

道地药材品质形成机制的组学研究思路

王程成, 赵慧, 严颖, 石婧婧, 陈舒舒, 谈梦霞, 陈佳丽, 刘子修,
陈翠花, 邹立思, 刘训红*

(南京中医药大学 药学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 道地药材一直是中药材的“品质标杆”, 地位不可撼动。道地药材的品质形成从分子层面的基因遗传到最终产物的代谢表型都有涉及, 其次代谢产物的生物合成途径至今并未完全阐明。近年来, 不断丰富的组学技术在揭秘复杂生物系统如何运作上功不可没, 也同样适用于道地药材复杂的品质形成机制探索。为了缓解道地资源日益匮乏的现状, 科学地指导优质品种的移栽, 该文综述了组学在解读道地药材从基因到表型的变化过程、次生代谢产物的生物合成途径、与人体的相互作用和品质评价的新方法这些方面的研究成果, 为更好地保护和利用中医药资源提供思路。

[关键词] 道地药材; 组学; 品质形成; 基因遗传; 生物合成途径

DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20180307.010

Thoughts of omics research on quality formation in Dao-di herbs

WANG Cheng-cheng, ZHAO Hui, YAN Ying, SHI Jing-jing, CHEN Shu-yu, TAN Meng-xia, CHEN Jia-li,
LIU Zi-xiu, CHEN Cui-hua, ZOU Li-si, LIU Xun-hong*

(School of Pharmacy, Nanjing university of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] Dao-di herbs have been recognized as "quality models" with a firmly stable status. The formation of Dao-di herbs quality is involved from the genetic inheritance on the molecular level to the metabolic phenotype of final products, and the full material-based biosynthetic pathway remains unknown. In recent years, an increasing variety of omics technologies has provided new methods and ideas for the analysis of complex life systems and are suitable for explanation of quality formation in Dao-di herbs as well. In order to alleviate the scarcity of natural resources and offer scientific guidance of transplanting varieties, achievements of omics in the aspects of Dao-di herbs from genetics to phenotyping, the biosynthetic pathway of secondary metabolites, the interaction with human body and the new methods of quality evaluation have been summarized. It will be a fundamental work for protection and utilization of Chinese medicine resources.

[Key words] Dao-di herbs; omics; quality formation; genetic inheritance; biosynthetic pathway

道地药材凭借品质优良、疗效显著的特点, 一直是中药材的“品质标杆”, 地位不可撼动。《神农本草经》记载“土地所出, 真伪新陈, 并各有法”, 说明了道地药材由于地域环境的差异, 甚至是历史文化的积累变迁而不可替代。然而, 随着需求量的激增, 道地药材野生资源日益匮乏, 有些品种甚至已无野生, 没有科学指导的移栽品更拉低了临床疗效。道地药材的特殊品质是道地药材的基因型、特定的生态环境和栽培措施共同作用的结果, 即“表型 = 基因型 + 环境饰变”。

道地药材的化学组成有其独特的自适应特征, 道地药材的道地性越明显, 其基因特化越明显, 而“逆境效应”是环境对道地药材形成影响的一种重要表现, 道地性可能是在经历了无数次环境胁迫中获得^[1-2]。也正是因为道地药材复杂的生物背景才导致其品质机制的研究显得浮于表面, 不利于道地药材资源的保护和开发。

组学技术(omics technology)是研究一个系统中所有组成成分(基因、mRNA、蛋白质、代谢小分子等)的构成以及在

[收稿日期] 2017-12-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473312); 江苏高校优势学科建设工程项目(YSKK-2014); 江苏高校品牌专业建设工程项目(PPZY2015A070)

[通信作者] * 刘训红, 博士生导师, 主要从事中药品质形成机制研究, Tel: (025) 85811511, E-mail: liuxunh1959@163.com

