

基于代谢组学与蛋白质组学的不同生长年限葛根成分差异性分析

魏平慧^{1,3}, 张欢², 陈凯⁴, 赵剑³, 徐兵⁴, 吴波⁵, 何绍浪⁶, 尚小红⁷, 史琳^{2*}

1. 上饶师范学院体育学院, 江西 上饶 334001
2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁 沈阳 110866
3. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016
4. 上饶师范学院上饶农业技术创新研究院, 江西 上饶 334001
5. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004
6. 江西省红壤及种质资源研究所, 江西 南昌 330046
7. 广西壮族自治区农业科学院 经济作物研究所, 广西 南宁 530007

摘要: **目的** 研究不同生长年限对药食同源植物葛根 *Puerariae lobatae* 的差异性代谢物和蛋白质情况的影响。**方法** 综合运用代谢组学与无标记定量蛋白质组学技术, 对一年生、二年生和三年生葛根样本中代谢物的积累动态及蛋白质的表达谱进行比较分析。**结果** 代谢组分析黄酮类化合物的差异, 一年生和二年生葛根样品鉴定到 236 个显著差异表达代谢物, 其中 205 个表达上调, 31 个表达下调; 二年生和三年生葛根样品显著差异表达代谢物数量减少至 25 个, 其中 14 个上调, 11 个下调; 一年生和三年生葛根样品显著差异代谢物 83 个, 70 个上调, 13 个下调。并对其进行化合物分类、相关性分析及基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析代谢通路富集分析, 获得 5 条显著富集通路。通过蛋白质组分析得到 2 764 个显著差异蛋白 (筛选标准: $FC \geq 1.5$ 或 ≤ 0.67 且 $P < 0.05$), 从 3 个比较组中分别得到上调蛋白 1 565、1 437、193 个; 下调蛋白 931、817、260 个, 并对基因本体 (gene ontology, GO) 功能及 KEGG 代谢通路等进行分析, 这些蛋白显著富集在黄酮类生物合成、丙酮酸代谢及氨基酸生物合成等通路上。**结论** 不同生长年限葛根的差异积累代谢物和差异蛋白主要富集于苯丙素类生物合成、黄酮类生物合成与各种植物次生代谢产物的生物合成途径。葛根黄酮类成分与抗炎、调血脂及降糖等药理活性密切相关, 为葛根的开发利用与生长发育的分子机制提供依据。

关键词: 葛根; 生长年限; 代谢组学; 蛋白质组学; 差异代谢通路; 黄酮类化合物

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)17-6935-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.17.023

Differential analysis of components in *Pueraria lobata* from different growth years based on metabolomics and proteomics

WEI Pinghui^{1, 3}, ZHANG Huan², CHEN Kai⁴, ZHAO Jian³, XU Bing⁴, WU Bo⁵, HE Shaolang⁶, SHANG Xiaohong⁷, SHI Lin²

1. School of Sports, Shangrao Normal College, Shangrao 334001, China
2. College of Food Science, Shenyang Agriculture University, Shenyang 110866, China
3. Department of Pharmacology, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang, 110016, China
4. Shangrao Innovation Institute of Agricultural Technology, Shangrao Normal College, Shangrao 334001, China
5. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China
6. Jiangxi Institute of Red Soil and Germplasm Resources, Nanchang 330046, China
7. Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China

Abstract: Objective To investigate the differential components existing in the roots of *Puerariae lobata*, a plant with both medicinal and edible properties, at growth stages of one-year, biennial and three-year-old. **Methods** By comprehensively applying metabolomics and label-free quantitative proteomics, a comparative analysis was conducted of metabolite accumulation dynamics and protein expression

收稿日期: 2026-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82560743); 江西省农业农村厅现代农业产业技术体系建设专项 (JXARS-16)

作者简介: 魏平慧, 女, 助理研究员/实验师, 研究方向为功能食品研发。E-mail: 17507086686@163.com

*通信作者: 史琳, 女, 副教授, 博士, 硕士生导师, 研究方向为天然药物化学和功能食品研发。E-mail: linnashi@126.com

profiles in samples from different growth years. **Results** Metabolic profiling revealed significant differences in flavonoid composition across developmental stages. Comparative analysis identified 236 significantly differentially accumulated metabolites between one-year-old and two-year-old plants, of which 205 were up-accumulated and 31 down-accumulated; between two-year-old and three-year-old plants, the number decreased markedly to 25 differentially accumulated metabolites (14 up-accumulated, 11 down-accumulated); and between one-year-old and three-year-old plants, 83 differentially accumulated metabolites were detected (70 up-accumulated, 13 down-accumulated). Subsequent compound classification, correlation analysis, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of these metabolites identified five pathways significantly enriched in flavonoid-related metabolism. Parallel proteomic profiling yielded 2 764 significantly differentially expressed proteins ($FC \geq 1.5$ or ≤ 0.67 , $P < 0.05$). Across the three pairwise comparisons, upregulated proteins numbered 1 565, 1 437, and 193, respectively, while downregulated proteins totaled 931, 817, and 260, respectively. Functional annotation via gene ontology (GO) and KEGG pathway analyses further demonstrated significant enrichment of these proteins in biological processes and pathways central to flavonoid biosynthesis, pyruvate metabolism, and amino acid biosynthesis. **Conclusion** Metabolite accumulation and proteomic variations across different growth years of *P. lobata* are predominantly enriched in the biosynthetic pathways of phenylpropanoids, flavonoids, and other plant secondary metabolites. Flavonoid constituents from *P. lobata* are closely associated with pharmacological activities including anti-inflammatory, lipid-regulating and hypoglycemic effects. This study establishes a foundational framework for both the rational development and utilization of *P. lobata* resources and the mechanistic understanding of its growth and developmental regulation at the molecular level.

Key words: *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi; growth ages; metabolomics; proteomics; differential metabolic pathways; flavonoids

葛根 *Puerariae lobatae Radix* 为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根, 在传统中药中常称为“野葛”^[1]。该药材最早收录于《神农本草经》, 素有“北参南葛”之称, 体现出其重要药用地位。作为国家卫生部认定的药食同源品种, 葛根药性凉、味甘, 功能主要包括解肌退热、生津止渴、透发疹毒、升阳止泻、通经活络及解酒毒等^[2]。植物化学研究表明, 葛根的化学成分丰富多样, 迄今已阐明包括异黄酮类、三萜类、多糖类、生物碱类及香豆素类等。这些活性成分赋予葛根广泛的药理作用^[3], 具体体现在调节血糖与血脂^[4]、抗氧化^[5]、保护肝脏^[6]、抑制肿瘤细胞增殖^[7]、改善心脏功能^[8]、抗炎^[9]、保护神经^[10]、促进酒精代谢^[11]以及预防绝经后骨质疏松^[12]等多个方面。

有研究表明, 葛根中葛根素、大豆苷等核心异黄酮类活性成分的积累与其生长年限呈显著正相关, 生长年限越长药用价值越高^[13-14]。然而, 葛根采收年限从 1 年到 5 年不等, 存在严重的年限混乱问题。部分药农为追求短期产量提前至 1 年生采收, 造成葛根素含量不足, 无法达到《中国药典》2025 年版规定的 $\geq 0.24\%$ 的标准; 若盲目延长采收期至 4~5 年, 不仅增加了土地占用、水肥管理和病虫害防治成本, 还会导致根系木质化程度升高, 淀粉含量下降, 食用品质严重劣化。因此, 科学确定葛根的最佳采收期是平衡产量、品质与经济效益的关键, 也是制约其产业规范化、标准化发展的核心问题。

