2　蒿酮型黄花蒿 UFLC-Triple TOF-MS/MS 基峰图

Fig. 2　UFLC-Triple TOF-MS/MS base peak of ketone type *Artemisia annua*



注:A. 正离子模式;B. 负离子模式

图 3　樟脑型黄花蒿 UFLC-Triple TOF-MS/MS 基峰图

Fig. 3　UFLC-Triple TOF-MS/MS base peak of camphor type *Artemisia annua*

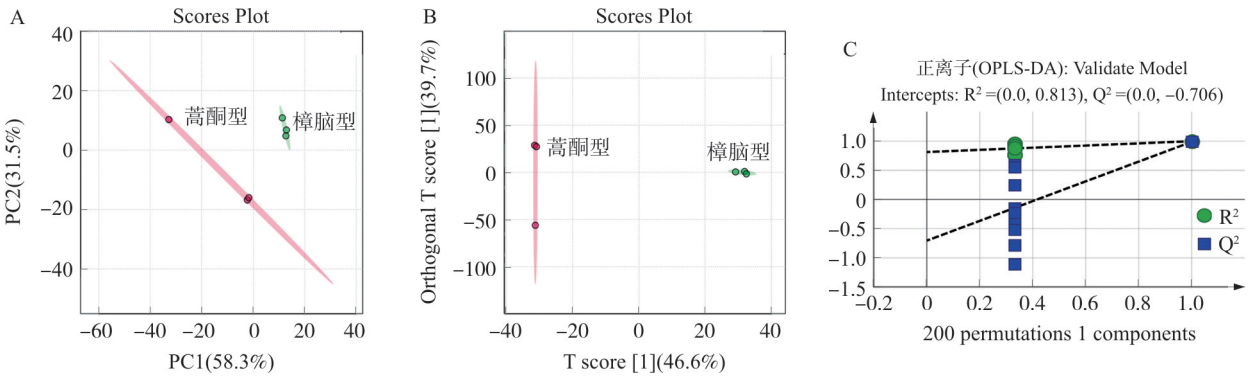


图 4　正离子模式下 2 种化学型黄花蒿 PCA 图(A)、OPLS-DA 得分图(B)、OPLS-DA 模型验证图(C)

Fig. 4　PCA plots (A), OPLS-DA score plots (B) and OPLS-DA model validation plots (C) of two chemical types of *Artemisia annua* in positive ion mode

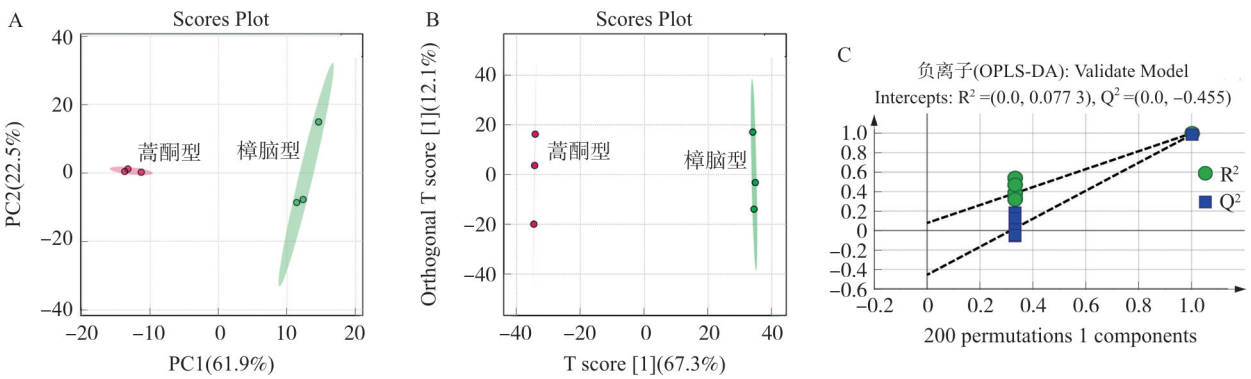


图 5　负离子模式下 2 种化学型黄花蒿 PCA 图(A)、OPLS-DA 得分图(B)、OPLS-DA 模型验证图(C)

Fig. 5　PCA plots (A), OPLS-DA score plots (B) and OPLS-DA model validation plots (C) of two chemical types of *Artemisia annua* in negative ion mode

