

应用液质联用代谢组学技术探究 Pb^{2+} 胁迫对大麦籽粒中差异代谢物及关键通路的影响

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

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

摘要: 为评估铅(Pb^{2+})污染对大麦籽粒的影响。该研究应用液相色谱-质谱联用(LC-MS)代谢组学技术, 结合主成分分析(PCA)、偏最小二乘-判别分析(PLS-DA)等多元统计学方法, 在正、负离子模式中, 将 Pb^{2+} 胁迫大麦籽粒(GS1600)与对照组(GSCK)中共筛选出 50 种差异代谢物。研究发现: Pb^{2+} 胁迫对大麦中的脂质和类脂分子、有机酸及衍生物、有机氧化合物、有机杂环化合物含量变化影响显著。并通过 KEGG 功能通路富集分析, 筛选出 16 条代谢通路, 其中 4 条代谢通路(柠檬酸循环、谷胱甘肽代谢、糖氧化合物和二羧酸代谢、苯丙烷代谢)为命中差异代谢物的关键代谢通路。结果表明, 大麦受到胁迫后, Pb^{2+} 通过影响氨基酸代谢、碳水化合物代谢、辅因子和维生素的代谢以及其他次生代谢产物的生物合成对大麦中脂质和类脂分子、苯环型化合物及有机氧化合物等代谢物产生显著影响。说明 Pb^{2+} 胁迫会对大麦籽粒的营养价值和风味品质造成一定的影响。

关键词: 大麦籽粒; Pb^{2+} 胁迫; 液相色谱-质谱联用(LC-MS); 非靶向代谢组学; KEGG 通路分析

文章编号: 1673-9078(2023)11-101-110

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.11.1554

Liquid Chromatography-mass Spectrometry Investigation of Differential Metabolites and Key Pathways in Barley Grains under Pb^{2+} Stress

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

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

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

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

(4.National Coarse Cereals Engineering Research Center, Daqing 163319, China)

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

Abstract: Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) metabolomics technology combined with principal component analysis (PCA), partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA), and other multivariate statistical methods were used to evaluate the effects of lead (Pb^{2+}) contamination on barley grains. In positive and negative ion modes, 50 differential metabolites were identified from Pb^{2+} stressed barley grain plants (GS1600) and control grains (GSCK). The results showed that Pb^{2+} stress significantly affected the amount of lipids and lipid-like molecules, organic acids and derivatives, organic oxygen compounds, and organic heterocyclic compounds in barley. Through KEGG pathway

引文格式:

王冀菲, 曹冬梅, 崔航, 等. 应用液质联用代谢组学技术探究 Pb^{2+} 胁迫对大麦籽粒中差异代谢物及关键通路的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(11): 101-110

WANG Jifei, CAO Dongmei, CUI Hang, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry investigation of differential metabolites and key pathways in barley grains under Pb^{2+} stress [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(11): 101-110

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFE0206300); 杂粮及制品安全风险评价及标准体系建设项目(2018YFE0206300-10); 黑龙江省优势特色学科资助项目(黑教联[2018]4号); 黑龙江八一农垦大学博士启动金(2031011014)

作者简介: 王冀菲(1998-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 农产品安全, E-mail: 391676122@qq.com

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

enrichment analysis, 16 metabolic pathways were identified, of which five metabolic pathways (citric acid cycle, glutathione metabolism, sugar oxidation, dicarboxylic acid metabolism, and phenylpropanoid metabolism) were the key metabolic pathways used to produce differential metabolites. The results showed that Pb^{2+} significantly affected lipids and lipid-like molecules, benzene ring compounds, and organic oxygen compounds in barley by affecting amino acid metabolism, carbohydrate metabolism, cofactor and vitamin metabolism, and biosynthesis of other secondary metabolites after stress. These results indicated that Pb^{2+} stress could affect the nutritional value and flavor quality of barley grains.

Key words: barley grain; lead stress; liquid chromatography-mass spectrometry; non-targeted metabolomics; pathway analysis

大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 是禾本科作物, 别名牟麦、饭麦、赤膊麦, 与小麦的营养成分近似, 但纤维素含量略高, 为全球第五大粮食作物^[1]。大麦的籽粒收获后主要应用于啤酒酿造、食品加工、食品保健品等。相比于其他谷物类作物, 大麦含有丰富的可溶性 β -葡聚糖纤维、淀粉、蛋白质、多酚^[2-6]、抗氧化酶和类黄酮等营养物质, 可调节人体肠道菌群, 降低人体患慢性疾病的风险。同时, 大麦能够抵御生物及非生物胁迫^[7-10], 对生长环境变化感知灵敏, 使大麦成为 Pb^{2+} 胁迫生长条件下探究营养物质变化的理想作物模型。随着工业化进程的发展, 田间农药^[11]和磷肥^[12]的大量使用、粮食产品加工后的废弃排放等行为, 导致土地金属污染现象越来越严重。我国耕地土壤的污染指数达 19.4%, 其中重金属 Pb^{2+} 为土壤环境污染的主要污染物之一, 点位超标率达 1.5%^[13], 超标土壤面积达 9.45 万 km^2 。土壤受到 Pb^{2+} 污染的影响, Pb^{2+} 随粮食作物生长进入食物链并在人体中富集, 当超过人体耐受极限值后容易引起严重的急性 Pb^{2+} 中毒^[14], 危害人体健康。

研究植物内源代谢物^[15], 代谢组学可以对其进行一个相对全面的分析^[16]。因此, 选择代谢组学技术对 Pb^{2+} 胁迫条件下大麦中产生的代谢产物进行差异研究^[17]。目前, 代谢组学常用检测方法有核磁共振^[18-20]、气相色谱-质谱联用^[21]、液相色谱-质谱联用^[22]以及近年来新兴的毛细管电泳-质谱联用^[23]技术。LC-MS 液相色谱作为分离系统, 具备分析分离性能好、灵敏度高和专属性强等优势, 适用于植物代谢差异代谢物的定性定量分析。罗庆^[24]应用 LC-MS 代谢组学技术探究不同 Pb 浓度胁迫下的东南景天根分泌物的差异变化, 定性出 16 种差异代谢物, 糖脂代谢和能量循环差异变化显著。郭山等^[25]通过使用 LC-MS 技术, 对不同浓度 Cd 胁迫下的凤眼莲代谢物进行差异分析, 筛选主要发生变化的代谢通路和有机酸代谢及氨基酸代谢有关。王晶晶^[26]探究青梗菜在不同浓度 Cr 胁迫下植物体内小分子代谢物及代谢通路分析, 从青梗菜筛选出多种差异代谢物, 氨基酸代谢和能量代谢通路响应了不同浓度的 Cr 胁迫。Zhao 等^[27]采用高效液相色谱-质谱联用技术探究低温条件下影响草菇品质的