[作者简介] 王程成, 博士研究生, E-mail: ccheng22@yeah.net

特定条件下这些组分间的相互关系,并分析这一系统在某些因素干预下一定时间内的动态过程及其规律^[3],主要包括基因组(genomics)、转录组(transcriptomics)、蛋白质组(proteomics)和代谢组(metabonomics)。基因组学是对一个物种的所有基因进行基因组作图(包括遗传图、物理图谱、转录图谱)、核苷酸序列分析、基因定位和基因功能分析^[4]。然而在多数药用植物缺乏全基因组信息的情况下,转录组学已成为分离克隆药用植物新基因及基因功能研究的重要手段之一。转录组学可以全方位地分析研究生物体基因在不同条件、不同状态下的表达水平以及形成这种特定表达状况的调控机制^[5]。如果对由一个基因组以及一种生物、组织或细胞表达的全部蛋白质行系统地鉴定、定量及功能研究则需要蛋白质组学的参与^[6]。代谢组学是继以上3种组学后的一门新“组学”,是通过考察生物体系受刺激或扰动(某个特定的基因变异或环境变化)后,所有低分子量代谢产物随时空变化的情况来研究生物体系代谢途径的一种方法^[7]。此外,表观基因组、宏基因组等其他组学技术也逐渐受到重视,丰富补充系统生物学的研究思路。不同层面的组学由表入里系统组合,互补为用,逐渐成为解析复杂生命体系的强大工具。近年来,随着组学和相应分子生物技术的渗透,道地药材品质形成的探索不论在生态环境等外在因素,还是基因与遗传分化的分子水平都有了一定的推进。为了更加深入系统地理道地药材这一复杂生命体,本文将围绕中药在品质形成方面的组学研究现状,从整体上为道地药材品质形成机制提供一些有效的组学研究思路(图1)。

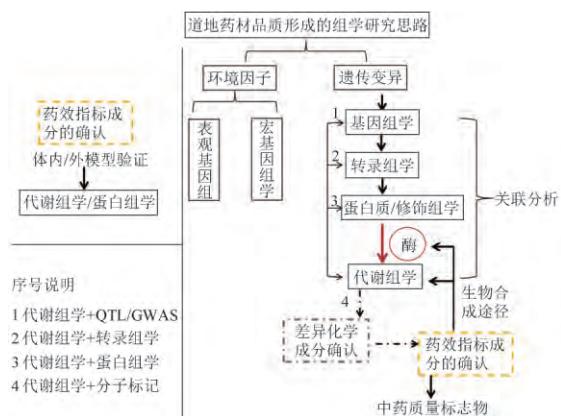


图1 道地药材品质形成的组学研究思路

Fig.1 Thoughts of omics research on quality formation in Dao-di herbs

1 组学技术能够展示道地药材从基因到表型的全貌

1.1 基因是药材道地性品质的决定性因素 基因组标记技术推动道地药材的身份鉴定。早在2008年陈士林团队便提出“本草基因组学(herbgenomics)”的概念,首次建立了“DNA条形码”中药真伪鉴定技术体系,并被《中国药典》收入,解决了千百年来中药材物种真伪鉴定的难题^[8-10],使中草药具2408

有“基因身份证”,也是传统鉴定和现代分子技术的完美结合,将真伪鉴别的研究深入到分子水平,为揭示传统经验鉴别的科学内涵提供思路。其中,核基因组、叶绿体基因组在标记植物药中应用较多,而线粒体基因组则常在标记动物药中应用^[11-13]。但基因组标记技术侧重于不同种属间的鉴别,在鉴定相同基因型的道地药材与其他产区药材方面仍任重道远。