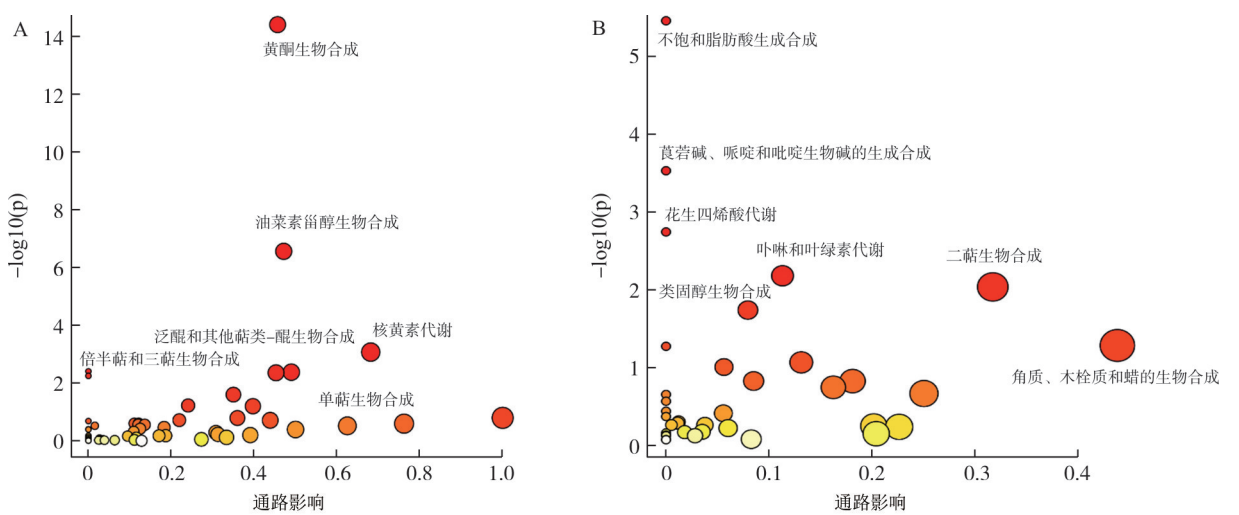


图 6　蒿酮型(A)和樟脑型(B)黄花蒿上调代谢物通路分析

Fig. 6　Analysis of the up-regulated metabolite pathway of artemisia ketone type (A) and camphor type (B) *Artemisia annua*

3.3　转录组数据分析

实验样品比对基因组[15]的平均比对率为

81.35%,共检测到表达的基因数为 46 413。基于负二项分布原理,本实验根据 Love 等[16]描述的方法进行差异基因检测,共检测到 10 023 个差异基因,用火山图来表示差异基因的分布,见图 7A,发现蒿酮型黄花蒿上调差异基因数为 5 136,樟脑型黄花蒿上调差异基因数为 4 887。

表 2　樟脑型黄花蒿二萜通路上调差异代谢物

Table 2　Up-regulated differential metabolites in camphor type *Artemisia annua* diterpene pathway

序号	保留时间/min	分子式	质荷比 *m/z*	化合物名称	加和离子	差异倍数	*P* 值	*VIP*
1	8.565	$C_{20}H_{30}O_3$	275.237	*ent*-7α-Hydroxykaur-16-en-19-oic acid	$[M-CO_2+H]^+$	0.056	3.896E-07	1.464
2	6.768	$C_{20}H_{32}O$	307.264	Kaur-16-en-18-ol	$[M+H_2O+H]^+$	0.072	9.921E-05	1.453
3	7.539	$C_{20}H_{30}O$	305.247	Kaur-16-en-18-al	$[M+H_2O+H]^+$	0.081	2.691E-03	1.401
4	7.953	$C_{20}H_{34}O$	291.269	香叶基芳樟醇[(*E*,*E*)-Geranyllinalool]	$[M+H]^+$	0.289	5.714E-03	1.372

3.3.1　GO 注释分析　GO 共有三大功能类:生物过程(Biological process)、细胞组分(Cellular component)和分子功能(Molecular function)。生物过程大类共 21 个亚类,其中占比最高的亚类是细胞过程(Cellular process),注释数量为 3 650,其次是代谢过程(Metabolic process),注释数量为 29 922。细胞组分大类共 3 个亚类,其中细胞结构实体(Cellular anatomical entity)和细胞内(Intracellular)占比最高,注释数量分别为 5 659 和 3 100,其次是含蛋白质复合物(Protein-containing complex),注释数量为 967。分子功能大类共 16 个亚类,其中占比最高的是 2 个亚类是催化活性(Catalytic activity)和结合(Binding),注释数量分别为 4 562 和 4 452,见图 7B。