目前关于不同生长年限葛根的研究多集中于

单一指标(如葛根素)的含量测定, 缺乏系统的全代谢组分析, 更未从蛋白质组层面揭示其成分差异的分子调控机制, 无法为最佳采收期的确定提供全面的科学依据。近年来, 植物蛋白质组学与代谢组学的发展为深入解析植物生命过程提供了新的研究策略和技术支撑。在物种层面系统解析特定次生代谢物的分布模式及其与食用功效的关联, 对于高效发掘与利用功能性食品资源具有重要意义^[15]。本研究采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱(UPLC/Q-TOF-MS)技术, 结合非靶向代谢组学与蛋白质组学分析策略, 系统探究了一年生、二年生和三年生葛根在不同生长阶段的代谢物动态变化与蛋白质表达谱。通过整合多组学数据, 确定葛根在生长发育过程中形态变化的关键调控途径, 旨在为科学确定葛根的最佳采收期提供理论依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

Vanquish 超高效液相色谱仪、Orbitrap Exploris 120 质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司); nanoElute2 超高效液相色谱、timsTOF Pro2 质谱仪(德国布鲁克公司); LGJ-10C 型真空冷冻干燥机(北京四环弗瑞科技发展有限公司); Heraeus Fresco17 型离心机(美国赛默飞世尔科技公司); PS-60AL 型超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司); JXFSTPRP-24 型匀浆机(上海净信科技有限公司)。

乙腈、甲醇、乙酸、甲酸和异丙醇均为色谱纯(美国 Sigma-Aldrich 化学公司)。

1.2 样品

收集了葛根样本,包括 6 株一年生根(标记为 GA_1~GA_6)、6 株二年生根(标记为 GB_1~GB_6)和 6 株三年生根(标记为 GC_1~GC_6)。这些样本是上饶市以琳生态农业有限公司采自中国江西省上饶市玉山县四股桥乡竹笕村(28.45° N, 118.10° E),由江西中医药大学吴波副教授鉴定为一年生、二年生和三年生野葛 *P. lobate* (Willd.) Ohwi 植物的根。每个生长阶段进行了 3 次生物学重复,在此期间收集植物材料,每次有 2 个技术重复,共得到 18 个样本集。每个样本集收集 3 g,立即置于干冰中速冻,并在-80 °C 下保存。

2 方法

2.1 代谢物提取

样品通过真空冷冻干燥机进行冷冻干燥,随后被粉碎成粉末(30 s, 60 Hz)。精确称取每个样品 25 mg,置于 1 mL 预先在-40 °C 冷却的提取液中(甲醇:乙腈:水=2:2:1)。样品在 35 Hz 下用自动研磨机研磨 4 min,冷却至室温后,混合物在冰水浴中进行低温超声处理(40 kHz),持续 15 min,然后在-40 °C 下保存 1 h。随后,将悬浮液在 4 °C 下以 12 000 r/min 的速度离心 15 min。小心收集上清液,并用适当的溶剂稀释 2~100 倍。加入 10 μ L 内标溶液(100 μ g/mL),然后通过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤。过滤后的样品随后进行仪器分析。将所有样品的上清液等量混合,制备用于仪器测试的质量控制样品。

2.2 基于 UPLC-ESI-Q TRAP-MS/MS 的非靶向代谢分析

采用 Phenomenex Kinetex C₁₈ 色谱柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6 μ m)进行样品分离,流动相为含 0.01% 乙酸的水(A 相)和乙腈-异丙醇(1:1, B 相)。梯度洗脱(0~0.5 min, 0~1.0% B; 0.5~3.5 min, 1.0%~99.0% B; 3.5~4.0 min, 99.0% B; 4.0~4.05 min, 99.0%~1.0% B; 4.05~5.5 min, 1.0% B, 进样量 2 μ L, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 40 °C。

使用 Orbitrap Exploris 120 质谱仪配备电喷雾离子源(ESI)在正负离子模式下采集一级和二级质谱数据。鞘气体积流量 50 arb;辅助气流体积流量 15 arb;毛细管温度 320 °C;全扫描分辨率 60 000;二级质谱分辨率 15 000;碰撞能量为 SNCE 20/30/40;喷雾电压分别为 3 800 V(ESI⁺)和 3 400 V(ESI⁻)。每分析 6 个样本后收集 1 组 QC 样本数

据,以验证数据的重复性。为提升峰强度数据的精度与可靠性,本研究实施了以下精细化处理步骤:低质量峰过滤、缺失值填补、数据归一化、对 QC 样本的相对标准偏差进行评估以及数据转换^[16]。采用 Q-Exactive 质谱仪在全扫描和 MS²模式下实现定量分析。

在 ProteoWizard 软件将原始数据转换为 mzXML 格式后,利用共同开发的 R 包进行代谢物鉴定。用于此过程的数据库包括 BiotreeDB (V3.0, 标准产品库)和 BT-Plant (V1.1, 植物特异性库)。随后,利用独立开发的 R 包进行可视化分析。

2.3 多变量数据分析及 KEGG 富集分析

代谢组学数据集通过 Metware 云平台(<https://cloud.metware.cn/#/user/login>)利用已建立的代谢物分析流程进行多变量统计分析。采用相对峰强度进行主成分分析(principal component analysis, PCA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),以对各组进行排序和区分。每个组别进行了 6 次生物学重复,每次重复进一步进行 3 次技术分析,以最小化测量误差。在 OPLS-DA 中,获得了第一主成分的投影重要性变量值(variable importance projection, VIP)。此外,利用京都基因与基因组百科全书(KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>)和 Metabo-Analyst(<http://www.metaboanalyst.ca/>)等商业数据库进行通路富集分析。

2.4 蛋白质提取

将 1.5 g 的冷冻样品加入振荡管中,加入蛋白质裂解液(6 mol/L 盐酸胍+10 g/L SDS, 含蛋白酶抑制剂)。研磨仪均质 3 次,每次 40 s。在 4 °C 下反应 30 min,每 5 min 摇晃 1 次。裂解后在 4 °C, 12 000 $\times$ g 条件下离心 30 min,收集上清液,采用 BCA 法测定蛋白含量^[17]。

2.5 蛋白质酶解标记

向 40 μ g 蛋白质中加入 5 倍体积的丙酮,在-40 °C 静置 4 h。4 °C、12 000 $\times$ g 离心 20 min,去除上清液后,加入 30 μ L 裂解缓冲液以溶解沉淀。加入 20 μ L 碘乙酰胺后充分混合。在 95 °C、1 000 r/min 下孵育 5 min。让样品冷却至室温后,加入 15 μ L 胰蛋白酶并充分混合。在 1 000 r/min 和 37 °C 的条件下进行酶促水解 2 h。酶促水解完成后,加入 55 μ L 甲酸并充分混合以终止反应。将每个样品加入脱盐柱后,利用正压确保样品完全通过柱子。通过洗脱获得的组