基于数量性状基因座位(quantitative trait loci, QTL)的代谢组研究可以为挖掘“道地基因”提供思路。道地药材的遗传变异主要表现为群体内某些基因型频率的变化,很难找到独有的表型特征或是分子标记,这也是目前分子标记技术的瓶颈^[14]。而道地性在个体层面则主要表现为微效多基因的数量遗传,或者与主基因联合控制的数量性状^[15]。QTL作为控制同一性状的基因集合或者基因簇,定位于染色体的特定片段。道地药材次生代谢产物的水平可以看作一个数量性状,因而可以对代谢物的不同性状进行相关的QTL分析^[16]。即综合利用代谢组学大规模地检测不同物种或相同品种间代谢物的种类与含量,然后运用QTL作图对各种代谢物性状进行遗传分析,挖掘关键酶并推测构建相关代谢途径,进而找寻与药材道地性明显关联的某个或者某类基因群。

1.2 环境生态因子推动药材“道地”与“非道地”品质产生种内变异的形成 道地药材具有道地性的重要原因之一是次生代谢产物合成相关的基因组在特定环境中表达结果不同,进而导致不同地域药材在有效成分上的差异。中药材遗传变异的分化和形成是物种对不同环境生态条件的长期适应与自然选择的结果,这种种内变异是道地药材区别于其他中药材品质优劣和疗效差异的实质^[17-18]。越来越多研究表明逆境胁迫和环境微生物是造成药材特殊品质形成的重要非生物及生物因子^[19]。

蛋白质组学可以绘制不同生态环境下中草药的蛋白质表达谱,揭示在逆境胁迫下中草药次生代谢产物发生变化的蛋白质机制^[20]。Grimplet J等^[21]从葡萄果皮得到1 047个蛋白,其中90个与果肉之间差异表达。从种子得到的695种蛋白中,有163种被鉴定出和果皮蛋白几乎完全不同,且干旱胁迫改变了大约7%的果皮蛋白丰度,但对种子几乎没有影响。实验不仅解释了组织特异性可能的起源,最后还结合代谢组的数据阐述了干旱胁迫影响葡萄酒中主要风味和香味化合物积累的原因。此外,在盐胁迫研究中,有大量实验利用高通量的蛋白质组学技术,找出参与不同代谢过程的差异蛋白,展示盐胁迫过程中蛋白质组的动态变化特征并揭示多种调节机制。主要包括多种信号通路激活蛋白质磷酸化传递盐胁迫信号,膜蛋白与转运蛋白调节离子吸收与外排,改变参与糖类与能量代谢相关酶的表达调节代谢水平,积累渗透保护物减少或降低细胞受伤害,参与细胞骨架重塑保持细胞正常结构与物质运输等^[22-25]。事实上不同逆境胁迫在分

子层面可以用表观遗传学的内容解释^[26]。DNA 携带的遗传信息决定了所有生命状态的可能性,而表观遗传则负责调控基因何时何地、以何种方式去行使遗传指令,其中基因组的 DNA 甲基化是表观遗传的主要表现形式^[27]。研究表明,有些经历过生态胁迫的植物后代会维持基因组整体的超甲基化状态,推测可能是植物采取的一种在胁迫环境下维持基因组稳定的防御策略。因此,道地药材表型差异可以说是对环境压力适应的结果^[28-29]。在基本一致的遗传背景下,不同的生态胁迫对同一品种的长期影响可能会形成独特的表观遗传模式,结果产生药材道地性表型特征,而不同层面的组学则是还原道地药材最终表型形成过程的有力武器。

根际微环境是道地药材次生代谢产物形成中的重要因素。长期以来人们对于大约 99.8% 无法培养出的微生物群体仍然一无所知,宏基因组学就是在微生物基因组学的基础上发展起来的一种研究微生物多样性,发现新生理活性物质或者挖掘新基因的技术^[30]。道地药材根际微生物种群结构在不同生态环境下存在差异,宏基因组学可以比较不同生态环境下道地药材根际微生物的基因组结构,寻找与道地药材次生代谢产物合成相关的微生物基因,进而从分子水平研究土壤微环境对道地药材形成的影响^[31]。有学者探讨了怀牛膝整个生育周期内土壤微生物和酶活性对道地性成因的影响,认为在增重期的怀牛膝土壤中的微生物数量和酶活性均为最大^[32]。现阶段对道地药材根际土壤的微生物宏基因组的认识和应用还较为浅显,但它可以与其他环境生态因子对道地药材品质形成的研究互为补充,揭示道地药材在生物及非生物作用下的生理生化及次生代谢产物的差异性,同时为合理开发利用道地药材土地资源提供依据。