差异代谢物, 共有 216 个差异代谢物, 主要差异产生涉及氨基酸代谢、碳水化合物代谢等 39 条代谢通路。本实验以 Pb^{2+} 胁迫生长的大麦为原材料, 进行代谢组学分析, 筛选出具有代表性的差异代谢物及代谢通路, 以探究大麦对 Pb^{2+} 胁迫的响应机制及 Pb^{2+} 胁迫对大麦营养价值的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

选取优质 CK15 大麦, 购自黑龙江省佳木斯农科院; 硝酸铅, 购自郑州中天泓达化工科技有限公司; 甲醇(色谱纯)、乙腈(分析纯), 均购自 Fisher Chemical 公司; 甲酸, 购自 CNW 公司; 异丙醇, 购自 Merck 公司; L-2-氯苯丙氨酸, 购自 Adamas-beta 有限公司。本研究在实验过程中为消除其余可能存在的金属离子对结果准确性的影响, 故实验全程均使用去离子水。

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

1.2 实验方法

1.2.1 大麦模拟田间种植实验

选取大小均匀一致、饱满、健康无损伤的 CK15 大麦种子, 放入 $m=10\%$ 次氯酸钠溶液中浸泡 10 min 后用去离子水反复冲洗 3~5 次, 于干燥通风的环境中放置 24 h 自然风干^[28]。种植区选择在黑龙江八一农垦大学试验田进行模拟田间实验, 并采集农田表层耕作土壤, 平铺在塑料薄膜上风干, 压碎, 剔除其中的根系及石块后过筛待用; 种植时每株大麦间隔 5 cm, 每组大麦种植 12 箱, 播种在塑料箱(长 0.6 m, 宽 0.5 m, 高 0.45 m)中^[29]。取 12.5 kg 过筛后土壤, 使用从前期萌发实验中确定的 Pb^{2+} 含量 (1 600 mg/kg 土壤) 进行土壤拌种, 将硝酸铅与土壤混合均匀后开始种植大麦, 并分别于 7、10、14 d 合理间苗, 保证每箱 4~6 株大麦幼苗。

1.2.2 代谢组学样品制备

将收获后的大麦籽粒经冷冻组织研磨仪研磨 6 min 后过 100 目筛,称取过筛后样品 50 mg 至 2 mL 离心管中,加入研磨珠、400 μ L 提取液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=4:1$)与 0.02 mg/mL 内标(L-2-氯苯丙氨酸)。将样品置于 -20 $^{\circ}$ C 中低温超声 30 min;超声结束后于 12 000 r/min 离心 15 min,使用移液枪吸取静置后上清液于进样瓶中上机检测,剩余样品分别吸取等量上清液混合成质控样品(QC)上机检测。

1.2.3 LC-MS 代谢组学设备及参数设置

本研究数据使用 UHPLC -Q Exactive HF-X 系统进行代谢组学分析。所选用色谱柱为:ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm $\times$ 2.1 mm i.d., 1.8 μ m; Waters, Milford, USA),具体质谱参数设置如表 1 所示。

表 1 质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters		
描述	Description	参数
扫描范围	Scan type (m/z)	70~1 050
鞘气流速	Sheath gas flow rate (Arb)	50
辅助气流速	Aux gas flow rate (Arb)	13
加热温度	Heater temp/ $^{\circ}$ C	425
毛细管温度	Capillary temp/ $^{\circ}$ C	325
喷雾电压(正模式)	Spray voltage (+) /V	3 500
喷雾电压(负模式)	Spray voltage (-) /V	-3 500
S-Lens 电压	S-Lens RF Level	50
碰撞能	Normalized collision energy/eV	20、40、60
分辨率(Full MS)	Resolution (Full MS)	60 000
分辨率(MS2)	Resolution (MS2)	7 500

1.2.4 数据处理

多元数据分析应用 R 软件包进行数据处理以及峰的提取和对齐,再通过 PCA、PLS-DA。应用学生式 t 检验结合 PLS-DA 的多变量分析($P<0.05$, $VIP>1$),用来筛选差异代谢物,以揭示 GSCK-GS1600 组大麦籽粒的代谢物类型和关键代谢途径的差异。采用 Pearson 相关检验系数进行相关分析,同时使用 HMDB 进一步鉴定代谢产物分子;最后将筛选出的差异代谢物进行 KEGG 数据库注释分析对差异代谢物参与的代谢途径进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 多元统计学分析

2.1.1 主成分分析(PCA)

图 1a、b 分别为正、负离子模式下 GSCK-GS1600 组的 PCA 得分图。由图中可以看出,所有样本点均处

在置信区间内,且组间样本点分离度良好;组内样本点稍有部分聚集,推测为品种相同所导致代谢物相似。有研究表明, Pb^{2+} 对于大麦苗期营养物质影响极显著^[30],而相同培养条件下 Pb^{2+} 胁迫对于大麦籽粒的代谢产物有何明显差异,使得后续针对数据进行的 PLS-DA 分析更为重要。

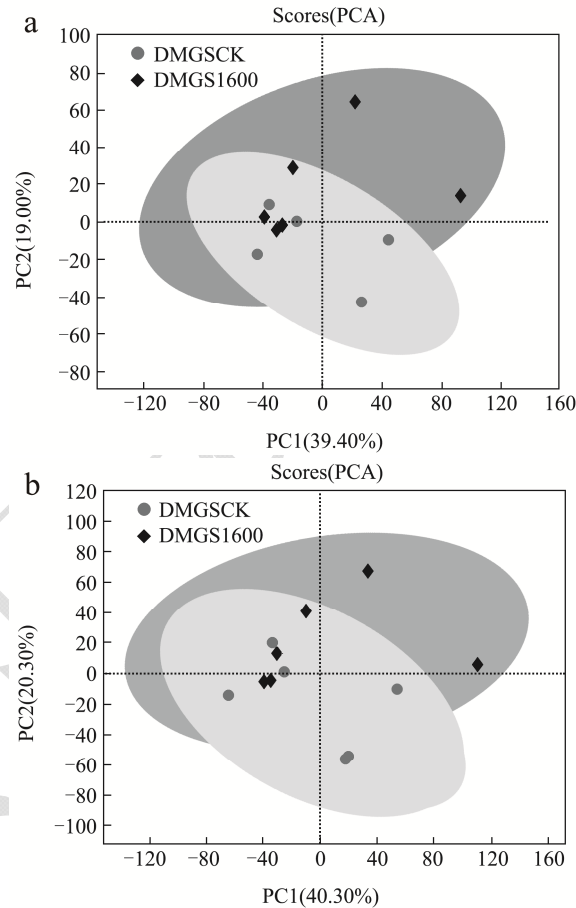


图 1 Pb^{2+} 胁迫 GSCK-GS1600 组 PCA 得分图

Fig.1 PCA score map of Pb^{2+} stress GSCK-GS1600 group

注:(a)正离子模式;(b)负离子模式。图 2 同。

2.1.2 偏最小二乘判别-分析(PLS-DA)