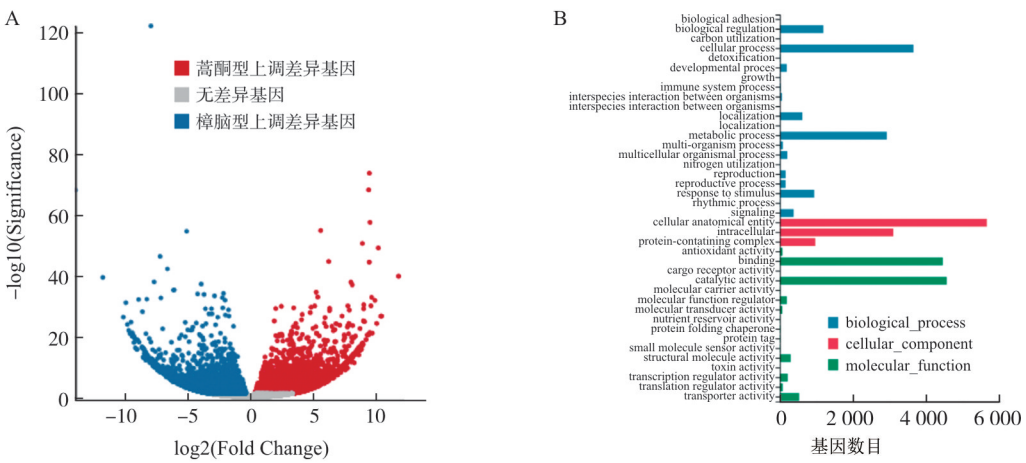
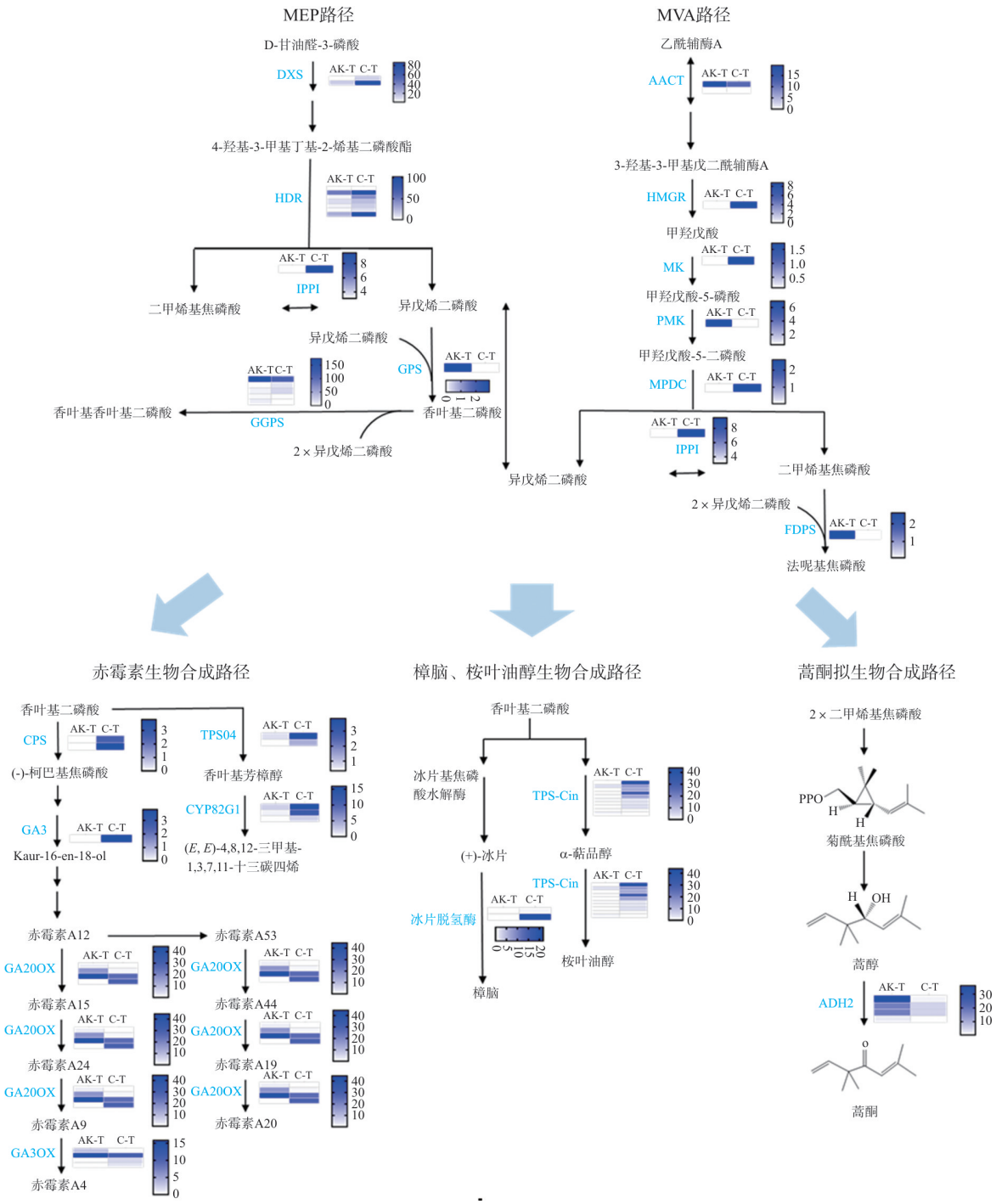


