

质量分析

基于广泛靶向代谢组学研究甘草不同年限差异代谢物*

周德来¹, 王苗¹, 冯金梁², 赵鲲鹏³, 李运⁴, 程显隆^{5**}, 杨扶德^{1**}

(1. 甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2. 甘肃康乐药业有限责任公司, 兰州 730300; 3. 甘肃中医药大学中医临床学院, 兰州 730000; 4. 兰州食品药品检验检测研究院, 兰州 730050; 5. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

摘要 目的:通过对不同栽培年限甘草中的代谢成分进行定性定量分析,寻找其差异代谢物,探究甘草体内代谢物的累积规律。方法:采用 Agilent SB-C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱,以 0.1% 甲酸水溶液为流动相 A, 0.1% 甲酸乙腈溶液为流动相 B, 梯度洗脱, 流速 0.35 mL · min⁻¹, 柱温 40 °C, 进样量 4 μL; 质谱采用正负离子扫描, 多反应监测模式, 进行样品质谱信号采集, 基于自建二级质谱数据库对不同年限甘草体内的代谢物进行定性与定量分析, 结合主成分分析、正交偏最小二乘法判别分析、聚类热图分析等手段对不同年限甘草的代谢物进行多元统计分析。结果:(1) 从不同年限甘草样品共检测到 1 038 个代谢物, 其中一年生与二年生甘草间存在 201 个差异代谢物, 125 个上调, 76 个下调; 二年生与三年生之间存在 223 个差异代谢物, 64 个上调, 159 个下调; 一年生与三年生之间存在 185 个差异代谢物, 59 个上调, 126 个下调; 发现一年生甘草特有代谢物 4 个, 二年生 6 个, 三年生 1 个。(2) 对差异代谢物进行 K-均值聚类分析, 按照积累趋势不同将差异代谢物进行分类, 发现大多数黄酮、酚酸、萜、木脂素及香豆素等类代谢物在二年生甘草中达到峰值, 大多数生物碱、氨基酸及其衍生物等类代谢物在一年生甘草中达到峰值, 一部分黄酮、酚酸等类代谢物在三年生甘草中达到峰值, 提示甘草体内代谢物含量变化存在一定的规律。(3) 在京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库注释得到 160 个差异代谢物, 黄酮类、氨基酸及其衍生物、有机酸是其中占比较多的差异代谢物。不同对比组间共富集到 79 条差异代谢通路, 其中极显著富集的差异代谢通路 ($P < 0.01$) 6 条, 显著富集的通路 ($P < 0.05$) 23 条, 参与上述通路的化合物在不同年限对比中的分布与富集前基本一致。结论: 本研究阐明了不同生长年限甘草代谢组分间的差异, 并通过差异代谢物进一步分析了可能造成差异的代谢通路, 为甘草采收年限的确定及品质形成机制的研究提供一定的参考依据。

关键词: 甘草; 栽培年限; 广泛靶向代谢组学; 超高效液相色谱-串联四极杆/线性离子阱质谱法; 差异代谢物; KEGG 通路; 正交偏最小二乘法判别分析

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)01-0144-14

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.01.15

Study on differential metabolites of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. in different years based on extensive targeted metabonomics*

ZHOU De-lai¹, WANG Miao¹, FENG Jin-liang², ZHAO Kun-peng³,
LI Yun⁴, CHENG Xian-long^{5**}, YANG Fu-de^{1**}

(1. College of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Kangle Pharmaceutical Co., Ltd., Lanzhou 730300, China; 3. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 4. Lanzhou Institute of Food and Drug Control, Lanzhou 730050, China; 5. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To investigate the accumulation pattern of metabolites in *Glycyrrhiza uralensis* by qualitative

* 2021 年度甘肃高等学校产业支撑计划项目(2021CYZC-40); 甘肃省科技小巨人企业培育计划项目(17CXIJA084); 甘肃省委组织部人才发展专项资金项目(2018 年); 2018 年兰州市人才创新创业科技计划项目(2017-RC-112)

** 通信作者 杨扶德 Tel:(0931)5162435; E-mail:gszyfd@163.com
程显隆 Tel:(010)53851483; E-mail:lnxcl@sina.com

第一作者 Tel:09315162435; E-mail:gszyzdl2022@163.com

and quantitative analyses of metabolic constituents in *Glycyrrhiza uralensis* with different cultivation years, and to search for its differential metabolites. **Methods:** The separation was performed on an Agilent SB - C₁₈ (100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) column with 0.1% formic acid aqueous solution as the mobile phase A and 0.1% formic acid acetonitrile solution as the mobile phase B. The gradient elution was carried out at a flow rate of 0.35 mL · min⁻¹, and the column temperature was 40 °C with an injection volume of 4 μL. The mass spectrometry was performed with positive and negative ions scanning in multiple reaction monitoring mode. The mass spectrometry was performed in multi - response monitoring mode with positive and negative ion scanning. The qualitative and quantitative analyses of the metabolites in *Glycyrrhiza uralensis* were carried out on the basis of the self - constructed secondary mass spectrometry database, and the multivariate statistical analyses of the metabolites of *Glycyrrhiza uralensis* with different cultivation were combined with principal component analysis (PCA), orthogonal partial least squares discriminant analysis (OPLS - DA), and cluster heat map analyses. **Results:** (1) A total of 1 038 metabolites were detected from the samples of *Glycyrrhiza uralensis* with different cultivation years, among which 201 differential metabolites existed between annual and biennial *Glycyrrhiza uralensis*, 125 up - regulated and 76 down - regulated; 223 differential metabolites existed between biennial and three years old *Glycyrrhiza uralensis*, 64 up - regulated and 159 down - regulated; 185 differential metabolites existed between annual and three years old *Glycyrrhiza uralensis*, 59 up - regulated and 126 down - regulated. Four metabolites specific to annual *Glycyrrhiza uralensis*, six to biennial and one to three - year old were found. (2) K - mean cluster analysis was performed on the differential metabolites, and the differential metabolites were classified according to the different accumulation trends, and it was found that most of the metabolites such as flavonoids, phenolic acids, terpenes, lignans, and coumarins peaked in biennial *Glycyrrhiza uralensis*, and most of the metabolites such as alkaloids, amino acids and their derivatives peaked in annual *Glycyrrhiza uralensis*, and a part of the flavonoids, phenolic acids and other metabolites reached peaks in three years old *Glycyrrhiza uralensis*, suggesting that the metabolism of *Glycyrrhiza uralensis* in the body reached the peaks. peak value, suggesting that there was a certain pattern of metabolite content changes in *Glycyrrhiza uralensis*. (3) 160 differential metabolites annotated in Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database and flavonoids, amino acids and their derivatives, and organic acids were the differential metabolites that accounted for a relatively large number of them. A total of 79 differential metabolic pathways were enriched among different comparison groups, among which 6 differential metabolic pathways were highly significantly enriched ($P < 0.01$) and 23 significantly enriched ($P < 0.05$), and the distributions of compounds involved in the above pathways were basically the same as before enrichment in comparison of different cultivation year. **Conclusion:** The present study elucidate the differences between the metabolic components of *Glycyrrhiza uralensis* with different cultivation years, and further analyse the metabolic pathways that might cause the differences through the differential metabolites, which can provide a certain reference basis for the determination of the harvesting year of *Glycyrrhiza uralensis* and the study of the quality formation mechanism.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; cultivated years; widely targeted metabolomics; UPLC - QTRAP MS; differential metabolites; KEGG pathways; OPLS - DA

甘草作为药食两用的中药材品种,来源于豆科植物甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)、胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Bat.)或光果甘草 (*Glycyrrhiza glabra* L.)的干燥根及根茎,作为我国传统大宗药材,素有“十方九草”之说^[1],但随着长期的掠夺式采挖,甘

草的野生资源逐渐枯竭,目前栽培品已成为商品主流^[2]。栽培甘草与野生甘草相比,存在质量良莠不齐,有效成分含量低等问题^[3],开展甘草栽培过程中代谢成分的变化规律研究,对甘草质量的科学评价与控制具有重要意义。前人研究发现不同栽培年限

甘草的有效成分及药理活性存在差异^[4-5],化学成分作为药理活性的物质基础,有研究针对不同年限甘草中的黄酮类和三萜类化合物展开研究^[6],发现甘草苷、甘草酸、芹糖甘草苷等成分在不同年限甘草间存在差异,且彼此之间存在一定的相关性^[7],也有学者发现不同生长期甘草地上部分黄酮类化合物的含量变化存在一定的规律^[8]。上述研究一定程度上揭示了不同栽培年限甘草间化学成分的差异,但受制于方法自身定性能力不足,追踪研究的化合物种类有限,也没有深入探究导致不同年限甘草化学成分差异的代谢机制。