图 2a、2b 分别为正、负离子模式下 GSCK-GS1600 组的 PLS-DA 得分图。所有的数据在建立 PLS-DA 模型时,均通过 200 次响应排序检验(RPT)进行验证,且结果显示 $Q^2>0.5$,说明实验数据没有假阳性现象,模型具有更高的可靠性。基于 PLS-DA 结合帕莱托换算(Par)得分图显示,GSCK-GS1600 组样本点的分离趋势明显、程度大,说明分类效果显著,即可以清晰的解释实验组与对照组之间的差异,证明 Pb^{2+} 胁迫对大麦籽粒代谢物存在一定的影响,并且两组模型的预测能力较好、无过拟合现象。

由图 2a 的 PLS-DA 得分图可以看出 GS1600 组的大麦籽粒样本点对比 GSCK 组,其样本点分布的离散程度较好,说明大麦籽粒再受到 Pb^{2+} 胁迫后其内部代

谢物类型变化较大。在大麦生长过程中拌 Pb 土壤呈可溶态性 Pb^{2+} ，可以与植物螯合肽、金属硫蛋白等小分子肽形成络合物^[31,32]，堆积在大麦果实中，使 Pb^{2+}

对大麦的代谢产物在一定程度上发生改变，故呈现在 PLS-DA 得分图中。

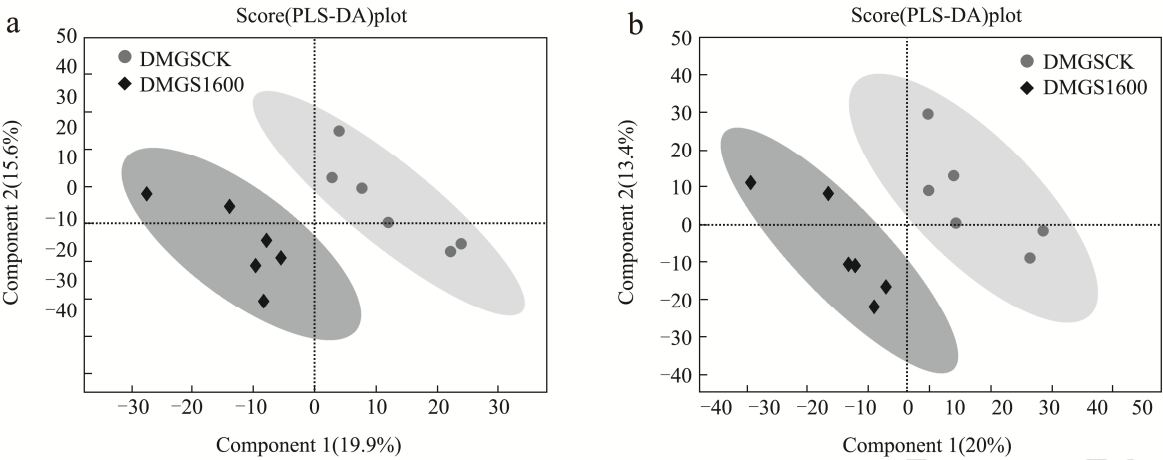


图 2 GSKC-GS1600 组 PLS-DA 得分图

Fig.2 PLS-DA score of GSKC-GS1600 group

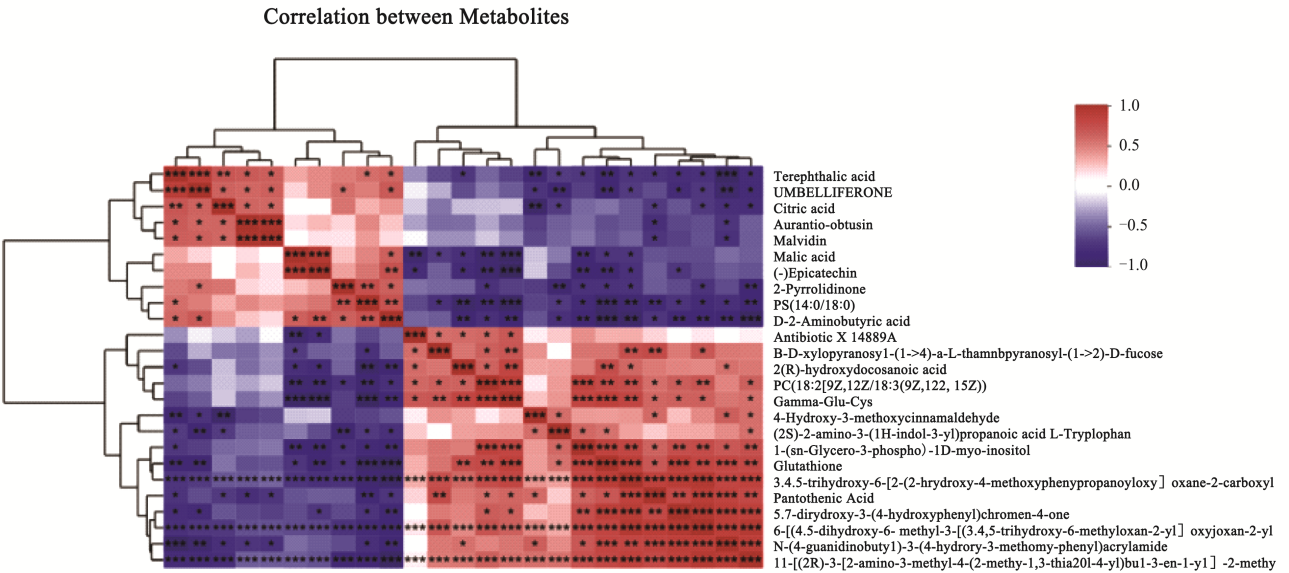


图 3 GSKC-GS1600 组差异代谢物相关性分析图

Fig.3 Correlation Analysis of differential metabolites between GSKC-GS1600 group

2.2 差异代谢物相关性分析

图 3 为通过 Pearson 相关分析所得到的 GSKC-GS1600 组差异代谢产物相关性图。在两组实验中，GSKC 组与 GS1600 组之间有几种不同的差异代谢物，其中对苯二甲酸、伞形酮、柠檬酸、橙钝叶决明素、马尔维丁、苹果酸、表儿茶素、2-吡咯烷酮、甘油磷脂、D-2-氨基丁酸化合物聚为一类，这些化合物在 GSKC 组与 GS1600 组中呈正相关，与其他代谢产物呈负相关 ($P<0.05$)，表明上述化合物的相对含量变化趋势相似，以上化合物均含有羧基及羟基，且多为杂环类化合物，说明有相似化学基团的代谢物在受 Pb^{2+} 胁迫大麦籽粒中有较强的相关性。

2.3 Pb^{2+} 胁迫大麦籽粒差异代谢物定性分析

图 4 为 GSKC-GS1600 组差异代谢物筛选火山图，图中每个点代表一个特定的代谢物，点的大小表示 VIP 值。从图中可以直观看出，含量下调的代谢物数量多于含量上调的代谢物数量；其中上调代谢物多数为苯环和有机杂环类化合物，下调代谢物多数为有机氧化合物、脂质化合物和有机酸。脂质类代谢物的减少会抑制细胞的生长和增值^[33]，减少大麦生长过程中的能量供应，营养成分流失。而大麦籽粒中有机酸含量的高低，将可能会直接影响大麦的品质^[34]，破坏其化学稳定性。GSKC-GS1600 两组样品之间的差异表明，当筛选条件 $VIP>1$ ， $P<0.05$ 时，阳离子模式下

共筛选出 26 个差异代谢物, 其中 11 个含量上调, 15 个含量下调; 阴离子模式下筛选出 24 个差异代谢物, 其中 9 个含量上调, 15 个含量下调。如表 2 中, 主要差异代谢物为: 有机杂环化合物、有机含氧化合物、脂质及类脂分子以及有机酸类化合物。在 Pb^{2+} 胁迫作用下, 植物体内次级代谢物开始增加, 促进有机酸等代谢物的合成。