2 组学技术保障了道地药材物质基础的挖掘

2.1 推动次生代谢产物合成途径的解析

次生代谢途径的解析是药材“道地性”物质基础挖掘的前提。在目前的评价体系下,特征性的次生代谢产物作为不同品种中药材,尤其是道地药材代表性的物质基础,仍是中药材品质评价的重点。药用植物有效成分多在植物特定的组织器官和生长发育阶段积累,仅部分组织或器官入药,资源成本较高。而次生代谢途径的生物合成过程涉及微生物学、生理生化和分子遗传等生物学科的实验方法,过程始终贯穿着初生代谢和次生代谢相互交叉,影响因素很多,所以对生物合成机制较单一代谢途径的研究要复杂和困难的多^[33]。

经典研究次生代谢途径的方法主要包括前提饲喂法、无细胞体系酶法、同位素示踪法、诱导剂或抑制剂添加法、突变株法等。其中同位素示踪法是研究生物合成途径最常用的方法,结合目前植株、根、芽培养物的应用,通过测定反应中间体的同位素含量和分布情况,以判断化合物是否参与生物合成。尤其是近年来使用稳定同位素¹³C,²H,¹⁸O 等来做示踪,极大的简化了中间步骤,提高了工作效率,在次生代谢产物的合成研究中应用成熟。但其实验侧重点在于化合物的

生成情况,而无法展示次生代谢的调控情况。随着后基因组时代的进步,从系统生物学的角度应用基因组学、转录组学、蛋白质组学、代谢组学的研究方法可以综合解析次生代谢产物代谢途径及其调控机制。作为天然产物中抗癌活性最为公认的紫杉醇,它的生物合成途径及其调控机理的探索便是以上 2 种思路的完美结合。研究人员经过数十年的努力,通过经典的同位素标记法确定 GGPP 的环化是合成途径中最重要的途径,并应用代谢组学、转录组学等组学技术,构建转录组文库,筛选功能基因等一系列实验对紫杉醇的生物合成途径进行了深入系统的研究,使其成为了药用植物代谢途径研究的典范。

随着第二、三代高通量测序技术和生物信息学分析方法的进步,基因组学的研究对象已经可以从模式动植物中解放出来,大大加快了中药次生代谢分子水平的研究。陈士林结合光学图谱和新一代测序技术,完成了染色体水平的灵芝基因组精细图绘制,为开展灵芝三萜等有效成分的合成研究提供了便利^[34]。丹参被认为是研究中药活性成分生物合成的理想药用模式植物,其全基因组测序的完成,有力推动在分子水平上认识中药品质的形成机制^[35]。以灵芝、丹参为代表的中药基因组框架图的初步完成为真菌类、双子叶植物类中药材次生代谢产物合成及调控途径提供新的线索。作为连接基因组与蛋白质组的桥梁,转录组可以反映特定时空条件下活跃表达的基因。道地药材的特殊物质基础正是这些基因时空差异表达调控的产物^[18]。RNA-seq 能够在没有物种基因组信息参考的情况下,对转录本进行从头拼装,将拼装得到的序列通过同源比对进行注释和分类,弥补了非模式生物转录组研究中缺乏基因组信息的不足,可以对任何物种的转录组直接进行分析^[36]。