代谢组学作为一种对生物所含代谢物整体进行定性和定量分析的技术手段,可通过对大量小分子化合物进行定性定量分析,从而反映生物体内代谢物的种类、相对含量及其在内外因素作用下的变化规律^[9],作为一种高通量、高精度的研究方法,其研究思路与中药作用的整体观具有一致性^[10]。目前在甘草基原鉴定^[11]、生长方式^[12]、炮制加工^[13]、药理作用机制^[14]等多项研究中已得到应用。广泛靶向代谢组学技术作为结合非靶向和靶向代谢组学技术的新兴技术,与传统代谢组学技术相比,具有覆盖面更广和灵敏度更高的优势^[15]。本研究利用广泛靶向代谢组学技术,对不同栽培年限甘草中的代谢物进行系统性分析,明确不同栽培年限甘草间的差异代谢物及其含量变化趋势,利用京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库进行代谢通路富集分析,为甘草采收年限确定、品质形成机制及物质基础研究提供一定的参考依据。

1 材料

实验所用一年生、二生、三年生甘草均于2022年4月采集于甘肃省兰州市榆中县上花叉乡黑虎村(海拔2 351米,36°8'91"N,104°36'13"E)。所有样品均经甘肃中医药大学杨扶德教授鉴定为豆科植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)的干燥根及根茎,不同年限甘草的代表性样品如图1所示。材料采集后迅速用无菌水冲洗擦干,经真空冷冻干燥后,粉碎过三号筛,得一年生、二年生、三年生共3组样品,分别编组为GUY1、GUY2、GUY3。

实验用甲醇、乙腈为色谱纯(默克公司),甲酸为色谱纯(上海阿拉丁试剂有限公司)。SHIMADZU Nexera X2型超高效液相色谱仪(岛津公司),4500 QTRAP串联质谱仪(应用生物系统公司),XSE205DU型万分之一天平(梅特勒-托利多公

司),Scimtz-100F冻干机(宁波新芝生物科技股份有限公司),MM400研磨机(莱驰公司)。

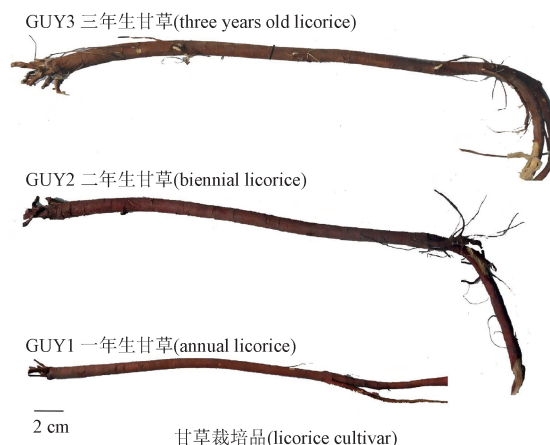


图1 不同年限甘草代表性样品示意图

Fig. 1 Schematic diagram of representative samples of *G. uralensis* in different years

2 方法

2.1 样品处理

甘草样品经冷冻干燥后,粉碎过3号筛,取粉碎后样品粉末适量使用研磨仪(30 Hz,1.5 min)再次研磨,精密称取50 mg,置于离心管,加入70%甲醇1.2 mL,每30 min涡旋1次,每次持续30 s,共涡旋6次,在12 000 r·min⁻¹离心3 min,取上清液过微孔滤膜(0.22 μm),置进样小瓶中备用^[16],每组样品按上述方法处理3次,制备3份平行样品溶液。质控样品(QC)由3组不同年限甘草样品等量混合制备而成,与分析样本采用相同的方法处理和检测,重复测定3次,分别作为第1、第5、第12检测分析样品进行检测分析,以监测整个分析过程的重复性。

2.2 LC-MS/MS检测

2.2.1 色谱条件 采用Agilent SB-C₁₈(100 mm × 2.1 mm,1.8 μm)色谱柱,柱温40 °C,以0.1%甲酸水溶液(A)-0.1%甲酸乙腈溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0 min,5%B;0~9 min,5%B→95%B,9~10 min,95%B;10~11.10 min,95%B→5%B;11.10~14 min,5%B),流速0.35 mL·min⁻¹,进样体积4 μL。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI)温度为550 °C,正负离子扫描模式进行样品质谱信号采集,离子喷雾电压分别为5 500 V(ESI⁺)和-4 500 V(ESI⁻),离子源气体I(GSI)、离子源气体II(GSII)、

气帘气 (CUR) 分别设置为 344.75、413.70、172.38 kPa, 碰撞诱导电离参数设置为高, QQQ 数据的采集使用分段多反应监测 (MRM) 模式, 并将碰撞气体 (氮气) 设置为中等, 针对筛选的代谢物特征碎片离子进行 DP 和 CE 的优化, 同时根据每个时期洗脱的代谢物, 利用优化后的 DP 和 CE 在每个时期内监测一组特定的 MRM 离子对。

2.3 数据分析

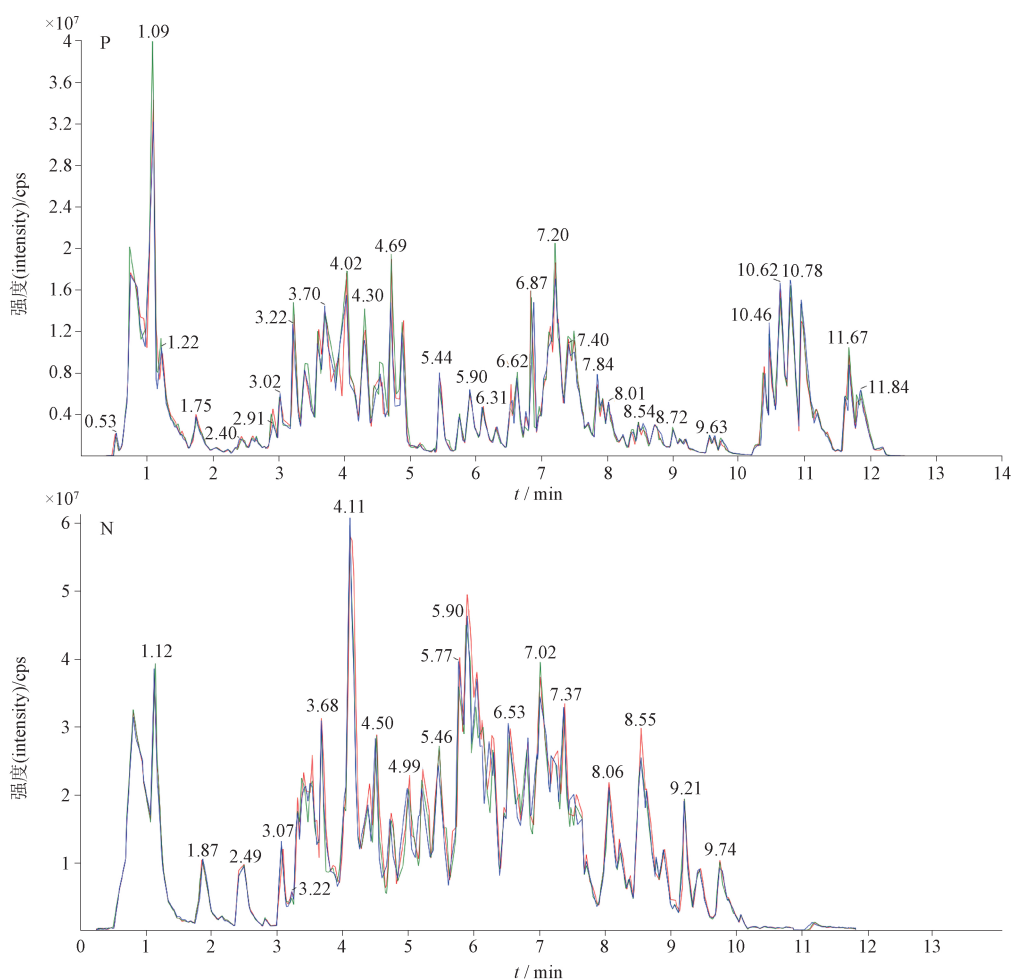
原始数据经 Analyst 1.6.3 处理后, 基于武汉迈特维尔生物科技有限公司商业自建库 (Metware database) 进行化合物定性分析, 定量分析利用三重四极杆质谱的 MRM 模式分析完成, 用 MultiQuant 软件打开样品下机质谱文件, 进行色谱峰的积分和校正工作, 每个色谱峰的峰面积代表对应物质的相对含量^[17]。基于 KEGG 数据库进行代谢物的注释与代谢