分保存在 -80°C 下,用于蛋白质组学分析。

2.6 Nano-LC MS/MS 蛋白质分析

采用纳升超高效液相色谱(nanoElute2)连接至 timsTOF Pro2, 配备纳电喷雾离子源, 对每个样本的 200 ng 总肽段进行分离和分析。分离过程使用反相色谱柱(PeP Sep C₁₈, 150 $\mu\text{m}\times 15\text{ cm}$, 1.9 μm)。流动相为含 0.1% 甲酸的水(A 相)和含 0.1% 甲酸的乙腈(B 相), 梯度洗脱条件: 0~90 min, 2%~25% B; 90~95 min, 25%~35% B; 95~100 min, 35%~80% B。质谱仪的扫描范围为 m/z 475~1 000, 采用 DIA-PASEF 模式获取 DIA 数据。在 PASEF MS/MS 扫描过程中, 碰撞能量随离子迁移率线性增加, 从 27 eV ($1/K_0=0.85\text{ Vs/cm}^2$) 增加到 45 eV ($1/K_0=1.3\text{ Vs/cm}^2$)。

2.7 蛋白质鉴定

质谱数据通过 Proteome DiscovererTM 2.4 软件进行解析, 检索数据库选用 UniProt。在肽段鉴定过程中, 采用严格的质量控制标准, 将错误发现率(false discovery rate, FDR) 阈值设定为 ≤ 0.01 , 以确保鉴定结果的可靠性。

2.8 数据处理

采用 Spectronaut 软件(19.0.240604.62635 版)及其内置的 Pulsar 搜索引擎处理原始质谱文件。将质谱峰列表与物种水平的 UniProt FASTA 数据库(uniprot-Phaseoleae-163735-2023.04.12.fasta)进行比对, 其中乙酰化和羧甲基化[C]作为可变修饰, 氧化(M)作为固定修饰。胰蛋白酶作为蛋白酶。允许最多 2 个漏切位点。肽段和蛋白质水平的 FDR 均设置为 0.01。肽段鉴定的碎片质量偏差为 2×10^{-5} , 前体离子质量偏差最高为 2×10^{-5} 。其他所有设置均保留默认值。

采用单因素方差分析进行多重比较(GraphPad Prism 5.03 版), 并利用 SPSS 22.0 软件分析显著性差异。 $P<0.05$ 、0.01 水平被认为具有统计学意义。

2.9 多组学关联分析

为系统整合代谢组与蛋白质组数据, 揭示差异代谢物与差异表达蛋白之间的潜在调控关系, 本研究采用以下方法进行关联分析。将显著差异代谢物($VIP>1$, $P<0.05$)和显著差异蛋白($FC\geq 1.5$ 或 ≤ 0.67 , $P\leq 0.05$)分别映射至 KEGG 数据库, 提取各自富集的代谢通路($P<0.05$), 并取交集识别共同显著富集的通路。选取共同富集通路(如黄酮类生物合成、丙酮酸代谢等)中的差异代谢物与差异蛋白, 计算其在所有样本中的 Spearman 秩相关系数(ρ)。以 $|\rho|>0.7$

且 $P<0.05$ 为阈值, 筛选强相关对。利用 Cytoscape 软件(v3.9.1)构建“酶-代谢物”相关性网络图。

3 结果与分析

3.1 代谢组分析

通过对一年生(GA)、二年生(GB)、三年生(GC)葛根样品, 两两生长阶段比较组(GA vs GB, GB vs GC、GA vs GC)进行代谢组测试, 在 ESI⁺和 ESI⁻模式下共获得 1 571 个代谢物。

PCA 结果如图 1 所示, 3 个生长年限的葛根样本呈现明显的分离趋势: 第 1 主成分(PC1)解释了总变异的 40.2%, 主要区分一年生与二、三年生葛根; 第 2 主成分(PC2)解释了 9.6%, 主要反映组内生物学变异。所有 18 个样本均落在 95% Hotelling's T^2 置信区间内, 无离群样本。其中 GA 组有 1 个样本因正常生物学变异与组内其他样本稍分散, 但仍在置信区间范围内。同组内的生物学重复整体聚类紧密, 组间距离显著大于组内距离, 表明实验重复性良好, 不同生长年限葛根的代谢谱存在本质差异, 后续差异分析结果可靠。

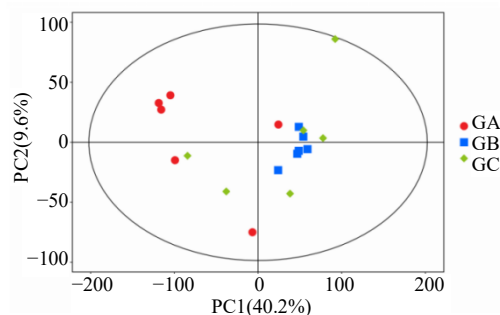


图 1 样本的 PCA 图

Fig. 1 PCA score plot of samples

根据 $VIP>1$, $P<0.05$ 条件筛选差异代谢物(合并正负离子模式鉴定结果), 其数量在不同生长阶段转换中呈现出先下降后上升的趋势。如图 2 所示, 早期生长阶段对比(GA vs GB), 共鉴定到 236 个显著差异代谢物, 其中 205 个代谢物表达水平上调, 31 个代谢物表达水平下调。中后期生长阶段对比(GB vs GC), 差异代谢物数量显著下降至 25 个, 其中 14 个上调, 11 个下调。而早期与成熟期直接对比(GA vs GC), 差异代谢物数量为 83 个, 其中上调 70 个, 下调 13 个。

对主要差异代谢物黄酮类物质丰度前 30 的代谢物进行相关性分析, 结果显示不同代谢物之间正(负)相关系数的绝对值在 0.189 1~1.000 0, 如(+)-儿茶素与异芒柄花素、刺芒柄花素与二氢大豆苷元,

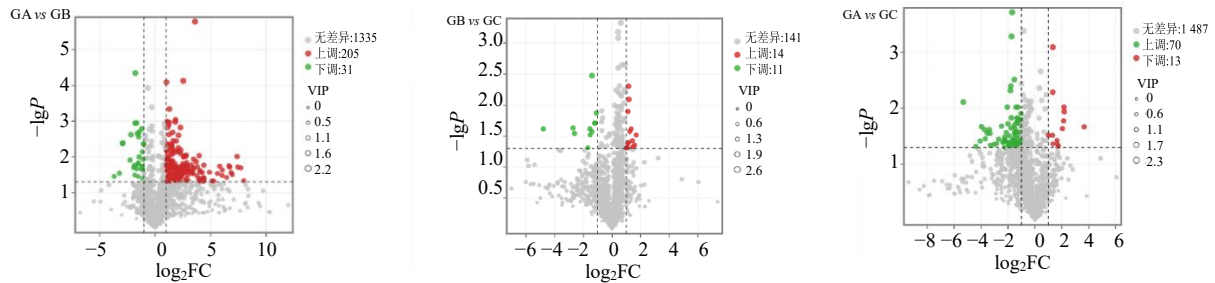


图2 一年生、二年生和三年生葛根两两比较的代谢物差异火山图

Fig. 2 Volcano plots of differential metabolites from pairwise comparisons of one-year-old, two-year-old, and three-year-old *P. lobata*

提示这些化合物可能在黄酮类生物合成通路中处于相邻或协同调节的代谢分支,受共同的上游酶或转录因子调控。此外,大豆苷与染料木苷之间也表现出显著正相关,暗示二者在葛根生长发育过程中可能同步积累。另一方面,部分代谢物对呈现负相关性(如黄豆黄苷与芹菜素,相关系数 <-0.6),推测它们可能竞争共同的前体底物,或分属于不同的黄酮亚类(异黄酮与黄酮)且存在代谢流的竞争性