组学间的有机结合有助于完整阐明道地药材次生代谢产物的合成途径。代谢组与全基因组关联分析的整合为代谢相关基因的功能鉴定与代谢途径的重构奠定基础^[37]。全基因组关联分析 (genome-wide association studies, GWAS) 是在全基因组范围内筛选出具有不同遗传差异的个体分子标记,分析与表型相关联的分子标记位点。对道地药材来说,代谢产物就是重要的表型,代谢组学与 GWAS 的结合 (mGWAS) 可以获得代谢产物相关位点,为解析代谢途径与遗传分化奠定基础^[38-39]。Chan 等使用 96 个拟南芥品种,分别在发育和胁迫过程中对约 23 万个 SNPs 进行了硫代糖苷表型的研究,鉴定了许多控制硫代糖苷性状的数量性状基因座 (QTL) 及 2 个主要控制硫代糖苷自然变异的多态性位点^[40]。此外,罗杰等通过对玉米、水稻等农作物的广泛靶向代谢谱分析,结合 mGWAS 获得了大量代谢产物相关位点,从而深入阐述了代谢途径及其遗传与生化基础^[41-43]。较为代表性的是将水稻中黄酮代谢组数据进行全基因关联分析,找出了控制氧糖基黄酮的自然变异位点,并结合体外生化实验和转基因植株的代谢组分析,鉴定出 2 个主效基因,为作物改

良提供方向^[44]。目前有关药用植物在这方面的报道还较少,但模式植物及农作物的研究方法给我们提供了新的思路。虽然不同物种在基因组大小上有很大差异,但由于基因组上存在很多重复区域,所以不同物种在基因数量上差别不大,因此利用转录组测序则更加经济实惠。将代谢组与转录组的结合来解析药用植物次生代谢产物合成途径也成为一种趋势。Gao等结合转录组和代谢组学研究丹参中二萜丹参酮的生物合成。毛状根培养物的非靶向代谢组学结果表明丹参酮是代谢响应的主要组成部分,转录组测序得到20 972个非冗余基因,差异表达6 358个,参与胁迫的基因的上调显著,刺激和免疫反应过程。共调控基因中有70个转录因子和8个细胞色素P450,所得结论为今后二萜丹参酮的生物合成研究提供靶标^[45]。

2.2 推进与人体相互作用的分析 临床疗效是评价中药品质优劣的根本。道地药材的吸引力之所以经久不衰,本质上还是由于它特殊的物质基础奠定了临床对它的好评。中药与人的相互作用关系是两个复杂体系的相互作用,是多对多的关系,很少有简单的线性趋势。组学技术可以一定程度上阐述中药与机体复杂的相互作用并推进作用靶点的发现。

蛋白质组学和代谢组学是评价中药与人体相互作用的主要组学技术。首先,通过比较给药前后蛋白质表达谱的差异,可以找到中药作用于哪些可能的靶点蛋白质,再结合蛋白质相互作用数据库绘制出与中药作用相关的蛋白质互作网络,然后运用分子生物学实验手段对特异性靶蛋白相互作用的网络进行验证^[20]。近年来,不论是中药单体、单味中药,还是中药复方的体内作用机制研究都充分利用了中药蛋白质组学的技术,其合理性专业性和可行性也得到业内认可,给中药复杂作用机制的研究提供新的契机^[46-50]。除了传统意义上的蛋白质组学比较之外,研究中药体系在疾病治疗后对靶点蛋白的修饰作用,如泛素化修饰谱、组蛋白乙酰化修饰谱等逐渐成为蛋白质组学的重要补充,也愈显重要。此外,代谢组学将人体的生理病理过程看作一个动态的系统,研究生物体被内外环境因素扰动后其内源代谢产物种类、数量及其变化的规律。因此代谢组学为中药体内药效的宏观分析开辟了道路,可以通过检测分析和探索代谢物质的整体变化规律来研究在中药对机体活动发生发展的影响和作用。除了机体代谢谱的比较分析和机制探索之外,代谢组学还涉及临床诊断、生物标记物^[51-52]的挖掘等内容,丰富中药对机体发挥作用的机制探索。