通路富集分析。对提取到的原始数据, 利用 R 软件进行主成分分析 (PCA)、聚类热图分析及正交偏最小二乘法判别分析 (OPLS-DA)。

3 结果

3.1 质控分析

为了监测分析过程中可靠性, 在分析序列中不同时间段添加随行 QC 样品溶液进行检测分析, 将不同采集时间下 QC 样品溶液的正负离子流图重叠, 如图 2 所示, 可见不同采集时间下 QC 样品溶液色谱峰的响应强度和保留时间基本一致, 重叠性较好, 同时通过建立 PCA 模型对所有样品溶液分析结果进行监控, 如图 3 所示, 不同采集时间下 QC 样品溶液的 PC1 scores 均在正、负 3 个标准差 (standard deviation, SD) 范围内, 上述结果表明实验过程中仪器状态稳定可靠、分析方法重复性良好。



P. 正离子模式 (positive ion mode) N. 负离子模式 (negative ion mode)

图 2 QC 样品质谱检测 TIC 重叠图

Fig. 2 Overlay of TIC for mass spectrometry detection of QC samples

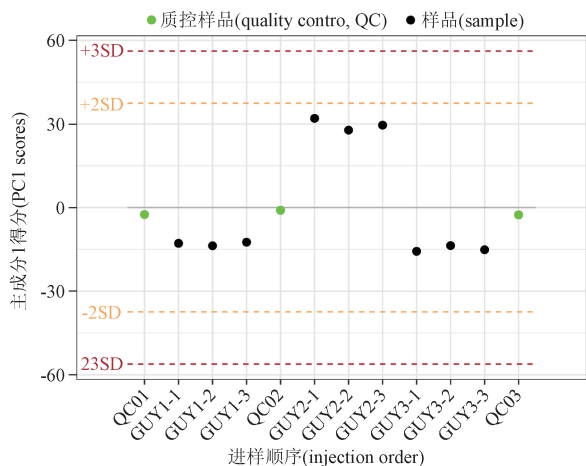


图3 所有样品 PC1 控制图

Fig. 3 PC1 control chart for all samples

3.2 代谢物定性结果

对不同栽培年限的甘草样品,按“2.1”项下方法处理,按“2.2”项下条件进样分析,根据二级质谱信息在 Metwar database 中进行定性分析,分析过程中去除同位素信号,含 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 离子的重复信号,以及本身是其他更大分子量代谢物碎片离子的重复信号,按照鉴定条件不同划分为 3 个等级,样品所含代谢物的二级质谱(代谢物的所有碎片离子)、保留时间与数据库代谢物匹配得分 ≥ 0.7 为等级 1,鉴定得到 372 个;匹配得分为 0.5 ~ 0.7 为等级 2,鉴定得到 243 个;样品所含代谢物的母离子、子离子、保留时间、去簇电压、碰撞能量与数据库代谢物核对一致的为等级 3,鉴定得到 423 个,共鉴定 1 038 个代谢物。如图 4 所示,其中黄酮类、酚酸类、脂质、萜类是占比较多的代谢物类别,分别占总代谢物的 33.82%、13.29%、10.21% 和 9.73%。

3.3 代谢物多元统计分析

为了分析甘草不同年限代谢产物组的动态变化,对不同生长年限的甘草进行非监督模式识别的 PCA,结果如图 5 所示,前 3 个主成分贡献率分别为 37.18%、35.54% 和 6.01%,累计达 78.73%,能较好地地区分不同年限的甘草,表明不同年限甘草的化学成分存在一定差异,为了直观地表达这种差异,对所有样品进行聚类分析,并绘制聚类热图,如图 6 所示,不同年限甘草中可以得到很好的区分,各类成分在不同年限甘草间均存在不同程度的差异。

- 生物碱类(alkaloids) 3.66%
- 氨基酸及其衍生物类(amino acids and derivatives) 7.8%
- 黄酮类(flavonoids) 33.82%
- 木脂素和香豆素类(lignans and coumarins) 5.68%
- 脂质类(lipids) 10.21%
- 核苷酸及其衍生物类(nucleotides and derivatives) 4.05%
- 有机酸(organic acids) 4.91%
- 其它类(others) 6.45%
- 酚酸类(phenolic acids) 13.29%
- 鞣质类(tannins) 0.39%
- 萜类(terpenoids) 9.73%

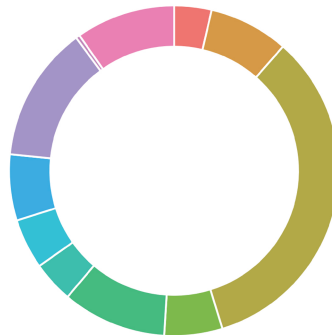


图4 代谢物类别组成环形图

Fig. 4 Cycle diagram of metabolite category composition

- GUY1 一年生甘草(annual licorice)
- GUY2 一年生甘草(biennial licorice)
- GUY3 三年生甘草(three years old licorice)

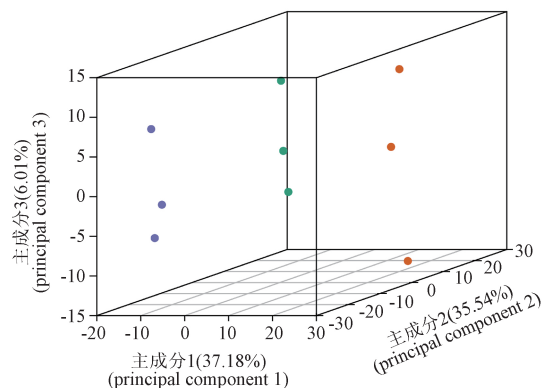


图5 不同年限甘草分组主成分分析三维图

Fig. 5 Three - dimensional plot of principal component analysis of *G. uralensis* subgroups of different ages

3.4 差异代谢物的筛选与分析

本研究利用 R 软件中的 MetaboAnalystR 包 OPLSR. Anal 函数进行有监督的 OPLS - DA,建立的 OPLS - DA 模型采用 7 次循环交互验证和 200 次响应排序检验(RPT)的方法来防止 OPLS - DA 模型过拟合并考察模型的质量,3 组模型的 Q^2 均 > 0.9 ($P < 0.05$), $R^2 Y$ 、 $R^2 X$ 均 > 0.5 ,表明当前建立的 OPLS - DA 模型较为可靠。如图 7 所示,一年生与二年生、二年生与三年生、一年生与三年生可均匀地