通过表 2 可知, 在 GSCK-GS1600 组的差异代谢物对比中, 产生差异的多数为有机杂环类化合物和苯丙素聚酮类化合物。其中, GS1600 组存在 3 种有机杂环类化合物的代谢物、2 种苯丙素聚酮类的代谢物表达量显著高于 GSCK 组。根据差异代谢物鉴定结果分析可知, 甘油脂质类代谢物的含量呈下降趋势, 其中甘油二酯含量下降极显著。在大麦生长过程中, 由于重金属 Pb 的胁迫会诱导细胞生成大量活性氧, 改变了大麦内部氧化还原电位的稳定^[35]。有机氧类化合物整体呈上升趋势, 羧酸及其衍生物在大麦籽粒成熟阶段呈上升趋势, 谷胱甘肽及 L-同型谷胱甘肽含量显著上升, 且谷胱甘肽易被 H_2O_2 激发, 随着 Pb^{2+} 浓度的升高, 谷胱甘肽含量到达峰值后下降。甾醇类激素化合物呈上升趋势, 且甾醇 α 含量显著上调, 植物通

过分泌甾醇类激素与 Pb^{2+} 发生螯合^[36], 甾醇结构中含有活泼的酚羟基, 可通过捕获过量的自由基获得强抗氧化力, 来消除 Pb^{2+} 对叶绿素代谢通路的影响, 减少大麦在生长过程中产生叶面泛黄、黑色素显著增加^[37]等不良影响。

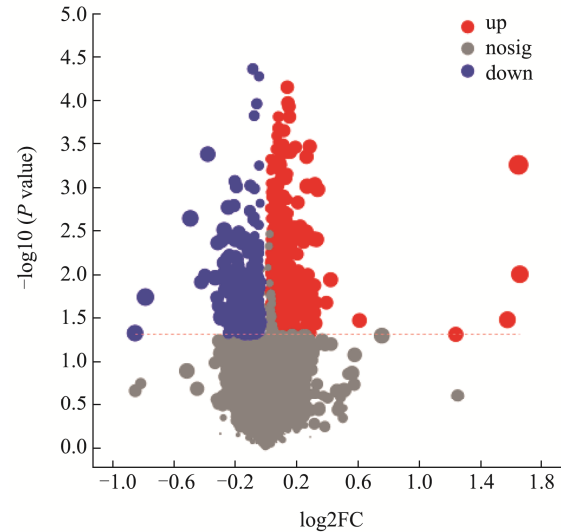


图 4 GSCK-GS1600 组差异代谢物筛选火山图

Fig.4 Screening diagram of differential metabolites between GSCK-GS1600 group

表 2 重要差异代谢物鉴定结果表

Table 2 Identification results of important differential metabolites

序号	代谢物名称	保留时间/s	荷质比	VIP_PLS-DA	倍数变化	P_value	含量变化
1	2-吡咯烷酮	0.57	86.06	0.82	1.02	0.04	+
2	高精氨酸	0.57	189.13	1.51	0.93	0.05	-
3	D-2-氨基丁酸	0.57	104.07	1.39	1.05	0.03	+
4	甘油磷酸肌醇	0.62	333.06	1.33	0.96	0.01	-
5	醇酮酸	0.73	141.02	1.40	1.07	0.05	+
6	苹果酸	0.81	133.01	1.15	1.02	0.01	+
7	甲基 β -D-吡喃葡萄糖苷	0.88	212.11	1.06	0.97	0.02	-
8	5-单磷酸氟脱氧尿苷	0.89	291.02	2.08	1.12	0.02	+
9	2-甲酰氧甲基克拉瓦姆	0.98	172.06	1.61	1.08	0.02	+
10	谷胱甘肽	1.15	306.08	2.44	0.88	0.01	-
11	γ -谷氨酰胺-半胱氨酸	1.24	251.07	2.08	0.91	0.00	-
12	柠檬酸	1.25	191.02	1.49	1.03	0.03	+
13	辅酶 I	1.76	662.10	1.44	0.94	0.01	-
14	外加黄质 I	1.93	322.11	1.83	0.91	0.02	-
15	L-同型谷胱甘肽	1.93	320.09	1.56	0.93	0.01	-
16	7-恶嗪	2.01	327.09	1.16	1.05	0.03	+
17	甲氧基肉桂醛	2.02	420.15	1.38	0.97	0.02	-
18	亚砷基十一酸	2.07	641.19	1.15	0.96	0.04	-
19	3-甲氧基苯甲酸酯	2.19	329.09	1.09	0.97	0.05	-
20	泛酸	2.31	439.22	1.36	0.96	0.01	-
21	2-羧酸	2.43	360.13	1.72	0.94	0.00	-