图 7　2 种化学型黄花蒿差异基因火山图(A)和差异基因 GO 分类图(B)

Fig. 7　Differential gene volcano map (A) and gene GO classification map (B) of two chemical types of *Artemisia annua*

3.3.2　萜类基因分析　根据 HS-GC-QQQ-MS/MS 数据,2 种源黄花蒿的挥发性成分中单萜组分差异明显,据此分为 2 种化学型。UFLC-Triple TOF-MS/MS 数据中可以发现挥发性成分相关的萜类差异代谢物主要集中于二萜代谢通路和倍半萜、三萜代谢通路。萜类化合物的碳骨架是通过代谢中间体异戊烯二磷酸和二甲烯基焦磷酸缩合而成,二者在自然界中通过甲羟戊酸(MVA)途径和甲基赤藓糖醇-4-磷酸(MEP)途径生成。在转录组数据中萜类骨架 MEP 途径和 MVA 途径共注释到 11 个关键酶[1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS)、4-羟基-2-甲基-2-*E*-丁烯基-4-焦磷酸还原酶(HDR)、异戊烯基焦磷酸异构酶(IPPI)、异戊烯基转移酶牻牛儿基焦磷酸合酶(GPS)、牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶(GGPS)、乙酰辅酶 A 酰基转移酶(AACT)、3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(HMGR)、甲羟戊酸激酶(MK)、甲羟戊酸激酶(PMK)、甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶(MPDC)、法尼基焦磷酸合酶(FDPS)]的 23 个候选基因具有显著差异。异戊烯二磷酸和二甲烯基焦磷酸经由 GPS、GGPS 催化形成单萜、二萜。其中单萜合成路径中,1,8-桉树脑合酶(TPS-Cin)在桉叶油醇生物合成中起到重要作用,本次测序共检测到 10 个候选基因,其中 9 个在樟脑型中高表达。在樟脑合成路径中发现 2

个在樟脑型黄花蒿中高表达的冰片脱氢酶候选基因,并且在蒿酮拟合成路径[17]中发现 3 个蒿酮型黄花蒿中高表达的 ADH2 候选基因。赤霉素合成路径中共注释到 6 个关键酶[内根-古巴焦磷酸合成酶(CPS)、贝壳杉烯 C19 氧化酶(GA3)、赤霉素双加氧酶(GA20OX)、赤霉素 3-β-双氧酶(GA3OX)、香叶基芳樟醇合酶(TPS04)、三甲基十三烷四烯合酶(CYP82G1)]的 11 个候选基因在樟脑型黄花蒿中高表达,见图 8。



注:AK-T. 蒿酮型;C-T. 樟脑型;DXS. 1-脱氧-*D*-木酮糖-5-磷酸合成酶;HDR. 4-羟基-2-甲基-2-*E*-丁烯基-4-焦磷酸还原酶;IPPI. 异戊烯基焦磷酸异构酶;GPS. 异戊烯基转移酶牻牛儿基焦磷酸合酶;GGPS. 牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸合成酶;AACT. 乙酰辅酶 A 酰基转移酶;HMGR. 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶;MK. 甲羟戊酸激酶;PMK. 甲羟戊酸激酶;MPDC. 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶;FDPS. 法尼基焦磷酸合酶;CPS. 内根-古巴焦磷酸合成酶;GA3. 贝壳杉烯 C19 氧化酶;GA20OX. 赤霉素双加氧酶;GA3OX. 赤霉素 3-β-双氧酶;TPS04. 香叶基芳樟醇合酶;