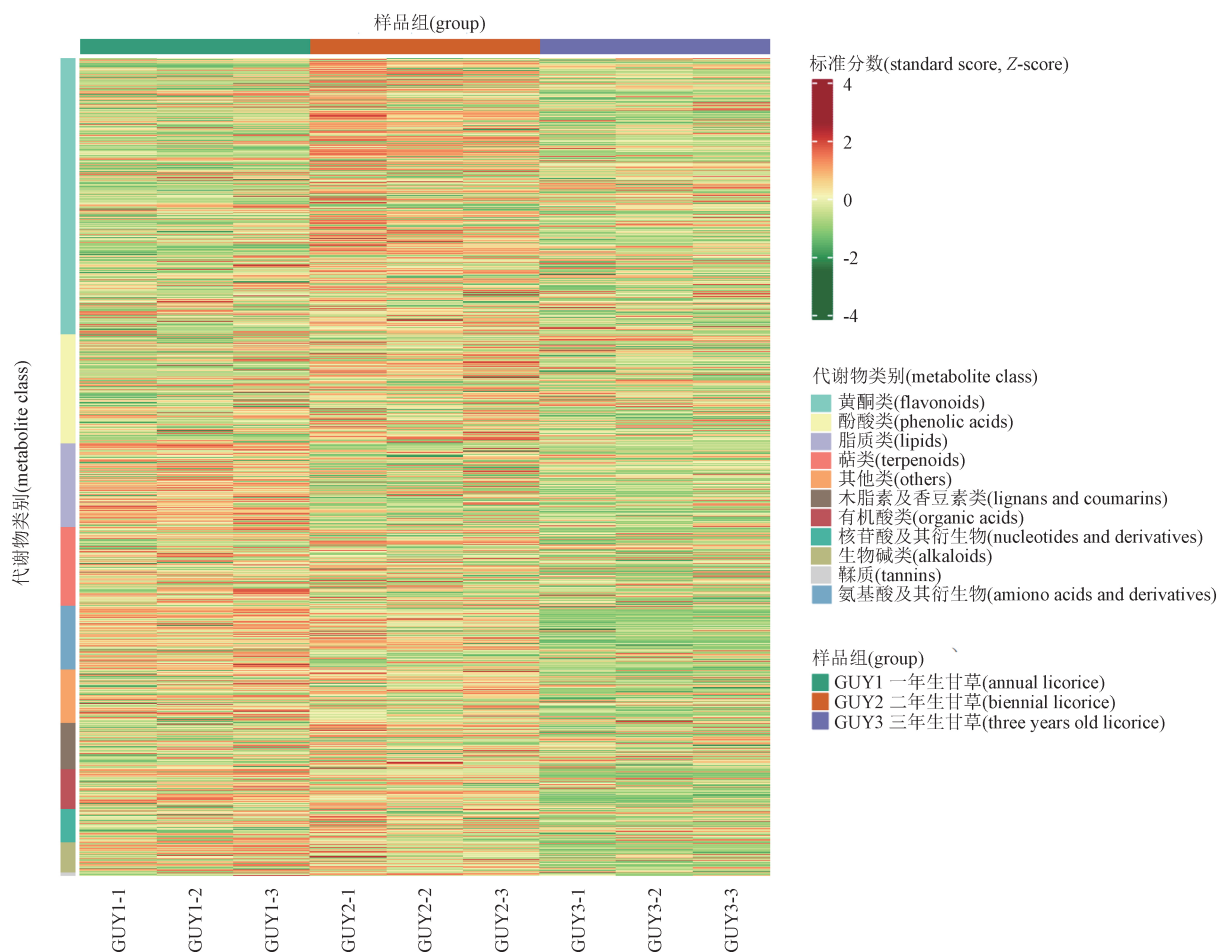


图6 不同年限甘草样品聚类热图

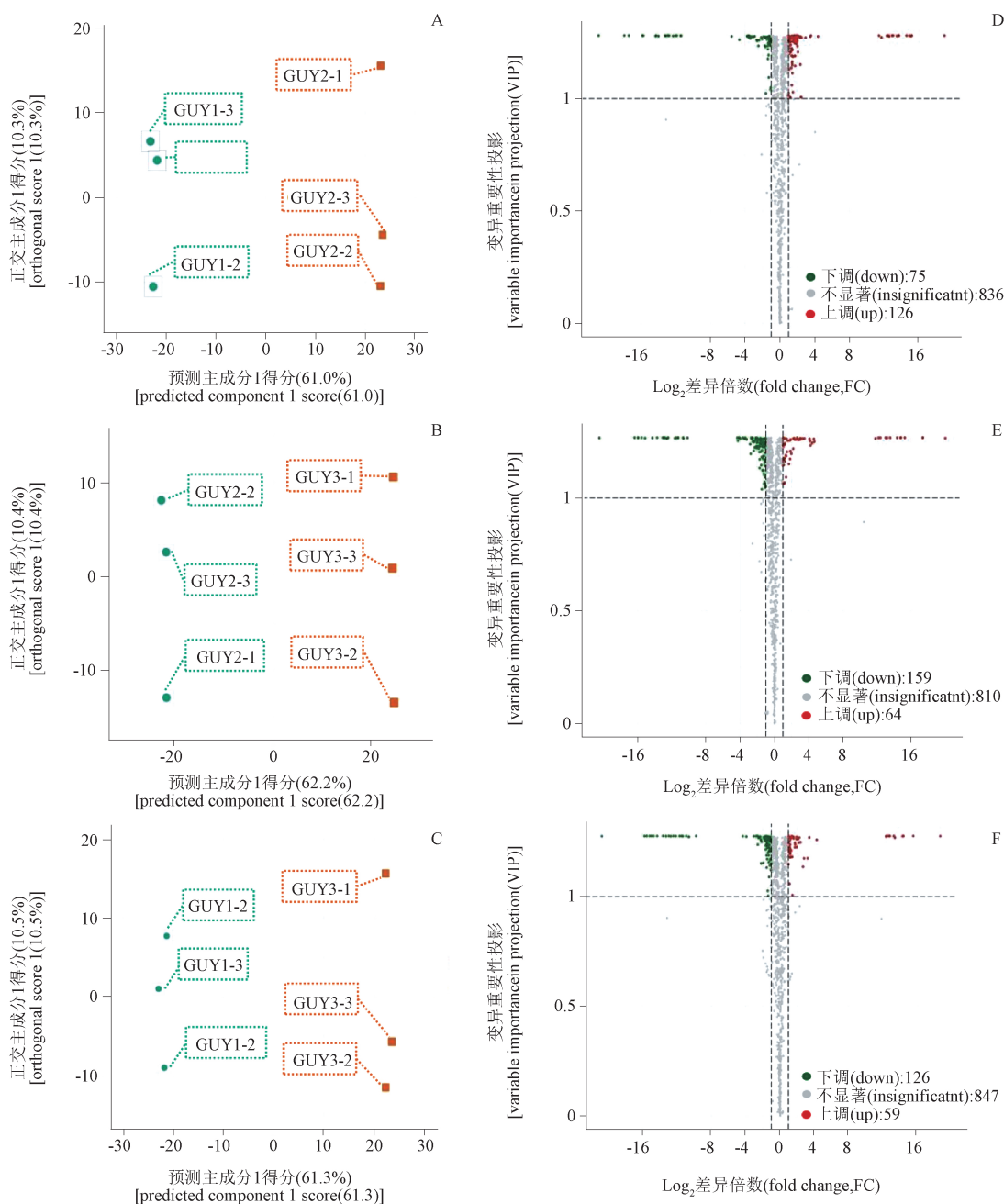
Fig. 6 Heat map of clustering of *G. uralensis* samples of different ages

分布在两侧,依据所建立的 OPLS - DA 模型筛选差异代谢物,以差异倍数(fold change)和 OPLS - DA 模型变量重要性投影(VIP)筛选差异代谢物(VIP ≥ 1、Fold change ≥ 2 或 Fold change ≤ 0.5),一年生与二生、二年生与三年生、一年生与三年生对比组中差异代谢物数目分别为 200、222 和 184 个,在 3 组对比中均存在差异的有 24 个,见表 1 所示。发现一年生特有化合物 4 个(1 - O - 阿魏酰基 - 3 - O - 咖啡酰甘油、3 - 甲基 - L - 组氨酸、3 - 吡啶丙酸、荜草素 - 2'' - O - 半乳糖苷)、二年生 6 个(木犀草素 - 7, 3' - O - 二葡萄糖苷、3 - O - 甲基鞣花酸、橙皮素 - 7 - O - (6'' - 丙二酰)葡萄糖苷、蟛蜞菊内酯、异鼠李素 - 7 - O - 葡萄糖苷、泽兰黄酮 - 7 - O - 阿洛糖苷)、三年生 1 个(间苯三酚)。

3.5 差异化合物的含量变化趋势分析

为了直观地表达差异代谢物在不同年限甘草中

的变化趋势,本研究对所有的差异代谢物进行 K - 均值聚类分析,见图 8 所示。按照积累趋势的不同将所有差异代谢物分为 10 组,可见有 53 个代谢物(第 1 组、第 5 组)在三年生甘草中含量相对较高,有 171 个代谢物(第 2 组、第 3 组、第 4 组、第 9 组)在二年生甘草中含量相对较高,有 108 个(第 6 组、第 8 组、第 10 组)在一年生甘草中含量相对较高,34 个代谢物在二年生与三年生中含量差异不明显,但都显著高于一年生甘草(第 7 组)。进一步对上述 4 种趋势的差异代谢物进行分类,如图 9 所示,可见大多数黄酮、酚酸、萜、木脂素及香豆素等类代谢物在二年生或三年生甘草中含量较高,如甘草苷 C2、甘草苷 B、甘草苷 D2、木犀草苷、樱花素、甘草皂苷 J2 等。大部分生物碱、脂质、氨基酸及其衍生物等代谢物在一年生甘草中含量较高。不同年限甘草中代谢产物含量的变化趋势呈现出一定的规律性,其中黄酮和三萜



A、B、C 分别为一年生与二年生、二年生与三年生、一年生与三年生 OPLS-DA 得分图 (A, B, and C are plots of annual versus biennial, biennial versus three-year, and annual versus three-year OPLS-DA scores) D、E、F 分别为一年生与二年生、二年生与三年生、一年生与三年生的差异代谢物火山图 (D, E, and F are volcano plots of differential metabolites for annuals vs biennials, biennials vs three years old, and annuals vs three years old)

图 7 各对比组 OPLS-DA 得分图及差异代谢物火山图

Fig. 7 OPLS-DA score diagram and volcanic map of differential metabolites in each group

类化合物作为甘草主要的活性成分类型,在栽培期第 2 年得到大量累积,因此认为生长期第 2 年可能是甘草品质形成的重要阶段。

3.6 差异代谢物的注释与分类

通过与 KEGG 数据库进行比对,有 160 个差异

代谢物在 KEGG 数据库中查询到 ID,120 个差异代谢物得到注释,对这些差异代谢物在不同对比组间的变化趋势及类别进行统计,如表 2 所示,黄酮类、氨基酸及其衍生物类、有机酸、糖类占比较高,同未注释前基本一致,但是萜类化合物注释到的相对