续表 2

序号	代谢物名称	保留时间/s	荷质比	VIP_PLS-DA	倍数变化	P_value	含量变化
22	烟碱烯	2.49	159.09	1.56	0.94	0.01	-
23	3-甲基吡啶	2.5	132.08	1.47	0.94	0.01	-
24	3,4,5-三羟基四醇	2.58	493.16	1.28	0.96	0.02	-
25	丙酸色氨酸	2.66	203.08	1.10	0.96	0.05	-
26	6-甲基吡喃	2.74	125.02	1.01	1.03	0.03	+
27	D-岩藻糖	2.78	463.15	1.23	0.97	0.01	-
28	几丁质葡萄糖醛酸	2.91	387.09	1.54	0.94	0.01	-
29	(-)表儿茶素	3.01	289.07	1.48	1.05	0.01	+
30	苯酰甲酸	3.02	151.04	1.17	0.96	0.01	-
31	对羟基丙烯酸	3.02	147.04	1.03	0.97	0.02	-
32	4-甲氧基苯基	3.03	417.10	1.39	0.96	0.01	-
33	丙烯酰胺	3.15	307.18	1.57	0.94	0.03	-
34	对苯二甲酸	3.19	165.02	1.81	1.07	0.00	+
35	伞形酮	3.43	163.04	1.58	1.06	0.03	+
36	4-羟基苯基酮	3.62	593.15	1.33	0.96	0.05	-
37	环氧乙烷	5.36	253.18	1.55	1.11	0.04	+
38	酪胺葡萄糖醛酸	5.73	278.10	2.23	1.12	0.00	+
39	γ -戊内酯	5.74	250.11	2.25	1.16	0.00	+
40	马尔维丁	5.83	331.08	1.09	1.02	0.05	+
41	橙钝叶决明素	5.83	329.07	1.33	1.03	0.01	+
42	N4-羟胺	5.84	314.04	1.18	1.03	0.01	+
43	3,5-二羟基苯基酮	5.84	299.02	1.40	1.05	0.00	+
44	甘油二酯	6.21	389.26	2.65	0.80	0.02	-
45	羟基二十二烷酸	6.35	393.28	1.07	0.97	0.05	-
46	抗生素 X 14889A	6.44	605.41	2.25	0.89	0.02	-
47	甾醇 α	6.55	453.33	2.02	0.89	0.05	-
48	施莱切他汀 6	6.65	431.35	2.39	0.84	0.03	-
49	甘油磷酸胆碱	6.73	780.55	1.09	0.98	0.04	-
50	甘油磷脂	7.87	736.52	1.09	1.02	0.02	+

注：表中“+”代表上升，“-”代表“下降”。

2.4 差异代谢物层次聚类分析

图 5 为 GSCK-GS1600 组差异代谢物层次聚类热图，显示不同种代谢物分类中具有生物活性的关键差异代谢物，直观展示差异代谢物的含量变化。由层次聚类图的右侧可以看出，GS1600 对比 GSCK 组中前 10 个差异代谢物的表达量显著增高，多为杂环类化合物及含苯环化合物和酪胺葡萄糖醛酸类代谢物，说明 Pb^{2+} 胁迫会使大麦籽粒中苯环类化合物和酪胺葡萄糖醛酸的表达量增加。

根据 HMDB 代谢组学数据库，GSCK-GS1600 组在阳离子和阴离子模式下共鉴定出 38 种差异代谢物，将其按化学类别分为 8 种脂质和类脂分子、7 种有机酸及衍生物、7 种有机氧化合物、5 种有机杂环化合物、

苯环型化合物、4 种苯丙素类和聚酮类化合物和 2 种类核苷、核苷酸类似物。与 GSCK 组相比，受到 Pb^{2+} 胁迫的大麦籽粒 GS1600 组的差异代谢物有明显的上调或下调，该结果与差异代谢物筛选火山图中所得到的研究结果一致，7 个分类中，各组中主要积累的代谢物为脂质和类脂分子、有机酸及衍生物以及有机氧化合物，而积累的含氮有机化合物、生物碱及衍生物以及核苷、核苷酸和类似物较少。有研究表明，脂质分子占大麦籽粒重量的 18%^[38]，其中甘油二酯、甘油磷脂等大麦中代表性脂质及类脂分子含量变化显著。在 Pb^{2+} 的胁迫下，大麦根系会分泌有机酸化合物来减轻重金属胁迫对大麦的影响^[39]，抵御 Pb^{2+} 对大麦生长过程及对大麦籽实产生的不良影响。可以将类脂分子、有机酸和有机含氧化合物判断为大麦生理健康的重要代谢物。