3 组学技术为道地药材品质评价提供思路

现如今传统的中药材品质评价仍发挥着不可替代的作用,但由于存在一定的主观性,且标准化程度不够,通用性受阻。因此亟需充分结合多样化的评价模式,并根据中药作为一个有生命的个体这一区别于简单化合物的特点,立足于系统生物学,运用不同层面的组学,探索出整体的综合分析模式和生物鉴定方法,将是中药品质评价发展的一项重要研究

内容。

作为一个复杂的生物体,道地药材的品质评价必将从单一指标走向系统评价,从一般规律演化为个体特征。黄璐琦^[53]提出DNA分子标记和代谢标识物相结合的分析方法,即在分子水平同时研究中药的种类、区别和质量差异的一种分子标记方法。主要是利用高通量代谢组学接近全景代谢物的分析发现不同来源、不同产地、不同年限、不同部位等中药材的代谢标志物,弥补了DNA分子标记在一些物种间没有鉴别力的不足。Duan L等^[44]使用AFLP分子标记技术联合GC-TOF-MS代谢组学成功区分在形态学上差异极小的蒙古黄芪和膜荚黄芪,并找到不同生长年限和地域的差异代谢物,也为区别不同生境的药用植物提供思路。刘昌孝^[55-56]提出“中药质量标志物(Q-Marker)”新概念,并以延胡索为例,系统阐述了其质量标志物为延胡索乙素、延胡索甲素、黄连碱、巴马汀、去氢延胡索甲素、D-四氢药根碱及原阿片碱^[57]。成为Q-Marker的首要前提是中药材或者相关产品中固有存在的化学物质,即中药材在品质形成时期所产生的和药效相关的重要次生代谢产物,而这些次生代谢产物的指认、生源途径的分析和药效评价都可以运用组学知识进行系统的挖掘。值得注意的是,不论是分子层面的基因标记技术,还是表型方面的代谢组学,以及调控层面的转录组,蛋白组等都有各自的适应范围和相应的技术手段^[58-62]。目前这方面的研究还处于零散阶段,而要作为以后完整的评价体系,不但要筛选最佳的实验技术,确定方法标准流程,还要有相应规范的数据分析和整合技术支持,为之后道地药材的品质评价体系的数据库建设、资源共享、新知识发现等奠定基础。

4 总结与展望

道地药材作为有生命的“药物”,具备生命体复杂性、临床药用性及“道地性”3个特点,决定了不能照搬简单线性的一般化合物研究模式,整体系统的研究是必经之路。事实上,道地药材的品质标准研究涉及种子种苗、生态环境、栽培采收、加工炮制以及化学药理等各个方面内容,才能最终保证药材的“道地性”。本文从道地药材的基因、环境、次生代谢和对人体作用几个方面,围绕道地药材品质形成的机制,重点介绍近年来组学在挖掘中药、道地药材以及一些非药用植物的有益探索,虽然有些研究未真正触及药材道地性这个方面,但笔者认为这也正是探索道地药材品质形成值得借鉴的部分,比如全基因组关联结合代谢组挖掘次生代谢途径、组学结合分子标记完善药材评价体系等。此外,任何一方面或者单个层次的组学提供的信息都是片面的,不足以全面解决复杂系统的生物学问题,而组学的类别也越来越多,方法也逐渐丰富起来。因此,如何对研究对象进行组学方法的选择,如何将研究人员的成果建成标准的数据库共享以及如何将各种高通量的组学数据的有机整合,充分发掘数据中生物学意义等也是不得不面临的重大问题。这些都需要跟上

的分析技术手段和创新的研究思路。最后,运用系统生物学的研究模式和组学的研究方法都是为了还原中医药整体、系统性的特点,揭示中医药发挥作用的奥秘,为更好的保护利用中医药资源奠定基础。

[参考文献]