表 1 不同年限甘草对比中均存在的差异代谢物

Tab. 1 Differential metabolites of *G. uralensis* in different years

化合物 (compound)	分类 (class)	电离模式 (polarity)	母离子 (precursor ion) <i>m/z</i>	子离子 (product ion) <i>m/z</i>
2'-脱氧肌苷-5'-单磷酸 (2'-deoxyinosine-5'-monophosphate)	核苷酸及其衍生物 (nucleotides and derivatives)	[M+H] ⁺	333.052 0	137.050 0
樱花素(sakuranetin)	黄酮类(flavonoids)	[M+H] ⁺	287.091 4	167.035 0
鼠李素(rhamnetin)	黄酮类(flavonoids)	[M-H] ⁻	315.051 0	165.000 0
高丽槐素(maackiain)	黄酮类(flavonoids)	[M-H] ⁻	283.061 2	253.800 0
美迪紫檀素(medicarpin)	黄酮类(flavonoids)	[M-H] ⁻	269.081 9	209.000 0
泽兰黄酮(nepetin)	黄酮类(flavonoids)	[M+H] ⁺	317.065 6	302.040 0
6-甲基木犀草素(6-methyl luteolin)	黄酮类(flavonoids)	[M+H] ⁺	301.071 7	167.034 7
刺果甘草查耳酮 C(licoaogrochalcone C)	黄酮类(flavonoids)	[M-H] ⁻	353.139 5	150.100 0
9-甲氧基-6H-[1]苯并呋喃[3,2-c] 色烯-3,4,7-三醇(aracarpene 2)	黄酮类(flavonoids)	[M-H] ⁻	299.060 0	284.020 0
甘草查耳酮 D(licochalcone D)	黄酮类(flavonoids)	[M+H] ⁺	355.153 9	193.052 1
表儿茶素-4'-O-β-D-葡萄糖苷* (epicatechin-4'-O-β-D-glucopyranoside)*	黄酮类(flavonoids)	[M-H] ⁻	451.127 1	289.072 9
金圣草黄素-7-O-(6"-乙酰)葡萄糖苷 (chrysoeriol-7-O-(6"-acetyl)glucoside)	黄酮类(flavonoids)	[M-H] ⁻	503.119 5	341.100 0
双氢芝麻脂素(dihydrosesamin)	木脂素(lignans)	[M+H] ⁺	357.132 2	307.094 5
山楂酸(maslinic acid)	三萜类(triterpenes)	[M-H] ⁻	471.348 0	471.348 0
30-去甲常春藤皂苷元(30-norhederagenin)	三萜类(triterpenes)	[M-H] ⁻	455.318 1	455.318 1
甘草皂苷 P2(licorice-saponin P2)	三萜类(triterpenes)	[M+H] ⁺	839.401 5	469.330 1
赤豆皂苷 IV(azukisaponin IV)	三萜类(triterpenes)	[M+H] ⁺	973.500 3	471.346 6
贝萼皂苷元-3-O-葡萄糖醛酸苷-28-O- (2"-O-鼠李糖基)葡萄糖苷 [bayogenin-3-O-glucuronide-28-O- (2"-O-rhamnosyl)glucoside]	三萜类(triterpenes)	[M+H] ⁺	973.499 4	471.348 6
5-乙酰氨基戊酸(5-acetamidopentanoic acid)	有机酸类(organic acids)	[M-H] ⁻	158.082 3	116.071 7
L-缬氨酸(L-valine)	氨基酸及其衍生物 (amino acids and derivatives)	[M+H] ⁺	118.086 3	72.100 0
L-赖氨酸丁酸酯(L-lysine-butanoic acid)	氨基酸及其衍生物 (amino acids and derivatives)	[M+H] ⁺	235.100 0	118.300 0
香草酰咖啡酰酒石酸(vnilloylcaffeoyl tartaric acid)	酚酸类(phenolic acids)	[M-H] ⁻	461.070 0	167.040 0
原苏木素 B(protosapannin B)	酚酸类(phenolic acids)	[M-H] ⁻	303.087 9	231.067 6
1-O-咖啡酰-4-O-没食子酰-β-D-葡萄糖苷 (1-O-caffeoyl-4-O-galloyl-β-D-glucose)	酚酸类(phenolic acids)	[M-H] ⁻	493.098 8	169.014 2

较少,与 KEGG 数据库中萜类代谢通路的不完善有关。

3.7 KEGG 通路富集分析

通过 KEGG 通路富集分析发现,一年生与二年生甘草中共富集到 54 条差异代谢通路,其中显著富集差异代谢通路 3 条,分别为异黄酮生物合成途径、硫中继系统、黄酮和黄酮醇的生物合成($P < 0.05$)。二年生与三年生甘草中共富集到 59 条代谢通路,其中显著富集 1 条,为异黄酮生物合成途径。一年生与三年生中共富集到代谢通路 76 条,显著富集的差异代谢通路 19 条,其中极显著富集 6 条($P < 0.01$),

分别为 ABC 转运蛋白、氨基酸生物合成途径、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成途径、2-氧代环戊烷羧酸甲脂代谢途径、氨酰 tRNA 的生物合成途径和单环内酰胺化化合物的生物合成途径。将参与显著富集与极显著富集 KEGG 通路的差异代谢物进行统计,见表 3 所示,发现参与这些代谢通路的主要代谢物是黄酮类、氨基酸及其衍生物、有机酸等,同富集前基本一致(表 2),说明这些代谢通路可能在甘草的生长发育及物质积累过程中发挥作用,从而导致不同年限甘草代谢物间产生差异。

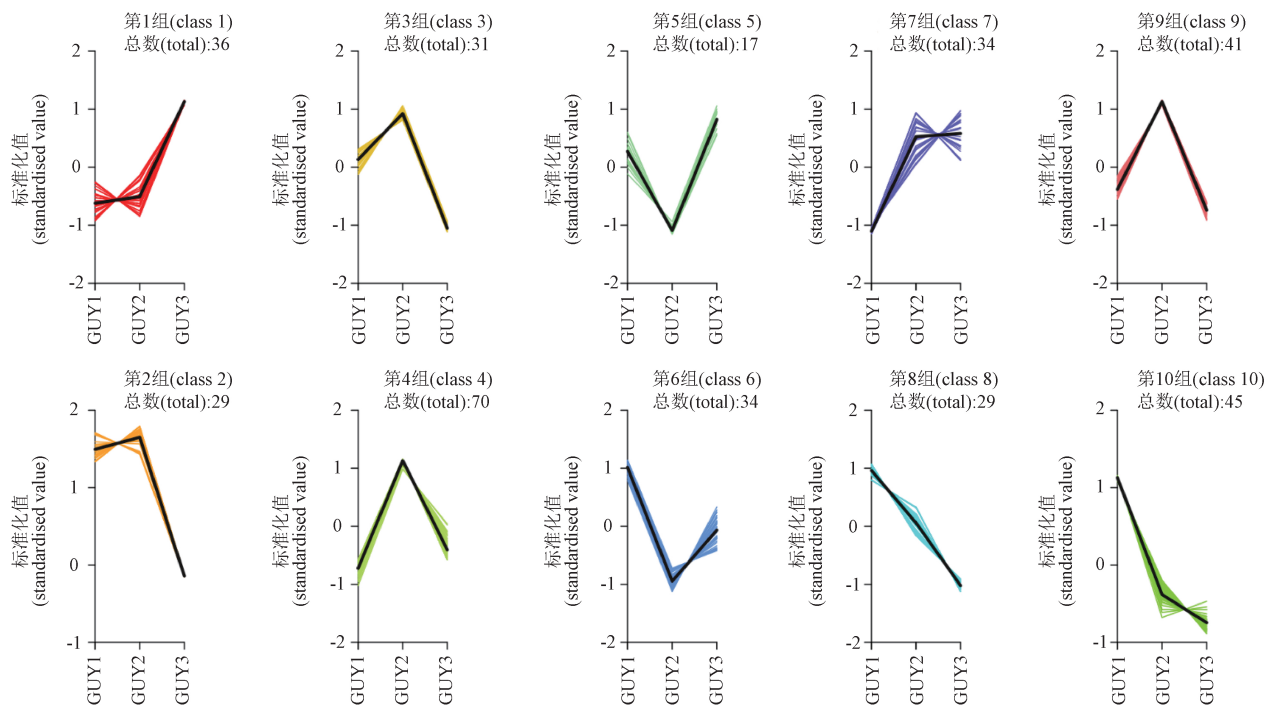
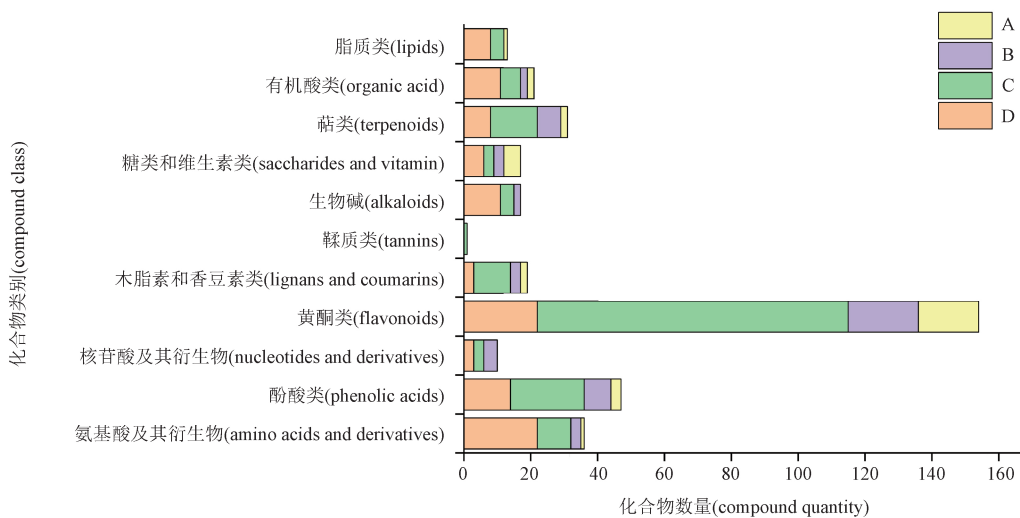