CYP82G1. 三甲基十三烷四烯合酶;ADH2. 黄花蒿醇脱氢酶 2;TPS-Cin. 1,8-桉树脑合酶

图 8　2 种化学型黄花蒿挥发性成分相关萜类合成通路基因表达

Fig. 8　Gene expression of terpenoid synthesis pathway related to volatile components of 2 chemical types of *Artemisia annua*

4　讨论

同种药用植物以化学型分型,影响分型的代谢物差异明显,可能对其药效产生影响,从而影响药材品质。李洪梅等[18]在探究不同化学型樟挥发油对大鼠足跖关节炎症模型的影响实验中发现异樟挥发油对大鼠关节肿胀抑制率高于脑樟和龙脑樟挥发油,脑樟挥发油对细胞因子白介素-6(IL-6)的生成抑制明显高于龙脑樟和异樟挥发油,不同化学型樟挥发油缓解关节炎症的效果和作用机制均存在差异。Montero-Villegas 等[19]发现 Tagetenone 型 *Lippia alba* 挥发油可通过阻滞细胞周期和诱导细胞凋亡的方式选择性地抑制人肝癌细胞和人肺腺癌细胞增殖,并且降低 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶活性和抑制胆固醇生成。Acimovic 等[20]根据黄花蒿挥发油组分将其分为 4 种化学型:蒿酮+蒿醇型、蒿酮型、樟脑型、非特异性化学型。以樟脑(44%)、大牛儿烯 D(16%)为主的黄花蒿挥发油对希拉肠球菌和 2 种真菌的生长均有显著抑制作用[21]。而以蒿酮(30.7%)、樟脑(15.8%)为主的黄花蒿挥发油具有良好的抗氧化能力,并对流感嗜血杆菌、粪链球菌、肺炎链球菌、克鲁斯氏念珠菌有较好的抑制作用[22]。因此,药用植物通过化学型分型并对其形成机制研究的深入对药材的品质评价具有重要的影响意义。

根据 HS-GC-QQQ-MS/MS 分析结果,来源于 2 个地区黄花蒿种子在同一环境下种植生长可分为 2 种化学型,JXAa 为蒿酮型,HZAa 为樟脑型。在单萜合成路径中发现 2 个冰片脱氢酶候选基因在樟脑型黄花蒿中显著高表达,而在蒿酮型黄花蒿中表达量极低,冰片脱氢酶候选基因的高表达可能是形成樟脑型黄花蒿的主要原因。蒿酮的生物合成路径尚未完全解析,目前已知其可能通过 MEP 和 MVA 萜类骨架生成 2 分子二甲基丙烯焦磷酸酯(DMAPP),但并没有遵循经典的异戊二烯规则生成单萜前体牻牛儿基焦磷酸,而是生成菊酰基焦磷酸[23-25],其最后一步蒿醇推测是通过 ADH2 氧化生成蒿酮[26]。本次转录组数据中共发现 3 个在蒿酮型黄花蒿中高表达的 ADH2 候选基因,这可能促进蒿酮型黄花蒿中蒿酮的积累。

此外,UFLC-Triple TOF-MS/MS 代谢组数据和转录组数据中发现二萜代谢途径赤霉素合成通路中的化合物与其合成酶基因均在樟脑型黄花蒿中显著上调。赤霉素是植物体内一类极为重要的激素,影响植物的生长、发育和次生代谢产物的生物合成并且受到环境因子的调控[27-30]。已有文献报道紫外线 B 照射和植物激素赤霉素协同促进了黄花蒿中青蒿素的积累[31],因此推测赤霉素对黄花蒿不同化学型的形成可能会有影响。