分配。上述相关性模式为进一步解析葛根中黄酮类成分的共合成机制及关键调控节点提供了线索。

根据 OPLS-DA 得到的 VIP 值,选取 VIP 值排名前 30 的差异代谢物进行的表达量及 VIP 值分析,不同生长年限组间黄酮类代谢物表达量较为一致,随着生长年限的增长,17 个差异代谢物的表达上调,13 个差异代谢物的表达量下调(图3)。

葛根 GB 组 15 个黄酮类差异代谢物的表达量高

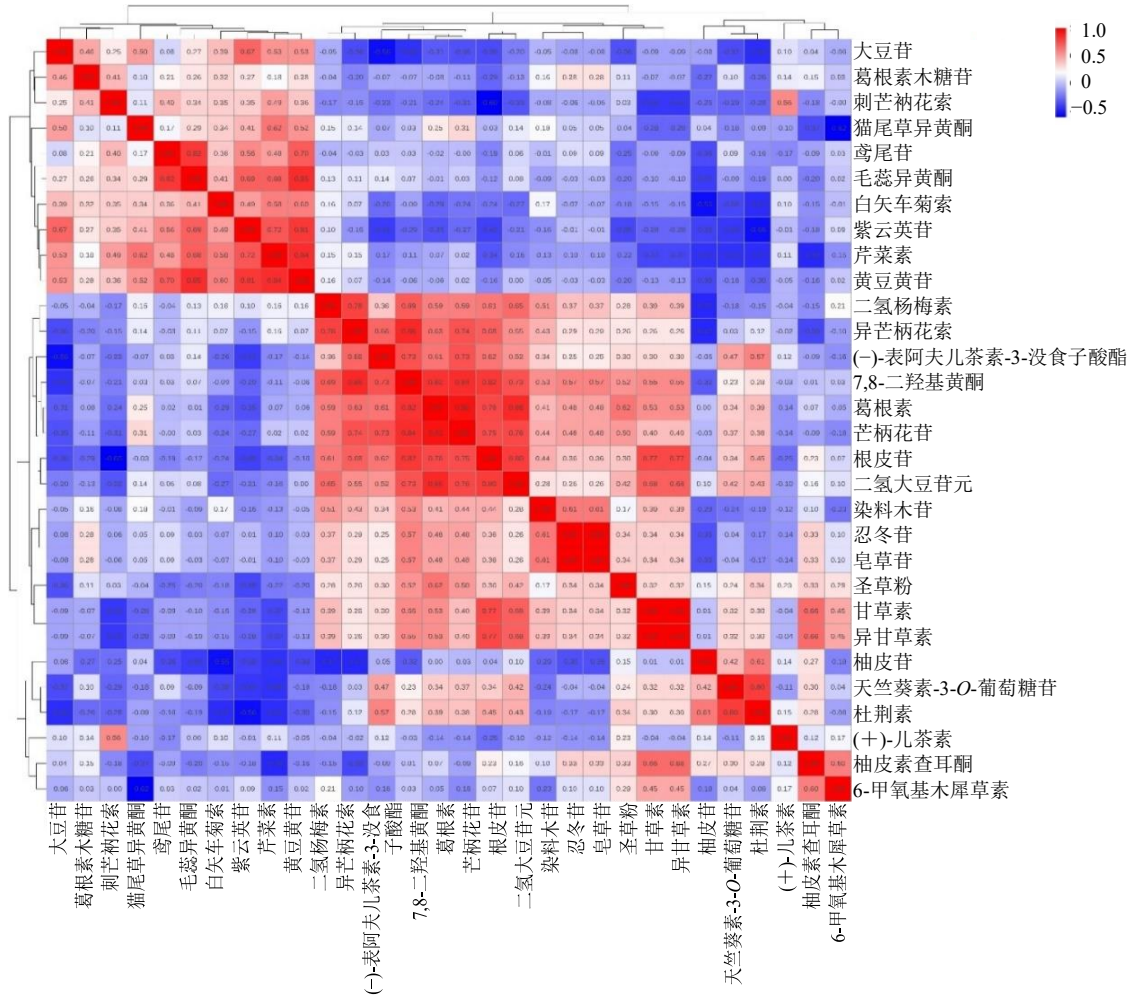


图3 黄酮类代谢物相关性 heatmap

Fig. 3 Heatmap of metabolite correlation of different flavonoid metabolites

于 GA 组, 15 个黄酮类差异代谢物的表达量低于 GA 组 (图 4-A), 上调代谢物异芒柄花素、7,8-二羟基黄酮、(+)-儿茶素、刺芒柄花素、二氢大豆苷元组间差

异较大, 下调代谢物黄豆黄苷、染料木苷、芹菜素、猫尾草异黄酮、芒柄花苷组间差异较大 (图 4-B)。

葛根 GC 组 16 个黄酮类差异代谢物的表达量高

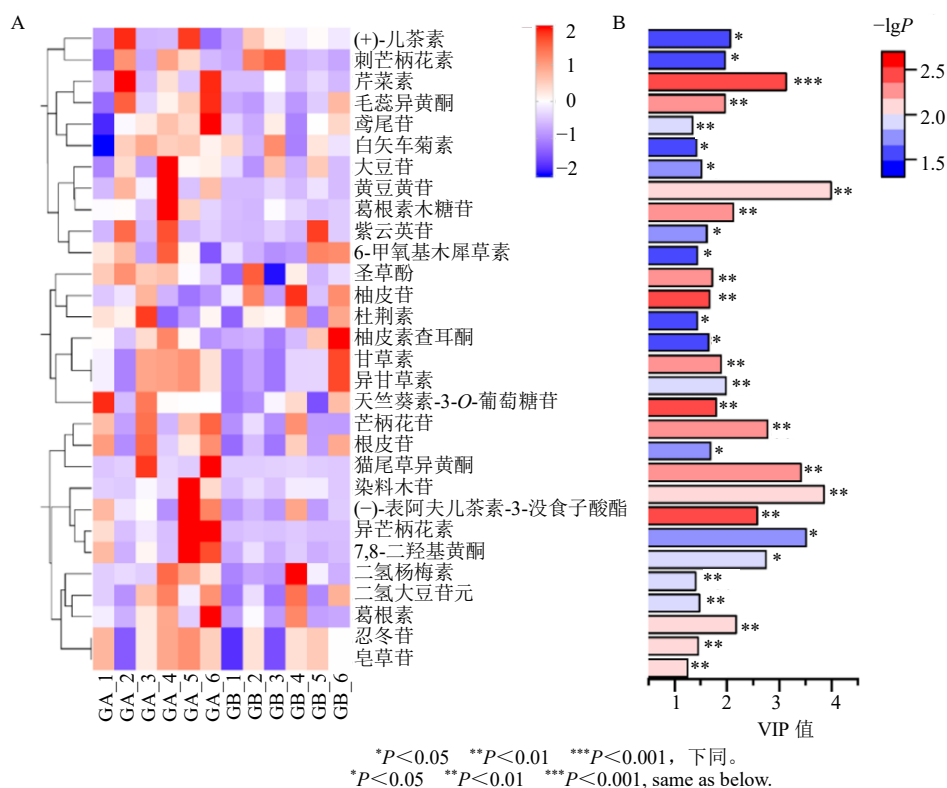


图 4 葛根 GA 和 GB 组黄酮类代谢物的表达谱 (A) 和 VIP 值 (B)

Fig. 4 Expression profiles (A) and VIP values (B) of flavonoid metabolites in GA and GB groups of *P. lobata*