Expression Profile & VIP of Metabolites

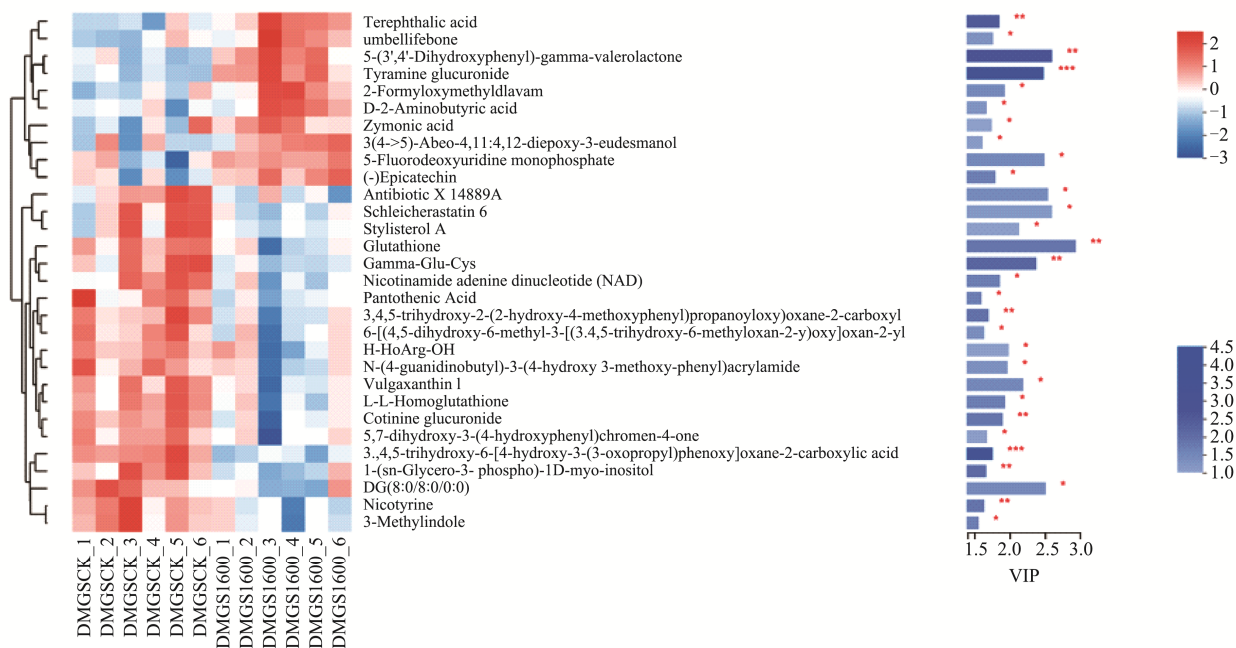


图5 GSCK-GS1600 组代谢物层次聚类热图

Fig.5 GSCK-GS1600 group metabolites hierarchical clustering heat map

表 3 关键代谢通路分析表

Table 3 Analysis of key metabolic pathways

Pathway	Total	Hits	P value	-ln(p)	Holm adjust	FDR	Impact	Hits Cpd
柠檬酸循环	20	2	0.011 5	4.465 4	1	1	0.117 4	柠檬酸 C00158 苹果酸 C00149
谷胱甘肽代谢	38	2	0.027 0	3.611 9	1	1	0.311 1	γ -谷氨酰胺-半胱氨酸 C00669 谷胱甘肽 C00051
糖氧化物和二羧酸代谢	53	2	0.038 3	3.262 3	1	1	0.044	柠檬酸 C00158 苹果酸 C00149
苯丙烷代谢	62	2	0.041 1	3.191 7	1	1	0.081 8	甲氧基肉桂醛 C02666 对羟基丙烯酸 C00811

2.5 KEGG 关键代谢通路分析

根据 KEGG 京都基因与基因组百科全书数据库来筛选关键代谢通路，以确定与差异代谢物相关联最明显代谢通路。由表 3 可知，KEGG 共识别了 16 条代谢通路；其中，4 条为关键代谢通路。GSCK-GS1600 组的差异代谢物参与以下关键代谢通路，分别为苯丙烷代谢、柠檬酸循环、谷胱甘肽代谢、糖氧化物和二羧酸代谢、泛酸盐和 CoA 生物合成、苯丙烷代谢、光合生物中的碳固定、氨基酸糖和核苷酸糖代谢、苯丙氨酸代谢、玉米素生物合成、戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、泛醌和其他萜类醌生物合成、 β -丙氨酸代谢、丙氨酸和天冬氨酸和谷氨酸代谢、色氨酸代谢、酪氨酸代谢。

在 Pb^{2+} 胁迫大麦生长过程中，柠檬酸循环、谷胱甘肽代谢、糖氧化物和二羧酸代谢、苯丙烷代谢主要产生特定差异代谢物。而 Pb^{2+} 作为农作物非必需元素，农作物会建立防御机制，来减少 Pb^{2+} 所带来的危害^[40]。大量研究表明，重金属胁迫作物生长，利用合成谷胱

甘肽、有机酸、苯丙烷、可溶性糖等物质从而将重金属络合形成其他化合物^[41]。柠檬酸循环、谷胱甘肽代谢、糖氧化物和二羧酸代谢及苯丙烷代谢的显著途径变化支持了这些结果，同时光合生物的固碳作用、 β -丙氨酸代谢、玉米素生物合成、泛酸盐和 CoA 生物合成、丙酮酸代谢、丙氨酸和天冬氨酸和谷氨酸代谢在 Pb^{2+} 胁迫实验中也受到了很大的影响。此外，一些有生物合成途径产生的代谢产物受到 Pb^{2+} 胁迫生长过程的影响，如柠檬酸循环、谷胱甘肽代谢、糖氧化物和二羧酸代谢、苯丙烷代谢主要产生特定差异代谢物，并影响了一些代谢物的变化，包括柠檬酸、苹果酸、甲氧基肉桂醛、对羟基丙烯酸、 γ -谷氨酰胺-半胱氨酸、谷胱甘肽。

谷胱甘肽代谢通路中共有两种差异代谢产物随着 Pb^{2+} 含量的增加而增加，由双- γ -谷氨酰胱氨酸经双- γ -谷氨酰胱氨酸还原酶还原生成 γ -谷氨酰胺-半胱氨酸，由谷胱甘肽合酶合成谷胱甘肽， Pb^{2+} 胁迫谷胱甘肽代谢通路中的双- γ -谷氨酰胱氨（谷胱甘肽前体）含量增加，大量生成 γ -谷氨酰胺-半胱氨酸并促使 Pb^{2+} 胁迫大

麦籽粒组中谷胱甘肽含量增加,从而调节因添加 Pb^{2+} 而被破坏的氧化还原系统。柠檬酸循环与糖氧化物和二羧酸代谢,共同含有两种相同的差异代谢产物,随 Pb^{2+} 含量的增加而减少,由顺乌头酸经乌头酸水合酶催化生成异柠檬酸,经裂解缩合生成苹果酸脱氢生成草酰乙酸, Pb^{2+} 胁迫大麦籽粒使其持水率降低,使大麦气孔调节能力下降,影响呼吸作用,柠檬酸循环中柠檬酸和苹果酸生成受到影响,从而影响大麦果实中糖类、脂类、氨基酸类物质的合成,使大麦生长过程中,无法达到基础生长过程所需的能量供给要求,产生不良影响,使大麦中营养物质流失。苯丙烷代谢通路中含有甲氧基肉桂醛及对羟基丙烯酸两个差异代谢物含量增加,由苯丙氨酸解氨酶依次反应生成甲氧基肉桂醛、对羟基丙烯酸,随重金属铅含量的增加苯丙烷代谢中的关键酶的生成量增加^[42],使苯丙烷代谢分泌更多次级代谢产物到大麦根系周围土壤中,来增加大麦的非生物胁迫能力^[43],使大麦增强重金属铅污染环境下的耐受能力。