中国科学家屠呦呦从黄花蒿中提取青蒿素,拯救了全球数百万人的生命,这是中医药献给世界的一份礼物[32]。然而,黄花蒿还含有丰富的挥发油,具有良好的抗菌、抗炎、抗病毒作用[9]。热毒宁注射液在临床主治由上呼吸道感染(外感风热证)所致的高热、微恶风寒、头身痛、咳嗽、痰黄等症[33-34],原料药中的青蒿药材来源于江苏盱眙青蒿基地,制剂中青蒿药材的质控以蒿酮为主[11]。本研究综合 HS-GC-QQQ-MS/MS、UFLC-Triple TOF-MS/MS 和转录组数据,分析了黄花蒿 2 种化学型挥发性成分相关的萜类代谢物及其相关基因表达差异,以及推测其形成原因,为揭示黄花蒿化学型形成机制提供了初步的实验基础,有关黄花蒿化学型产生的生物学机制有待深入研究。

参考文献:

[1] ROVESTI P. Essential oils of some chemotypes of aromatic Eritrean labiates[J]. Pharm Weekbl, 1957, 92(23): 843-845.

[2] 智亚楠,陈月华,马宇明,等. 河南省黄花蒿挥发油的组分分析及抑菌作用测定[J]. 河南农业科学,2016, 45(12): 105-109.
ZHI YN, CHEN YH, MA YM, et al. The chemical constituents and antifungal activity of essential oil from *Artemisia annua* linn in Henan Province[J]. J Henan Agric Sci, 2016, 45(12): 105-109.

[3] SANTOMAURO F, DONATO R, PINI G, et al. Liquid and vapor-phase activity of *Artemisia annua* essential oil against pathogenic *Malassezia* spp[J]. Planta Med, 2018, 84(3): 160-167.

[4] BILIA AR, SANTOMAURO F, SACCO C, et al. Essential oil of *Artemisia annua* L.: An extraordinary component with numerous antimicrobial properties[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 159819.

[5] 赖镇源. 青蒿挥发油抗痤疮病原体及解热作用的实验研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2005.
LAI ZY. The experimental study of anti-acne pathogeny and defervescence of *Artemisia* naphtha[D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2005.

[6] RASHID S, RATHER MA, SHAH WA, et al. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd[J]. Food Chem, 2013, 138(1): 693-700.

[7] SOKTOEVA TE, RYZHOVA GL, DYCHKO KA, et al. Artemisi-

nin content in *Artemisia annua* L. extracts obtained by different methods[J]. Russ J Bioorg Chem, 2013, 39(7): 761-764.

[8] ZHIGZHITZHAPOVA SV, DYLENOVA EP, GULYAEV SM, et al. Composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia annua* L[J]. Nat Prod Res, 2020, 34(18): 2668-2671.

[9] FENG XC, CAO SJ, QIU F, et al. Traditional application and modern pharmacological research of *Artemisia annua* L[J]. Pharmacol Ther, 2020, 216: 107650.

[10] 张小波,赵宇平,黄晓巍,等. 青蒿道地药材研究综述[J]. 中国中药杂志,2016,41(11): 2015-2018.
ZHANG XB, ZHAO YP, HUANG XW, et al. Review on study of Dao-di herbs *Artemisiae Annuae* Herba[J]. China J Chin Mater Med, 2016, 41(11): 2015-2018.

[11] 朱亚莹. 热毒宁注射液原料药青蒿的品质评价研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
ZHU YY. Study on quality evaluation of artemisiae annuae herba, the raw material of reduning injection[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2020.

[12] TSUGAWA H, CAJKA T, KIND T, et al. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis[J]. Nat Methods, 2015, 12(6): 523-526.

[13] PANG ZQ, CHONG J, ZHOU GY, et al. MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(W1): W388-W396.

[14] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, et al. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. Mol Plant, 2020, 13(8): 1194-1202.

[15] SHEN Q, ZHANG LD, LIAO ZH, et al. The genome of *Artemisia annua* provides insight into the evolution of Asteraceae family and artemisinin biosynthesis[J]. Mol Plant, 2018, 11(6): 776-788.

[16] LOVE MI, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2[J]. Genome Biol, 2014, 15(12): 550.

[17] UMLAUF D, ZAPP J, BECKER H, et al. Biosynthesis of the irregular monoterpene *Artemisia* ketone, the sesquiterpene germacrene D and other isoprenoids in *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae)[J]. Phytochemistry, 2004, 65(17): 2463-2470.

[18] 李洪梅, 黄璐琦, 周爱香, 等. 不同化学型樟对大鼠佐剂性关节炎模型的影响[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(24): 3251-3254.
LI HM, HUANG LQ, ZHOU AX, et al. Study on antiinflammatory effect of different chemotype of *Cinnamomum camphora* on rat arthritis model induced by Freund's adjuvant[J]. China J Chin Mater Med, 2009, 34(24): 3251-3254.