于 GB 组, 14 个黄酮类差异代谢物的表达量低于 GB 组 (图 5-A), 上调代谢物鸢尾苷、染料木苷、杜荆素、紫元英苷、刺芒柄花素组间差异较大, 下调代谢物二氢杨梅素、异芒柄花素、芒柄花苷、(-)-表阿夫儿茶素-3-没食子酸酯、二氢大豆苷元组间差异较大 (图 5-B)。葛根 GC 组 22 个黄酮类差异代谢物的表达量高于 GA 组, 8 个黄酮类差异代谢物的表达量低于 GA 组 (图 6-A), 上调代谢物猫尾草异黄酮、芹菜素、黄豆黄苷、鸢尾苷、大豆苷、杜荆素、染料木苷、甘草素、异甘草素、葛根素组间差异较大, 下调代谢物天竺葵素-3-O-葡萄糖苷、柚皮素查耳酮、柚皮苷、葛根素木糖苷组间差异较大 (图 6-B)。

胡心怡^[18]提出葛根素可能的生物合成通路。在该通路中, 共标注了 6 种相关代谢物, 分别为葛根素、大豆苷元、大豆苷、异甘草素、甘草素和 *L*-苯丙氨酸^[19]。本研究中, 下游代谢物 (葛根素和大豆苷) 的差异在二年生、三年生的样本中更加明显, 而上游代谢物 (甘草素) 的差异在一年的样本中更加明显, 但是上游代谢物 (异甘草素和 *L*-苯丙氨酸) 在不同年限无显著差异。

通过对所有显著差异代谢物进行了 KEGG 通路富集 ($P < 0.05$), 其中富集程度最高、最具代表性的前 5 条核心通路分别为: 苯丙素类生物合成、黄酮类生物合成、次生代谢产物的生物合成、氨基酸的生物合成以及 ABC 转运蛋白 (图 7)。对这些核心通路进行解析, 可以发现它们共同构成了一个支撑葛根生长发育与品质形成的核心代谢网络“黄酮类生物合成”通路的显著富集, 并与 K-Means 分析中“持续积累型”代谢物簇高度关联, 直接证明了葛根主要药用活性成分——黄酮类物质在生长发育过程中的高效合成与累积, 是决定其药材品质的关键^[19-20]。

3.2 总蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分析

经 SDS-PAGE 分析, 提取蛋白质量良好。如图 8 所示, 各组样品蛋白条带完整清晰, 无缺失片段, 且重复性稳定。相对分子质量分布集中于 15 000~25 000。综上, GA、GB 及 GC 组蛋白符合蛋白质组检测标准, 可继续后续实验。

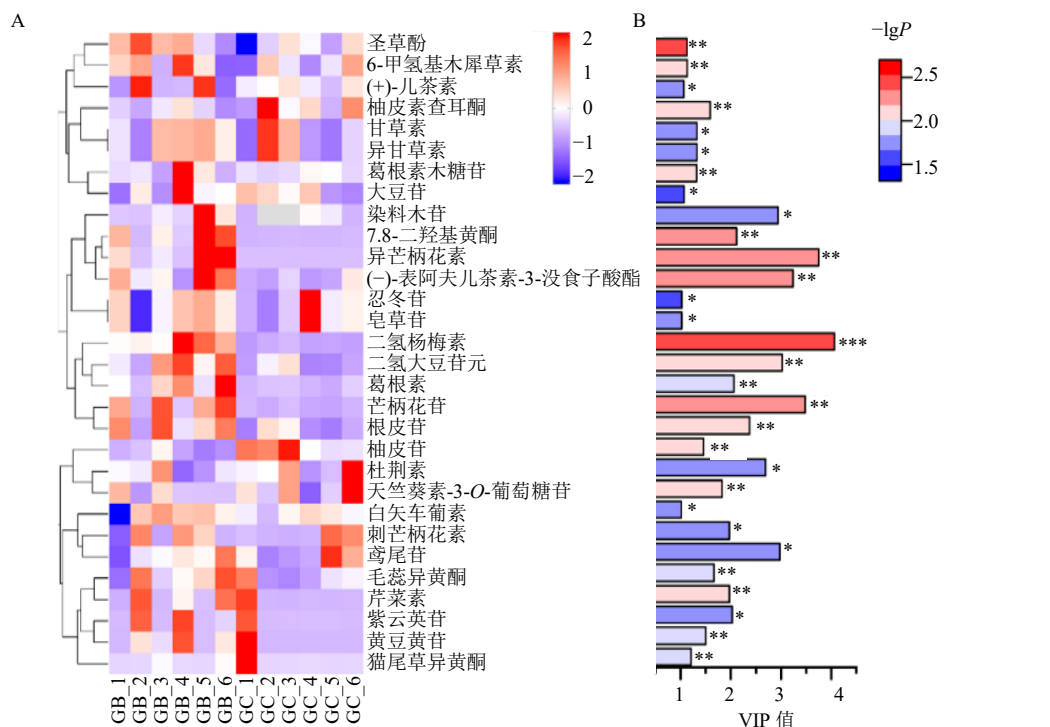


图 5 葛根 GB 和 GC 组黄酮类代谢物的表达谱 (A) 和 VIP 值 (B)

Fig. 5 Expression profiles (A) and VIP values (B) of flavonoid metabolites in GB and GC groups of *P. lobata*

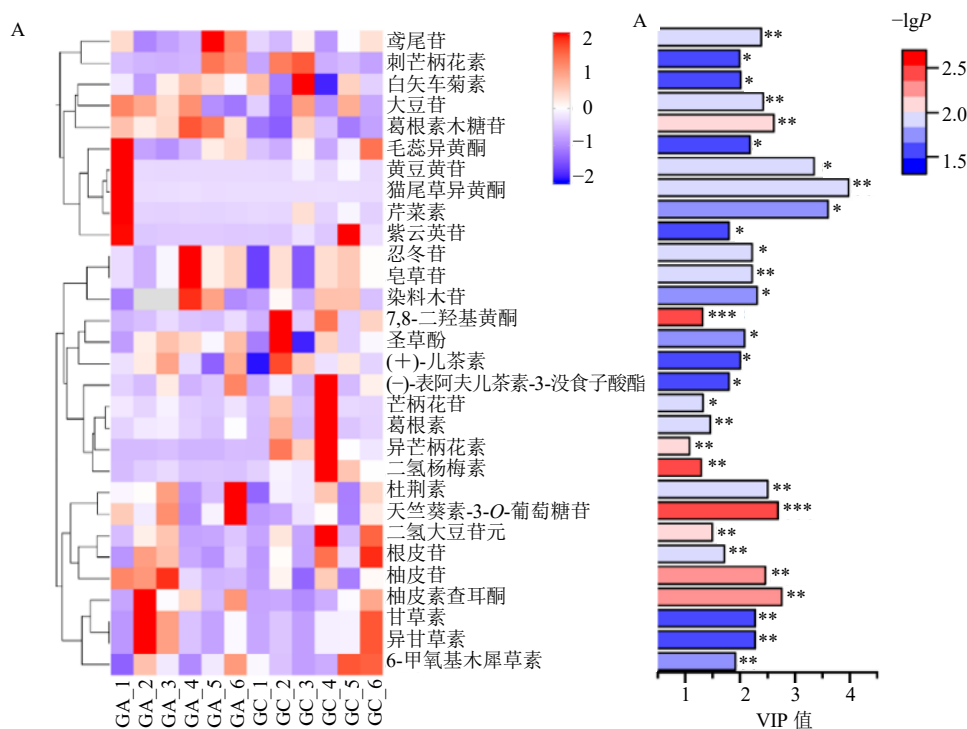


图 6 葛根 GA 和 GC 组黄酮类代谢物的表达谱 (A) 和 VIP 值 (B)