3 讨论

Pb 是目前污染土壤情况最严重的重金属之一。由于其不是植物生长的必需元素,如果土壤含 Pb 量超标,会很难去除,从而使一些不能“选择性自主移动”的农作物不可避免地受到 Pb 污染的毒害^[44]。有研究表明, Pb 能够抑制种子萌发,降低种子活力,抑制植株生长,并积累在植株体内^[45,46]。过量的 Pb^{2+} 进入人体会损伤肠胃健康、毒害肾脏、损害神经,导致高血压、铅性贫血,影响人的智力发育,降低人体免疫力。本研究通过大麦种植实验,对在 Pb^{2+} 胁迫的环境下成熟的大麦籽粒进行 LC-MS 代谢组学分析,以此探究大麦籽粒受到 Pb^{2+} 胁迫后的内部营养物质及可能产生毒害物质的代谢机理。 Pb^{2+} 胁迫对大麦籽粒的影响最直观的体现在关键差异代谢物和关键代谢通路上。通过层次聚类热力图可以看出对含量发生变化的关键代谢物产生的影响,其中大麦籽粒受到 Pb^{2+} 胁迫后,主要累积的代谢物为脂类代谢物和有机酸类代谢物。脂类代谢物主要是为大麦籽粒的生长提供能量,其积累可以证明大麦籽粒受到胁迫后其呼吸作用受到抑制,生命活动减弱,会对大麦籽粒的品质造成影响;而有机酸类代谢物的累积则是大麦籽粒抵御外界胁迫的一种防御手段,当大麦籽粒感受到 Pb^{2+} 胁迫时,其根系就会不断的分泌有机酸与之进行螯合,形成重金属-有机酸螯合物,阻止其进入大麦籽粒内部,以减轻对大麦籽粒的危害。

通过 KEGG 通路分析发现, Pb^{2+} 胁迫会主要对大

麦籽粒中柠檬酸循环和氨基酸代谢有显著影响。 Pb^{2+} 胁迫大麦籽粒会使其持水率降低,使大麦气孔调节能力下降,影响呼吸作用,导致柠檬酸循环受到影响,从而影响大麦果实中糖类代谢物、脂类代谢物和氨基酸类代谢物的合成,使大麦籽粒无法达到基础生长过程所需的能量供给要求;大麦籽粒的持水率降低也会影响大麦籽粒的口感,最终影响大麦籽粒的品质。同时氨基酸合成的减少也会导致其中营养物质的流失和。但经过分析发现,受到 Pb^{2+} 胁迫后的大麦籽粒内部未产生有害物质,如发生意外食用的情况,不会对人体产生不良影响。

4 结论

本研究以模拟 Pb 污染大麦种植区,添加土壤中外源 Pb^{2+} 的方式,来模拟 Pb^{2+} 污染环境下的大麦盆栽实验。经过一个完整的大麦生长周期后,应用 LC-MS 非靶向代谢组学探究 Pb^{2+} 胁迫大麦籽粒的代谢机理。研究表明, Pb^{2+} 胁迫组大麦籽粒(GS1600)与对照组大麦籽粒(GSCK)中有 38 种代谢产物,其中多数为脂质和类脂分子、有机酸及衍生物及有机氧化合物。根据 Pearson 相关分析显示,含有羧基及羟基的杂环类化合物多与其他代谢产物呈负相关($P < 0.05$)。通过差异代谢物层次聚类热力图表明,大麦籽粒中的有机杂环化合物、有机含氧化合物、脂质及类脂分子以及有机酸类化合物发生了显著变化。在铅胁迫条件下,差异代谢物的化学类别丰富,基于 KEGG 关键通路分析,共筛选出 16 条代谢通路,其中主要产生特定差异代谢物的关键代谢通路共 4 条:谷胱甘肽代谢,柠檬酸循环,糖氧化物和二羧酸代谢,苯丙烷代谢。关键差异代谢物为柠檬酸,苹果酸, γ -谷氨酰胺-半胱氨酸,谷胱甘肽,甲氧基肉桂醛,对羟基丙烯酸。因此,可进一步探究 Pb^{2+} 胁迫下大麦结构之间的相互作用及变化,为受污染大麦的回收利用提供理论依据,增加受污染大麦的回收利用率,减少食物浪费,以减轻粮食安全问题。

参考文献

- [1] 李静,张述伟,周龙华,等.基于 HS-SPME-GC-MS 法分析大麦幼苗中的挥发性成分[J].食品研究与开发,2021,42(10):148-153.
- [2] 娄雨豪,曹冬梅,张东杰,等.不同贮藏条件及加工处理后大麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇膳食风险评估[J].食品科学:2023,44(1):132-139.
- [3] Lemueszek M K, Komaniecka I, Chojnacki M, et al. Immunomodulatory properties of polysaccharide-rich young