图 8 差异代谢物 K-均值聚类分析图

Fig. 8 Differential metabolite K-means cluster analysis plot



A. 代表二年与三年间含量变化不明显的差异代谢物 (A represents differential metabolites with insignificant changes in content between biennial and three years old) B、C、D. 分别代表含量在三年生、二年生、一年生含量最高的差异代谢物 (B, C, and D represent the differential metabolites whose contents were the highest in the three years old, biennial, and annual)

图 9 不同累积趋势代谢物分类统计图

Fig. 9 Classification of metabolites with different cumulative trends

为了直观表示不同代谢途径中差异代谢的变化趋势,采用基于 KEGG 代谢通路的差异丰度(DA)分析,计算了各对比组中显著富集程度前 20 的代谢通路的差异丰度得分,见图 10 所示,得分 > 0 表示表达

趋势上调,反之为下调。一年生甘草与二年生甘草差异代谢物显著富集的通路中,异黄酮生物合成途径表达趋势上调,硫中继系统下调,二年生与三年生中异黄酮生物合成途径表达趋势下调,其中参与

表2 KEGG 注释到的差异代谢物分类及变化趋势

Tab. 2 Classification and changing trend of differential metabolites commented on by KEGG

物质类别 (compound class)	总数 (total number)	一年生 vs 二年生 (annual vs biennial)		二年生 vs 三年生 (biennial vs three years old)		一年生 vs 三年生 (annual vs three years old)	
		上调(up)	下调(down)	上调(up)	下调(down)	上调(up)	下调(down)
		黄酮类(flavonoids)	40	22	6	4	21
氨基酸及其衍生物(amino acids and derivatives)	24	-	5	3	10	1	17
有机酸类(organic acid)	16	3	1	2	4	3	10
糖类及维生素类(saccharides)	11	3	1	-	3	5	3
酚酸类(phenolic acids)	10	4	1	1	8	1	2
核苷酸及其衍生物(nucleotides and derivatives)	8	-	4	3	3	1	4
生物碱类(alkaloids)	7	3	2	1	2	1	2
脂质类(lipids)	2	-	-	-	1	-	2
维生素(vitamins)	2	-	-	-	2	-	2

表3 参与23条被显著富集到的代谢通路的代谢物类别及其变化趋势

Tab. 3 Types of metabolites involved in 23 significantly enriched metabolic pathways and their changing trends

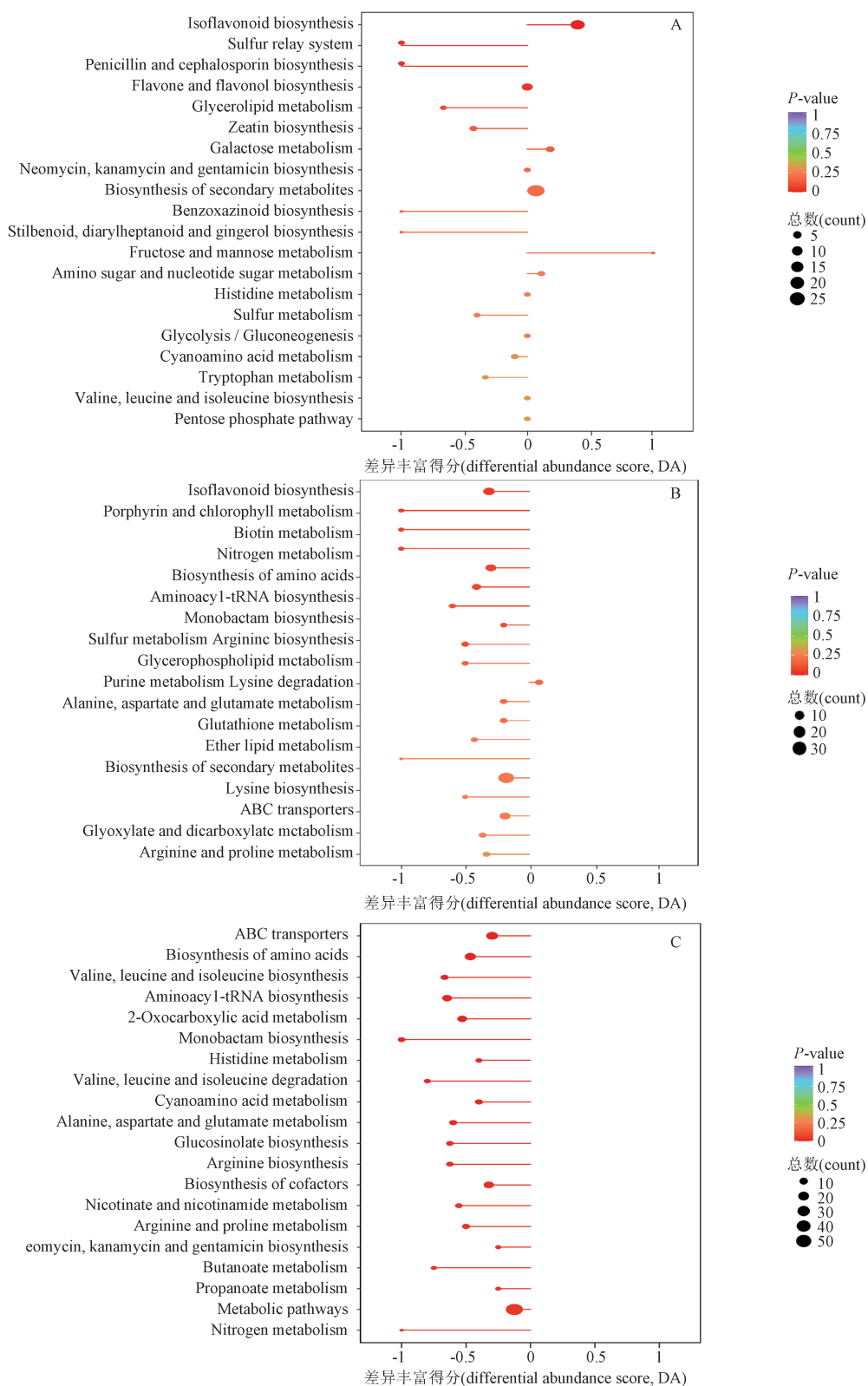
物质类别 (compound class)	总数 (total number)	一年生 vs 二年生 (annual vs biennial)		二年生 vs 三年生 (biennial vs three years old)		一年生 vs 三年生 (annual vs three years old)	
		上调(up)	下调(down)	上调(up)	下调(down)	上调(up)	下调(down)
		黄酮类(flavonoids)	30	19	5	3	16
氨基酸及其衍生物(amino acids and derivatives)	24	-	5	3	10	1	17
有机酸类(organic acid)	16	3	1	2	4	3	10
糖类及维生素类(saccharides)	10	3	1	-	2	5	2
酚酸类(phenolic acids)	7	3	0	1	6	1	1
核苷酸及其衍生物(nucleotides and derivatives)	6	-	3	2	2	0	3
生物碱类(alkaloids)	5	3	1	1	1	1	0
脂质类(lipids)	1	-	-	-	0	-	1
维生素(vitamins)	2	-	-	-	2	-	2