Fig. 6 Expression profiles (A) and VIP values (B) of flavonoid metabolites in GA and GC groups of *P. lobata*

3.3 全蛋白相关性分析和主成分分析

原始 DIA 数据使用 Spectronaut X 软件, 以

UniProt 葛根数据库为参考数据库进行搜库与定量分析 (图 9)。为保障数据质量, 进行了严格的数据

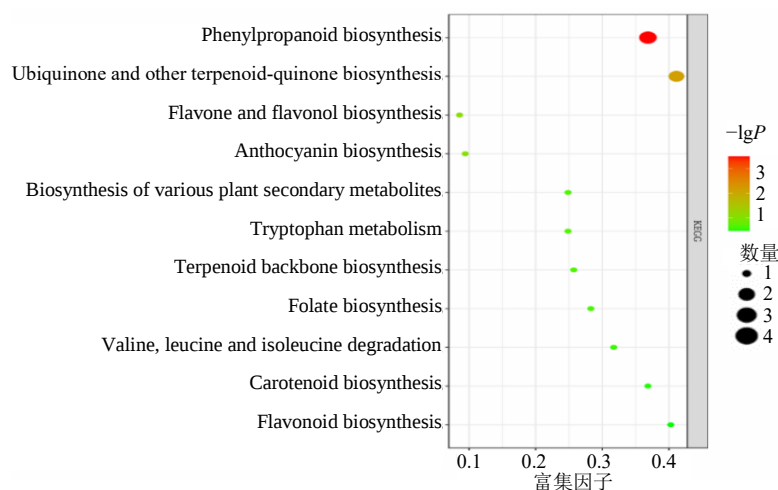
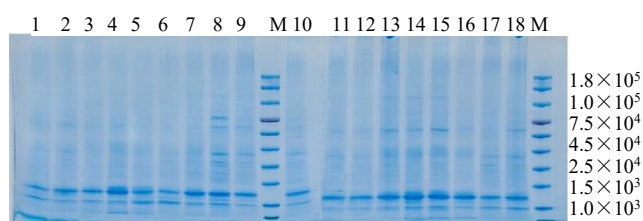


图 7 GA、GB 和 GC 组共同差异代谢物的 KEGG 富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment for differential metabolites in GA, GB and GC groups



M-Marker, 1~6-GA_1~GA_6, 7~12 和 13~18 分别代表 GB_1~GB_6 和 GC_1~GC_6。

M-Marker, 1~6-GA_1~GA_6, 7~12-GB_1~GB_6, 13~18-GC_1~GC_6。

图 8 GA、GB 和 GC 组 SDS-PAGE 图像

Fig. 8 SDS-PAGE image of GA, GB and GC groups

预处理：仅保留唯一肽段数 ≥ 1 的蛋白质进行后续分析；对原始数据中的缺失值，采用最小值二分之一法进行填补。经过预处理，共鉴定到 6 831 个可信度的蛋白质，并全部用于相对定量分析。

3.4 差异蛋白分析

为探究不同生长阶段葛根蛋白质组的动态变化，筛选 3 个生长阶段间具有显著差异表达的蛋白质。使用不同的数据库对蛋白进行注释，共鉴定到 2 764 个差异表达蛋白，表明葛根在生长发育过程中发生了广泛的蛋白质组重编程。差异倍数 (fold change, FC) 作为筛选标准， P 值作为显著性指标。

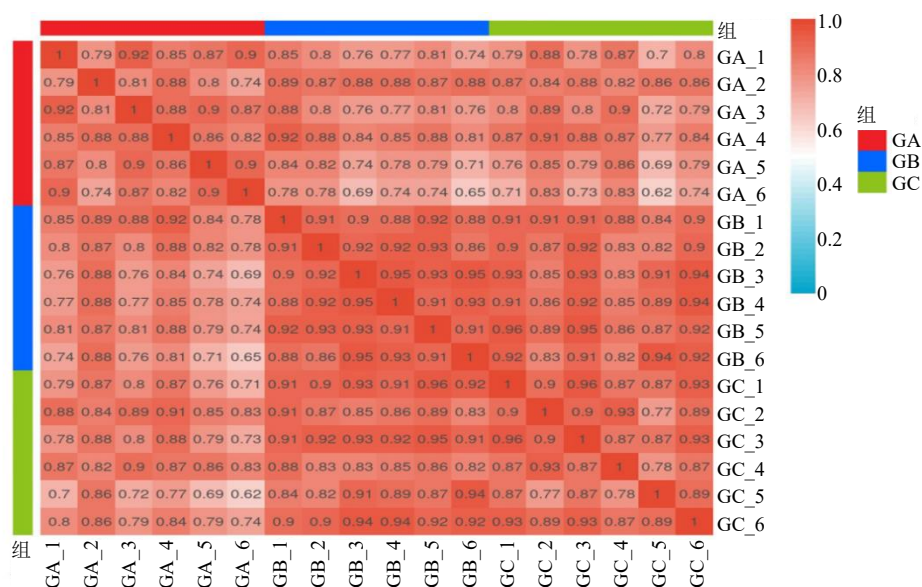


图 9 GA、GB 和 GC 组蛋白质样本的相关性分析

Fig. 9 Correlation plot of protein samples of GA, GB and GC groups

二年生组与一年生组、三年生组与一年生组、三年生组与二年生组中分别得到上调蛋白 ($FC \geq 1.5$, $P \leq 0.05$) 1 565、1 437、193 个; 下调蛋白 ($FC \leq 0.67$, $P \leq 0.05$) 931、817、260 个 (图 10)。

KEGG 分析表明, 最显著富集的通路包括丙酮酸代谢、碳代谢、氧化磷酸化 (图 11)。丙酮酸代谢与碳代谢作为中心代谢枢纽, 其活跃表明葛根细胞正在高效地分解碳水化合物, 产生丰富的代谢中间物 (碳骨架), 这些中间物既可作为三羧酸循环的底物用于产能, 也可作为合成氨基酸、脂肪酸等物质的前体。氧化磷酸化通路的富集则直接证实了细胞通过呼吸链进行高效 ATP 合成的生物学过程。上述通路共同构成了一个活跃的能量-碳骨架供应网络, 为细胞的生物合成活动提供了驱动力和原材料。