- green barley (*Hordeum vulgare*) extract and its structural characterization [J]. *Molecules*, 2022, 27(5): 1742.
- [4] Matsuoka T, Hosomi K, Park J, et al. Relationships between barley consumption and gut microbiome characteristics in a healthy Japanese population: a cross-sectional study [J]. *BMC Nutrition*, 2022, 8(1): 23.
- [5] 任晓婵,常婧瑶,马晓丽,等.超微粉碎后粒径对大麦全粉品质特性的影响[J].食品工业科技,2022,10:80-86.
- [6] Mitra J, Barat A F, Reza A, et al. Identification of DNA markers associated with phenological traits in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) under drought stress conditions [J]. *Cereal Research Communications*, 2021, 50(2): 171-178.
- [7] Roel F H M, Elly M J, Md A, et al. Shoot sodium exclusion in salt stressed barley (*Hordeum vulgare* L.) is determined by allele specific increased expression of HKT1;5 [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 241: 153029.
- [8] Hamid R, Seyed A K, Elahe T. Evaluation of harvest index and phenological stage of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) under water stress [C]//第七届国际作物科学大会. [2023-09-01].
- [9] Cüneyt Uçarlı, Filiz Gürel. Differential physiological and molecular responses of three-leaf stage barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress within hours [J]. *Plant Biotechnology Reports*, 2020, 14(1): 89-97.
- [10] 李晓科,武玉珍,张谨华,等.H₂S 对 Cd 胁迫下大麦幼苗逆境生理及光合作用的影响[J].福建农业学报,2020,35(10): 1131-1137.
- [11] 李娜,杨兰芳,朱有为,等.1990-2018 年浙江省人为铅排放时空变化解析[J].环境科学学报,2021,41(10):4288-4305.
- [12] 舒晓晓,魏雨露.重金属铅污染土壤的淋溶特征研究[J].农业与技术,2021,41(23):64-66.
- [13] 吴灵敏,邵劲松,喻晨,等.江苏省银杏产区土壤-银杏系统铅富集及污染评价[J].农产品质量与安全,2021,6:52-56.
- [14] 翟璐,郭建军,桑丽雅,等.基于 NOTA 的重金属铅人工抗原的合成与鉴定[J].中国食品学报,2020,20(4):233-239.
- [15] 陈丽.镉胁迫下绿豆种子萌发过程中代谢组学的响应[D].南昌:南昌大学,2017.
- [16] 张凤,陈伟.代谢组学在植物逆境生物学中的研究进展[J].生物技术通报,2021,37(8):1-11.
- [17] 林洁鑫,王鹏杰,金珊,等.基于广泛靶向代谢组学的不同产地红茶代谢产物比较分析[J].食品工业科技,2022,2:9-19.
- [18] Cevallos J M, Reyes J I, Etxeberria E, et al. Metabolomic analysis in food science: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2009, 20(11-12): 557-566.
- [19] 李璞钰,剧柠,罗玉龙,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析原料乳冷藏过程中脂类代谢组学[J].食品科学,2021,42(20): 120-127.
- [20] Emwas A H, Roy R, Mc Kay R T, et al. NMR spectroscopy for metabolomics research [J]. *Metabolites*, 2019, 9(7): 123.
- [21] Cui L, Lu H T, Lee Y H. Challenges and emergent solutions for LC-MS/MS based untargeted metabolomics in diseases [J]. *Mass Spectrometry Reviews*, 2018, 37(6): 772-792.
- [22] Beale D J, Pinu F R, Kouremenos K A, et al. Review of recent developments in GC-MS approaches to metabolomics-based research [J]. *Metabolomics*, 2018, 14(11): 1-31.
- [23] Zhang W, Ramautar R. CE-MS for metabolomics: Developments and applications in the period 2018-2020 [J]. *Electrophoresis*, 2021, 42(4): 381-401.
- [24] 罗庆.镉、铅胁迫下东南景天根系分泌物的代谢组学研究[D].沈阳:东北大学,2016.
- [25] 郭山.Cd 胁迫对凤眼莲(*Eichhornia crassipes*)根系分泌及体内小分子有机物代谢的影响研究[D].武汉:华中农业大学,2018.
- [26] 王晶晶.铬污染胁迫下青梗菜的代谢响应[D].温州:温州大学,2019.
- [27] ZHAO Xu, CHEN Mingjie, LI Zhiping, et al. The response of *Vibrio parvulus* to low-temperature stress based on metabolomics [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:1787.
- [28] 洪叶.花后干旱胁迫对啤酒大麦品质的影响及其机理研究[D].杭州:浙江大学,2021.
- [29] 赵转军.共存元素影响下干旱区绿洲土壤—蔬菜系统中Cd污染化学行为的盆栽实验研究[D].兰州:兰州大学,2010.
- [30] 崔航,曹冬梅,王冀菲,等.基于 LC-MS 代谢组学技术探究铅胁迫大麦苗粉代谢产物及通路分析[J].现代食品科技,2022, 38(11):111-121.
- [31] 朱珺.NRT1.1 在植物响应铅胁迫中的作用及机制[D].杭州:浙江大学,2019.
- [32] 孙硕.土壤外源铅的老化与植物吸收铅差异性研究[D].北京:中国农业科学院,2019.
- [33] 查应琴,潘凤,关萍.镉胁迫对鸡冠花种子萌发及幼苗生理生化特性的影响[J].西北植物学报,2020,40(11):1900-1908.
- [34] 李根,张然,王雨藤,等.油菜素甾醇调控植物生长发育及非生物胁迫的研究进展[J/OL].分子植物育种:1-22 [2022-03-13].
- [35] Peng R N, Sun W Y, Jin X X, et al. Analysis of 2,4-epibrassinolide created an enhancement tolerance on Cd toxicity in *Solanum nigrum* L. [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(14): 16784-16797.
- [36] 王欣卉,宋雪健,李志江,等.脂质组学技术及其在食品科学领域应用研究进展[J].食品科学,2023,5:290-297.

- [37] Emanuela M C. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 66: 160-167
- [38] 赵慧燕. 大麦营养与功能组分的相关性分析以及紫粒大麦转录因子 HvTTG1 功能的初步性研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- [39] 叶彬, 周涛, 廉杰, 等. 湿地植物根系分泌物中有机酸对 NSAIDs 胁迫的响应[J]. *农业环境科学学报*: 2022, 7: 1555-1564.
- [40] 刘长风, 段士鑫, 张晓宇, 等. 植物根系分泌物在重金属胁迫下的响应研究进展[J]. *福建农业学报*, 2021, 36(12): 1506-1514.
- [41] 葛坤, 王培军, 邵海林, 等. 重金属胁迫对植物生理生化的影响及其抗性机理研究[J]. *山西林业科技*, 2021, 50(3): 43-46.
- [42] Dawei M, Peter C. MYB repressors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2019, 24(3): 275-289.
- [43] 尚军, 吴旺泽, 马永贵. 植物苯丙烷代谢途径[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2022, 11: 1467-1476.
- [44] LIU Li, HU Lingling, TANG Jingjing, et al. Food safety assessment of planting patterns of four vegetable-type crops grown in soil contaminated by electronic waste activities [J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 93(1): 22-30.
- [45] KUANG Shaoping, XU Zhong, ZHANG Shusheng. The absorption of heavy metal lead in soil by maize is special sex and pollution prevention [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2002, 2(1): 28-31.
- [46] Jain R, Verma R, Singh A, et al. Influence of selenium on metallothionein gene expression and physiological characteristics of sugarcane plants [J]. *Plant Growth Regulation*, 2015, 77(2): 109-115.