异黄酮生物合成途径的差异代谢物全为黄酮类代谢物,表达趋势与上文中黄酮类差异代谢物的累积趋势相一致,说明异黄酮生物合成途径可能是造成不同年限甘草中黄酮类代谢物差异的主要原因。此外一年与三年生甘草差异代谢物的19条显著富集通路表达趋势全部下调,而参与这些通路的差异代谢物主要是以氨基酸及其衍生物(35.29%)、有机酸类(25.49%)、糖类(13.73%)为主的初级代谢物,分析认为生长过程中大量初级代谢产物不断参与到植物的代谢活动中是甘草一年生与三年生甘草间大量初级代谢物产生差异的主要原因,如氨基酸可作为黄酮类和其他类化合物合成的前体化合物^[18],葡萄糖参与糖酵解、磷酸戊糖、糖原合成

与分解、糖异生等多种代谢途径,为植物生长发育提供能量的同时,也是多种次生代谢物合成的原料。

4 讨论

中药的质量差异很大程度上源于其生化基础,即活性成分的含量及数量,从化学成分的角度来看,代谢组学在完善中药质量控制体系具有巨大优势^[19]。2020年版《中华人民共和国药典》以甘草苷、甘草酸为指标性成分对甘草的质量进行控制^[20],先后有研究发现利用甘草苷、甘草酸及其代谢相关物质含量可以对甘草的不同炮制品及不同炮制程度、不同基原进行区分^[13,21-23]。本研究甘草苷与甘草酸含量变化趋势与前人研究一致,但甘草苷、甘草酸



A, B, C. 分别为一年生与二年生、二年生与三年生、一年生与三年生通路差异分布得分图 (A, B, and C are plots of the distribution of scores for annual versus biennial, biennial versus three - years old, and annual versus three - years old pathway differences, respectively)

图 10 基于 KEGG 数据库的代谢通路差异丰度得分图

Fig. 10 Differential abundance score map of metabolic pathways based on KEGG database

含量在不同年限甘草中差异并不显著,通过查阅相关文献发现本研究筛选的某些共有差异代谢物活性与甘草及其配伍应用的药理活性存在密切关系^[24],如甘草查尔酮 D、刺果甘草查耳酮 C、鼠李素等黄酮类成分具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、抗病毒、抗菌等多种药理活性^[25-28],甘草皂苷 P2 具有一定的肝保护活性^[29],L-缬氨酸可减轻心律失常,并具有降压作用^[30],山楂酸具有抗炎、抗肿瘤、降低血糖等多种药理活性^[31]。庞溢媛等^[32]研究发现以不同的化合物作为目标成分的往往最佳采收期存在差异,通过对不同年限甘草的差异代谢物及其相关代谢物的生物活性进行深入研究对甘草不同用途下采收期确定具有一定的参考价值。

黄酮类和三萜类化合物作为甘草中主要的活性物质,也是导致品质差异的主要内在原因^[6]。本研究筛选到的黄酮类和三萜类差异代谢物分别占差异代谢物总数(366个)的42.08%和8.47%,通过K-均值聚类分析分析可见大多数黄酮类和三萜类差异代谢物随生长年限的延长在甘草体内得到生成与累积,部分该类代谢物含量随生长年限的增长而降低可能与代谢物间的相互转化有关,如查尔酮可在查尔酮异构酶的催化下生成二氢黄酮,二氢黄酮在各种酶的催化下又可转化为类黄酮物质及花青素^[33],本研究中甘草在第3年生长期中随着黄酮醇、黄酮、异黄酮等差异代谢物上调,大多数二氢黄酮和查尔酮类差异代谢呈现下调趋势或与此有关。一些氨基酸及其衍生物、酚酸类、有机酸类、核苷酸及其衍生物等差异代谢物也可以说明不同栽培年限甘草品质间存在的差异,特别是L-缬氨酸、L-赖氨酸丁酸酯、5-乙酰氨基戊酸、双氢芝麻酥等随生长年限的延长一直呈现固定变化趋势的代谢物可作为重点关注的对象,对其生物活性及其在甘草体内活性物质生成中所发挥的作用进行深入研究,对不同年限甘草品质差异的识别及评价有重要意义,如L-缬氨酸不仅具有一定的生物活性,同时也是黄酮类和其他类化合物的前体化合物^[18,30],通过其含量变化一定程度上也可以用来说明不同年限甘草间品质存在的差异。

植物代谢物的生成与转化会受到功能基因的调控,以甘草酸为例,甘草次酸作为甘草酸合成的前体化合物,其向甘草酸的转移过程受到GuGT14、UGT73P12等多种糖基转移酶的催化^[34],甘草次酸之前的合成又涉及3-羟基-3-甲基戊二酰CoA还

原酶、鲨烯合酶、细胞色素P450等多种酶的调控^[35],研究表明这些酶基因的表达与甘草酸的生成密切相关^[36],本研究中栽培期第2年甘草酸与甘草次酸含量均升高,甘草次酸显著升高并表现为差异代谢物,但随着栽培期第3年甘草酸大量生成,甘草次酸含量又呈现显著降低的变化趋势,分析认为甘草酸与甘草次酸之间糖基转化酶及上述相关酶基因在不同时期的选择性表达可能是造成这种差异的主要原因,如刘颖等^[37]研究发现甘草的不同部位及不同时期同一部位中 β -AS基因的表达存在差异,同时考虑到目前植物代谢物数据库所搜集的代谢物数量种类尚不能完全满足对植物所有代谢物进行分析的要求,已有的研究表明多组学在揭示代谢物合成通路、调控基因和异源合成等方面具有重要作用^[38],因此结合基因组、转录组从多个层面解析不同时期甘草的生长发育及生物合成和调控机制,对甘草品质形成、质量评价及活性化合物的生物合成机制研究具有重要意义,可为甘草品质提升及资源可持续利用提供参考依据。

参考文献

- [1] 刘尽美,王清亮,姚天文,等.甘草应用分布及用量规律研究[J].中华中医药学刊,2014,32(12):3021
LIU JM, WANG QL, YAO TW, et al. Research on distribution and dosage of licorice[J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2014, 32(12): 3021
- [2] 万修福,杨野,康传志,等.林草中药材生态种植现状分析及展望[J].中国现代中药,2021,23(8):1311
WAN XF, YANG Y, KANG CZ, et al. Current situation and future perspectives of ecological planting of Chinese medicinal plants in forests and grasslands[J]. Mod Chin Med, 2021, 23(8): 1311
- [3] 边育红,王丽,张晓雨,等.甘草产业链的现状与技术提升[J].天津中医药大学学报,2020,39(1):19
BIAN YH, WANG L, ZHANG XY, et al. Current situation and technology improvement of licorice industry chain[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2020, 39(1): 19
- [4] 范铭,曹爱农,晋小军,等.陇中半干旱地区不同年限甘草生长与有效成分积累动态研究[J].西北农业学报,2016,25(10):1522
FAN M, CAO AN, JIN XJ, et al. Growth and accumulation of active components of licorice in different growth years in seiarid region of middle of Gansu province[J]. Acta Agric Boreali - Occident Sin, 2016, 25(10): 1522
- [5] 黄帅,元林,马森.不同种植年限的光果甘草对人乳腺癌细胞增殖抑制作用的研究[J].石河子大学学报(自然科学版),