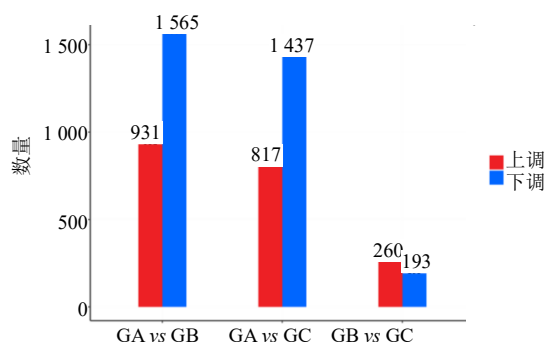


图 10 一年生、二年生和三年生葛根的差异蛋白图

Fig. 10 Differential proteins in one-, two-, and three-year-old *P. lobata*

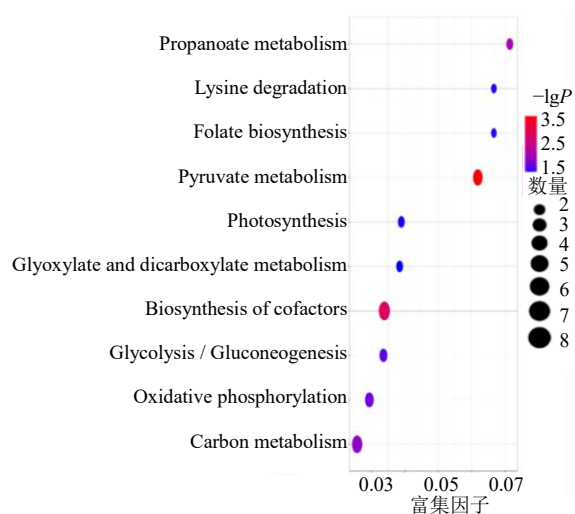


图 11 GA、GB 和 GC 组的差异蛋白 KEGG 富集分析

Fig. 11 KEGG enrichment for differential proteins among group GA, GB and GC

GO 富集分析从生物过程、细胞组分和分子功能 3 个层面阐明了差异蛋白的分布特征。在生物过程层面, 差异蛋白显著富集于一系列与生物合成相关的条目 (图 12)。其中, 有机氮化合物生物合成过程、酰胺代谢过程、嘌呤核糖核苷酸生物合成过程位列前茅。此结果清晰地表明, 在葛根的特定生长时期, 细胞代谢活动呈现出强烈的合成代谢导向。有机氮化合物与酰胺的合成直接关联到蛋白质与生物碱等含氮活性物质的积累, 而嘌呤核苷酸的旺盛合成不仅为核酸复制与转录提供原料, 也反映了细胞对 ATP 等能量载体的巨大需求, 为细胞的快速生长与分化奠定了物质与能量基础^[21]。

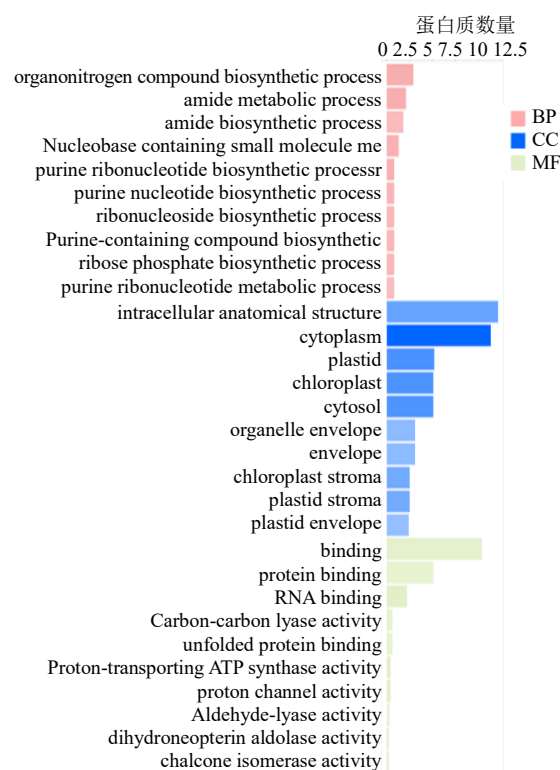


图 12 差异蛋白 GO 图

Fig. 12 Differential protein GO map

在分子功能层面, 差异蛋白显著富集于“查耳酮异构酶活性”“RNA 结合” (GO: 0003723) 及“质子转运 ATP 合酶活性”条目。尤为值得注意的是, 查耳酮异构酶是黄酮类化合物生物合成通路中的关键酶, 其活性的显著富集, 提示本研究关注的葛根生长阶段是其药用活性成分——异黄酮 (如葛根素、大豆苷) 合成与积累的关键时期。同时, “质子转运 ATP 合酶活性”的富集与下述 KEGG 分析中的“氧化磷酸化”通路相互印证, 凸显了能量生成

过程的核心地位。

在细胞组分层面, 差异蛋白主要定位于叶绿体基、质体包膜及细胞质 (图 13)。尽管葛根为地下储藏器官, 但其细胞中仍含有质体。蛋白质在质体相关组分的显著富集, 表明质体是葛根次生代谢 (特别是异黄酮合成) 和部分初级代谢活动的核心场所。细胞质作为糖酵解等基础代谢的场所, 其蛋白的富集亦符合预期。在亚细胞定位统计中, 这些蛋白主要位于细胞质、细胞核、细胞质基质、叶绿体、线粒体、内质网、高尔基体、液泡、质体、过氧化物酶体膜、线粒体膜和核膜。

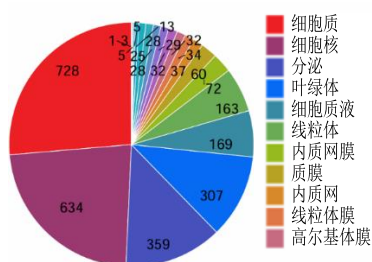


图 13 差异蛋白的亚细胞定位预测

Fig. 13 Subcellular localization prediction of differential proteins

3.5 联合分析

从代谢组学和蛋白质组学数据中共同富集到的关键 KEGG 通路包括代谢途径、次生代谢产物的生物合成、黄酮类生物合成、氨基酸的生物合成以及丙酮酸代谢等。为深入揭示 2 组学数据的内在关联, 采用 Pearson 相关性分析构建了“差异蛋白-差异代谢物”调控网络, 筛选得到 $|r| > 0.8$ 且 $P < 0.05$ 的显著关联对共 127 对, 其中正相关 98 对, 负相关 29 对。对共同通路中的关键分子进行系统分析发现, 初级代谢为次生代谢提供能量与物质基础在代谢途径这一最广泛的基础通路中, 富集了包括 2 个氨基酸衍生物、3 个有机酸、4 个黄酮类化合物及 156 个脂质在内的众多差异代谢物, 同时关联到 PYGB_RAT、KCRB_RAT、GSTM7_RAT 等多个差异蛋白。其中, 丙酮酸代谢通路呈现出高度协同的调控模式: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (G3P_RAT, $FC = 2.13$, $P < 0.01$)、丙酮酸激酶 (KPYK_RAT, $FC = 1.87$, $P < 0.01$) 的表达量显著上调, 同时伴随丙酮酸 ($FC = 1.72$, $P < 0.05$)、苹果酸 ($FC = 1.58$, $P < 0.05$) 含量的显著增加。这表明葛根在快速生长期通过增强糖酵解和三羧酸循环, 为次生代谢产物的合成提供充足的碳骨架和 ATP 能量。

黄酮类生物合成通路的“酶-底物-产物”精准调控在核心的黄酮类生物合成通路中, 鉴定到了完整的“上游酶-中间代谢物-下游终产物”调控链条。上游关键酶苯丙氨酸解氨酶 (A0A067KXJ9, $FC = 2.35$, $P < 0.001$)、4- 香豆酸辅酶 A 连接酶 (A0A068D8N2, $FC = 1.92$, $P < 0.01$) 的表达量在二年生葛根中显著上调, 与上游底物 L-苯丙氨酸的含量呈显著负相关 ($r = -0.78$, $P < 0.01$), 表明苯丙素途径的入口被激活, 大量碳流流向黄酮类生物合成。核心合成酶查耳酮异构酶 (A0A068AAY7, $FC = 2.68$, $P < 0.001$) 的表达量与大豆苷 ($r = 0.87$, $P < 0.01$)、染料木苷 ($r = 0.82$, $P < 0.01$) 的含量呈极强正相关, 该酶催化查耳酮异构化为黄烷酮, 是黄酮类化合物合成的第一个关键分支点^[22-23]。修饰酶糖基转移酶 (A0A0677B09, $FC = 3.12$, $P < 0.001$) 的表达上调与葛根素的持续积累高度同步 ($r = 0.91$, $P < 0.001$), 这与前文相关性热图中“糖基化修饰是限速步骤”的结论相互印证, 表明糖基转移酶是决定葛根素等活性糖苷类成分含量的最关键酶^[24]。