[19] MONTERO-VILLEGAS S, CRESPO R, RODENAK-KLADNIEW B, et al. Cytotoxic effects of essential oils from four *Lippia alba* chemotypes in human liver and lung cancer cell lines[J]. J Essent Oil Res, 2018, 30(3): 167-181.

[20] ACIMOVICM, JEREMICJS, TODOSIJEVIC M, et al. Comparative study of the essential oil and hydrosol composition of sweet wormwood (*Artemisia annua* L.) from Serbia[J]. Chem Biodivers, 2022, 19(3): e202100954.

[21] JUTEAU F, MASOTTI V, BESSIERE JM, et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia* annua essential oil[J]. Fitoterapia, 2002, 73(6): 532-535.

[22] CAVAR S, MAKSIMOVIC M, VIDIC D, et al. Chemical composition and antioxidant and antimicrobial activity of essential oil of *Artemisia* annua L. from Bosnia[J]. Ind Crops Prod, 2012, 37(1): 479-485.

[23] SUGA T, SHISHIBORI T, KOTERA K, et al. The biosynthesis of a non-head to tail monoterpene, *Artemisia* ketone[J]. Chem Lett, 1972, 1(7): 533-534.

[24] ALLEN KG, BANTHORPE DV, CHARLWOOD BV, et al. Biosynthesis of *Artemisia* ketone in higher plants[J]. Phytochemistry, 1977, 16(1): 79-83.

[25] 吕宗友. 抑制青蒿素合成竞争支路及水杨酸调控青蒿中青蒿素合成的研究[D]. 上海: 上海交通大学, 2016.
LYU ZY. The study of regulating artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* by branch pathway blocking and salicylic acid[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2016.

[26] POLICHUK DR, ZHANG YS, REED DW, et al. A glandular trichome-specific monoterpene alcohol dehydrogenase from *Artemisia annua*[J]. Phytochemistry, 2010, 71(11/12): 1264-1269.

[27] YAMAGUCHI S. Gibberellin metabolism and its regulation[J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, 59: 225-251.

[28] DAVIERE JM, ACHARD P. Gibberellin signaling in plants[J]. Development, 2013, 140(6): 1147-1151.

[29] COLEBROOK EH, THOMAS SG, PHILLIPS AL, et al. The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress[J]. J Exp Biol, 2014, 217(Pt 1): 67-75.

[30] DU Q, LI CL, LI DQ, et al. Genome-wide analysis, molecular cloning and expression profiling reveal tissue-specifically expressed, feedback-regulated, stress-responsive and alternatively spliced novel genes involved in gibberellin metabolism in *Salvia miltiorrhiza*[J]. BMC Genomics, 2015, 16: 1087.

[31] MA TY, GAO H, ZHANG D, et al. Transcriptome analyses revealed the ultraviolet B irradiation and phytohormone gibberellins coordinately promoted the accumulation of artemisinin in *Artemisia annua* L[J]. Chin Med, 2020, 15: 67.

[32] 张铁军,王于方,刘丹,等. 天然药物化学史话: 青蒿素——中药研究的丰碑[J]. 中草药, 2016, 47(19): 3351-3361.
ZHANG TJ, WANG YF, LIU D, et al. Historical story on natural medicinal chemistry: Artemisinin, a milestone of traditional Chinese medicine study[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(19): 3351-3361.

[33] 彭琼辉,刘琼,刘成高,等. 热毒宁注射液治疗 AECOPD 的疗效及对 TLR4/NF-κB 炎症信号通路的影响[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(12): 1-4, 20.
PENG QH, LIU Q, LIU CG, et al. Clinical effect of Reduning injection in treatment of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease and its effect on the Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B inflammatory signaling pathway[J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2021, 37(12): 1-4, 20.

[34] 罗杰平,黄胜贤,陈丽珍,等. 甘草酸苷联合热毒宁治疗手足口病患儿的临床疗效及对免疫反应的影响[J]. 川北医学院学报,2022,37(1): 35-38.
LUO JP, HUANG SX, CHEN LZ, et al. Clinical efficacy of Reduning combined with glycyrrhizin in the treatment of children with hand-foot-mouth disease and its effect on inflammatory immune reaction[J]. J North Sichuan Med Coll, 2022, 37(1): 35-38.

(编辑:杨巍敏)