- 2009, 27(5): 571
HUANG S, YUAN L, MA M. Comparative studies on the anti-proliferation effects of *Glycyrrhiza glabra* with different living span on human breast cancer BCAP cell [J]. *J Shihezi Univ (Nat Sci)*, 2009, 27(5): 571
- [6] 李娜, 张晨, 钟赣生, 等. 不同品种甘草化学成分、药理作用的研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. *中草药*, 2021, 52(24): 7680
LI N, ZHANG C, ZHONG GS, *et al.* Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of different varieties of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* and predictive analysis of quality markers[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(24): 7680
- [7] 陈佳, 杨蕊, 张权, 等. HPLC结合化学计量学方法用于不同生长年限甘草药材黄酮类成分特征图谱研究[J]. *中国药学杂志*, 2020, 55(17): 1415
CHEN J, YANG R, ZHANG Q, *et al.* Specific chromatograms of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. flavonoids in different growth years by HPLC coupled with chemometric analysis [J]. *Chin Pharm J*, 2020, 55(17): 1415
- [8] 薄颖异, 张鲁, 常冠华, 等. 不同生长期甘草地上部分黄酮类化合物的含量研究[J]. *西北药学杂志*, 2020, 35(5): 639
BO YY, ZHANG L, CHANG GH, *et al.* Research on the content variation of flavonoids in the aerial parts of *Glycyrrhiza uralensis* during different growth periods [J]. *Northwest Pharm J*, 2020, 35(5): 639
- [9] 刘贤青, 罗杰. 植物代谢组学技术研究进展[J]. *科技导报*, 2015, 33(16): 33
LIU XQ, LUO J. Advances of technologies and research in plant metabolomics [J]. *Sci Technol Rev*, 2015, 33(16): 33
- [10] 田淑云, 廖朝华, 周紫薇, 等. 植物代谢组学在药材质量评价中的研究进展与展望[J]. *药学学报*, 2022, 57(6): 1734
TIAN SY, LIAO CH, ZHOU ZW, *et al.* Research progress and prospects for the use of plant metabolomics in quality evaluation of traditional Chinese medicinal materials [J]. *Acta Pharm Sin*, 2022, 57(6): 1734
- [11] LIAO WC, LIN YH, CHANG TM, *et al.* Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components [J]. *Food Chem*, 2012, 132(4): 2188
- [12] WANG CC, CAI ZC, SHI JJ, *et al.* Comparative metabolite profiling of wild and cultivated licorice based on ultra-fast liquid chromatography coupled with triple quadrupole-time of flight tandem mass spectrometry [J]. *Chem Pharm Bull*, 2019, 67(10): 1104
- [13] 文旺, 李莉, 李德坤, 等. 基于液质联用技术和植物代谢组学的甘草炮制品化学成分差异性分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(17): 104
WEN W, LI L, LI DK, *et al.* Analysis of chemical variability on different processed products of *Glycyrrhiza uralensis* dry roots and rhizomes based on UPLC-Q-TOF-MSE and plant metabolomics [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(17): 104
- [14] 吴昊, 于小红, 马光朝, 等. 基于LC-MS的甘草炮制雷公藤降低肝毒性的代谢组学研究[J]. *中草药*, 2020, 51(21): 5501
WU H, YU XH, MA GC, *et al.* Metabolomics study on reduction of hepatotoxic of *Tripterygium wilfordii* processed by liquorice based on LC-MS [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(21): 5501
- [15] CHEN W, GONG L, GUO Z, *et al.* A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics [J]. *Mol Plant*, 2013, 6(6): 1769
- [16] 高渐飞, 周玮, 刘妮, 等. 基于代谢组学分析黑老虎植株不同部位黄酮类成分[J]. *广西植物*, 2022, 42(7): 1193
GAO JF, ZHOU W, LIU N, *et al.* Analysis of flavonoids in different tissues of *Kadsura coccinea* plant by widely-targeted metabolomics [J]. *Guihaia*, 2022, 42(7): 1193
- [17] FRAE CG, CLOWERS BH, MOORE RJ, *et al.* Signature-discovery approach for sample matching of a nerve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(10): 4165
- [18] SONG W, QIAO X, CHEN K, *et al.* Biosynthesis-based quantitative analysis of 151 secondary metabolites of licorice to differentiate medicinal *Glycyrrhiza* species and their hybrids [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(5): 3146
- [19] 李震宇, 段亚辉, 秦雪梅, 等. 中药质量差异性研究的思考[J]. *药学学报*, 2017, 52(12): 1820
LI ZY, DUAN YH, QIN XM, *et al.* Study of difference in quality of traditional Chinese medicines [J]. *Acta Pharm Sin*, 2017, 52(12): 1820
- [20] 中华人民共和国药典 2020年版. 一部[S]. 2020: 88
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 88
- [21] 姚玲玲, 柯昌强, 刘佳, 等. 不同炮制程度中药饮片蜜炙甘草的次生代谢化学成分组学研究[J]. *药学学报*, 2021, 56(5): 1444
YAO LL, KE CQ, LIU J, *et al.* Metabolomic investigation of secondary metabolites of prepared slices of *Glycyrrhiza uralensis* with different degrees of honey processing [J]. *Acta Pharm Sin*, 2021, 56(5): 1444
- [22] 杨瑞, 李文东, 袁伯川, 等. 3种不同基原甘草中18 α -甘草酸与18 β -甘草酸的含量分析[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(6): 1065
YANG R, LI WD, YUAN BC, *et al.* Simultaneous determination of 18 α -glycyrrhizic acid and 18 β -glycyrrhizic acid in three licorice samples from different origin by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(6): 1065
- [23] 杨瑞, 李文东, 马永生, 等. 不同基原甘草的分子鉴定及市售甘草药材的质量评价[J]. *药学学报*, 2017, 52(2): 318
YANG R, LI WD, MA YS, *et al.* The molecular identification of licorice species and the quality evaluation of licorice slices [J]. *Acta Pharm Sin*, 2017, 52(2): 318

- [24] 李泽宇, 郝二伟, 李卉, 等. 甘草配伍应用的药理作用及机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(14): 270
LI ZY, HAO EW, LI H, *et al.* Pharmacological effect of *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* compatibility and its mechanism[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2022, 28(14): 270
- [25] SEO JH, CHOI HW, OH HN, *et al.* Licochalcone D directly targets JAK2 to induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(2): 1780
- [26] KIM SS, LIM J, BANG Y, *et al.* Licochalcone E activates Nrf2/ antioxidant response element signaling pathway in both neuronal and microglial cells: therapeutic relevance to neurodegenerative disease[J]. *J Nutr Biochem*, 2012, 23(10): 1314
- [27] LIN Y, KUANG Y, LI K, *et al.* Screening for bioactive natural products from a 67 - compound library of *Glycyrrhiza inflata*[J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(14): 3706
- [28] MEDEIROS DL, LIMA ETG, SILVA JC, *et al.* Rhamnetin: a review of its pharmacology and toxicity[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2022, 74(6): 793
- [29] ZHENG YF, WEI JH, FANG SQ, *et al.* Hepatoprotective triterpene saponins from the roots of *Glycyrrhiza inflata*[J]. *Molecules*, 2015, 20(4): 6273
- [30] MITREGA K, ZORNIAC M, VARGHESE B, *et al.* Beneficial effects of *L* - leucine and *L* - valine on arrhythmias, hemodynamics and myocardial morphology in rats[J]. *Pharmacol Res*, 2011, 64(3): 218
- [31] 李宣, 何迎春, 周芳亮. 山楂酸药理作用及其机制的研究进展[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(8): 49
LI X, HE YC, ZHOU FL. Research advance or pharmacological effects and mechanisms of maslinic acid[J]. *China J Mod Med*, 2021, 31(8): 49
- [32] 庞溢媛, 薛立英, 郑艳红, 等. 基于 UHPLC - MS/MS 代谢组学技术的不同采收期黄芩质量比较研究[J]. 药学学报, 2017, 52(12): 1903
PANG YY, XUE LY, ZHENG YH, *et al.* Comparative study on quality of *Scutellaria baicalensis* Georgi in different harvest periods using UHPLC - MS/MS metabolomics technology[J]. *Acta Pharm Sin*, 2017, 52(12): 1903
- [33] TANAKA Y, BRUGLIERA F, KALC G, *et al.* Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: practical perspectives[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2010, 74(9): 1760
- [34] 陈亚超, 李楠楠, 刘子迪, 等. 源于甘草内生菌的甘草酸合成相关功能基因的宏基因组挖掘[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(9): 37
CHEN YC, LI NN, LIU ZD, *et al.* Metagenomic mining of functional genes related to glyrrhizin synthesis from endophytes licorice [J]. *China Biotechnol*, 2021, 41(9): 37
- [35] 刘春生, 刘颖. 药用植物功能基因的研究思路与展望—以甘草为例[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(1): 1
LIU CS, LIU Y. Research ideas and projects of functional genes involved in medicinal plants, such as *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2015, 21(1): 1
- [36] MOCHIDA K, SAKURAI T, SEKI H, *et al.* Draft genome assembly and annotation of *Glycyrrhiza uralensis*, a medicinal legume [J]. *Plant J*, 2017, 89(2): 181
- [37] 刘颖, 刘春生. 甘草 β - AS 基因时空表达模式研究[J]. 中药材, 2012, 35(4): 528
LIU Y, LIU CS. Study on the spatial and temporal expression of β - AS gene of *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *J Chin Med Mater*, 2012, 35(4): 528
- [38] 梁浩, 孙海, 钱佳奇, 等. 药用植物代谢调控的组学研究进展[J]. 中药材, 2023(8): 2085
LIANG H, SUN H, QIAN JQ, *et al.* Progress in histological studies of metabolic regulation in medicinal plants [J]. *J Chin Med Mater*, 2023(8): 2085

(本文于 2023 年 12 月 11 日修改回)