差异代谢物异鼠李素-7-O-葡萄糖苷同时涉及黄酮类生物合成、苯丙烷生物合成和代谢途径; 同时, 有 4 个差异表达蛋白质 (如 A0A0677B09、A0A068AAY7) 共同涉及黄酮类生物合成与次生代谢产物的生物合成通路, 形成了复杂的交叉调控网络。与前人研究在粉葛中的转录组-代谢组联合分析结果一致^[18], 均发现黄酮类成分在二年生时达到积累高峰, 且糖基转移酶基因的表达是调控黄酮苷含量的关键因素。但与 Shang 等^[19]基于粉葛基因组的研究不同, 本研究首次从蛋白质组层面验证了查耳酮异构酶和糖基转移酶的差异表达, 填补了从基因转录到蛋白翻译再到代谢物积累之间的研究空白。

4 讨论

本研究综合运用代谢组与蛋白质组技术, 系统分析了葛根在一年生、二年生和三年生 3 个生长阶段的代谢物与蛋白质动态变化。代谢组学共鉴定到 GA vs GB 236 个、GB vs GC 25 个、GA vs GC 83 个显著差异代谢物, 主要富集于黄酮类生物合成等通路; 蛋白质组学鉴定到 2 764 个差异表达蛋白, 主要富集于黄酮类生物合成、丙酮酸代谢等通路。多组学整合分析表明黄酮类生物合成通路中的关键酶与大豆苷等代谢物呈显著正相关。综合比较, 二年生葛根在代谢物和蛋白质层面差异积累最显著, 黄酮类活性成分含量高且趋于稳定, 二年生至三年

生变化幅度小,因此二年生是葛根作为高品质食品原料和功能配料开发的理想采收期。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 347.
- [2] 陈凯, 魏平慧, 史琳. 葛根异黄酮类成分的药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(12): 2602-2610.
- [3] 朱卫丰, 邹斌, 管咏梅, 等. 葛根质量标志物 (Q-Marker) 探讨分析 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(4): 775-777.
- [4] Sun R, Deng X X, Zhang D D, *et al.* Anti-diabetic potential of *Pueraria Lobata* root extract through promoting insulin signaling by PTP1B inhibition [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 87: 12-15.
- [5] Dong H Y, Zhao Y, Teng H, *et al.* *Pueraria Lobata* antioxidant extract ameliorates non-alcoholic fatty liver by altering hepatic fat accumulation and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 333: 118468.
- [6] Tang X, Zhou Y K, Liu F, *et al.* A *Pueraria Lobata* root extract alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease by modulating the gut microbiota and associated metabolites [J]. *Food Biosci*, 2024, 59: 103746.
- [7] Cardona-Mendoza A, Fonseca-Benitez A, Buitrago D M, *et al.* Down-regulation of human papillomavirus E6 oncogene and antiproliferative effect of *Schisandra chinensis* and *Pueraria Lobata* natural extracts on Hela cell line [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319: 117225.
- [8] Yin M S, Zhang Y C, Xu S H, *et al.* Puerarin prevents diabetic cardiomyopathy *in vivo* and *in vitro* by inhibition of inflammation [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2019, 21(5): 476-493.
- [9] Lu Y, Xu J, Tang R, *et al.* Edible *Pueraria Lobata*-derived exosome-like nanovesicles ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis associated lung inflammation through modulating macrophage polarization [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116098.
- [10] Ren Y Y, Qu S T. Constituent isoflavones of *Puerariae Radix* as a potential neuroprotector in cognitive impairment: Evidence from preclinical studies [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 90: 102040.
- [11] Wu Q, Li P R, *et al.* Pueraria extract ameliorates alcoholic liver disease via the liver-gut-brain axis: Focus on restoring the intestinal barrier and inhibiting alcohol metabolism [J]. *J Agric Food Chem*, 2024, 72(44): 24449-24462.
- [12] Liu H, Chen X, Zhao Y. *Pueraria Lobata* isoflavones prevent postmenopausal osteoporosis by regulating osteoblast-osteoclast crosstalk [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 327: 117542.
- [13] 曹升, 马崇坚, 尚小红, 等. 粉葛主要营养物质、异黄酮成分的积累规律及其相关性分析 [J]. 广西植物, 2023, 43(12): 2319-2327.
- [14] 彭斯文, 朱校奇, 卢红玲, 等. 不同产地葛功能成分含量与矿质元素相关性研究 [J]. 湖南生态科学学报, 2022, 9(4): 43-51.
- [15] Hao D C, Liu C X. Deepening insights into food and medicine continuum within the context of pharmacophylogeny [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(1): 1-2.
- [16] Sun J C, Du L, Qu Z, *et al.* Integrated metabolomics and proteomics analysis to study the changes in *Scutellaria baicalensis* at different growth stages [J]. *Food Chem*, 2023, 419: 136043.
- [17] Jiang P F, Chen X W, Qian L, *et al.* Integrated transcriptomic and proteomic analysis of the physiological changes of the liver in domesticated Eurasian perch, *Perca fluviatilis* [J]. *Comp Biochem Physiol Part D Genom Proteom*, 2022, 41: 100957.
- [18] 胡心怡. 多组学联合分析粉葛异黄酮类化合物分子合成机制 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2024.
- [19] Shang X H, Yi X X, Xiao L, *et al.* Chromosomal-level genome and multi-omics dataset of *Pueraria lobata* var. *thomsonii* provide new insights into legume family and the isoflavone and puerarin biosynthesis pathways [J]. *Hortic Res*, 2022, 9: uhab035.
- [20] Du G, Zhao H Y, Zhang Q W, *et al.* A rapid method for simultaneous determination of 14 phenolic compounds in *Radix Puerariae* using microwave-assisted extraction and ultra high performance liquid chromatography coupled with diode array detection and time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(5): 705-714.
- [21] Hu X Y, Zhu T, Min X Y, *et al.* Integrated metabolomic and transcriptomic analysis of puerarin biosynthesis in *Pueraria montana* var. *thomsonii* at different growth stages [J]. *Genes*, 2023, 14(12): 2230.
- [22] Niu Y R, Li H, Dong J, *et al.* Identification of isoflavonoids in *Radix Puerariae* for quality control using on-line high performance liquid chromatography-diode array detector-electrospray ionization-mass spectrometry coupled with post-column derivatization [J]. *Food Res Int*, 2012, 48(2): 528-537.
- [23] Shang X H, Huang D, Wang Y, *et al.* Identification of nutritional ingredients and medicinal components of *Pueraria lobata* and its varieties using UPLC-MS/MS-based metabolomics [J]. *Molecules*, 2021, 26(21): 6587.
- [24] 王静. 异黄酮合成代谢途径中关键酶基因表达及底物差异研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2015.

[责任编辑 时圣明]