- [1] 黄璐琦,郭兰萍,胡娟,等. 道地药材形成的分子机制及其遗传基础[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(20): 2303.
- [2] 袁媛,周骏辉,黄璐琦. 黄芩道地性形成“逆境效应”的实验验证与展望[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 139.
- [3] 刘良. 充分利用组学技术研究及发展中医药[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2009, 11(2): 214.
- [4] Xu H B, Song J Y, Luo H M, et al. Analysis of the genome sequence of the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza* [J]. Mol Plant, 2016, 9(6): 949.
- [5] 陈士林,朱孝轩,李春芳,等. 中药基因组学与合成生物学[J]. 药学报, 2012, 47(8): 1070.
- [6] Peng J, Gygi S P. Proteomics: the move to mixtures[J]. J Mass Spectrom, 2001, 36(10): 1083.
- [7] 杨延泽,邓毅,杨秀娟,等. 代谢组学在中医药领域应用现状[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25(1): 132.
- [8] Miller S E. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(12): 4775.
- [9] Chen S L, Pang X H, Song J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA[J]. Biotechnol Adv, 2014, 32(7): 1237.
- [10] 陈士林,宋经. 中草药 DNA 条形码物种鉴定体系[J]. 药学进展, 2017, 41(2): 87.
- [11] Chen S L, Yao H, Han J P, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS ONE, 2010, 5: e8613.
- [12] 陈士林,朱孝轩,李春芳,等. 中药基因组学与合成生物学[J]. 药学报, 2012, 47(8): 1070.
- [13] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 141.
- [14] 黄璐琦,王学勇,郭兰萍,等. 中药材二维分子标记法及其构建[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1093.
- [15] 黄璐琦. 分子生药学[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2015.
- [16] 刘贤青,董学奎,罗杰. 基于连锁与关联分析的植物代谢组学研究进展[J]. 生命科学, 2015, 27(8): 986.
- [17] Huang L F, Fu J, Chen S L. Academic study on ecological variation of traditional Chinese medicinal materials [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2012, 43: 1249.
- [18] 王晓玥,宋经元,谢彩香,等. RNA-Seq 与道地药材研究[J]. 药学报, 2014, 49(12): 1650.
- [19] 姜艳,刘奇,冯尚国,等. 环境因子对抗白菊黄酮类化合物和绿原酸含量的影响[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(2): 225.
- [20] 乐亮,姜保平,徐江,等. 中药蛋白质组学研究策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4096.
- [21] Grimplet J, Wheatley M D, Jouira H B, et al. Proteomic and selected metabolite analysis of grape berry tissues under well-watered and water-deficit stress conditions[J]. Proteomics, 2009, 9(9): 2503.
- [22] Tester M, Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants[J]. Ann Bot, 2003, 91(5): 503.
- [23] Yan S P, Tang Z C, Su W A, et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root [J]. Proteomics, 2005, 5(1): 235.
- [24] Komis G, Apostolakis P, Galatis B. Altered patterns of tubulin polymerization in dividing leaf cells of *Chlorophyton comosum* after a hyperosmotic treatment [J]. New Phytologist, 2001, 149(2): 193.
- [25] Zhu J K. Plant salt tolerance [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(2): 66.
- [26] Bird A. Perceptions of epigenetics [J]. Nature, 2007, 447(7143): 396.
- [27] Oliver Galm, Stefan Wilop, Christian Lüders. Clinical implications of aberrant DNA methylation patterns in acute myelogenous leukemia[J]. Ann Hematol, 2005, Suppl (1) 84: 39.
- [28] Kovalchuk O, Burke P, Arkhipov A, et al. Genome hypermethylation in *Pinus silvestris* of chemobyl—a mechanism for radiation adaption[J]. Mutat Res, 2003, 529: 13.
- [29] 袁媛,魏渊,于军,等. 表观遗传与药材道地性研究探讨[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(13): 2679.
- [30] Streit W R, Schmitz R A. Metagenomics—the key to the uncultured microbes[J]. Curr Opin Microbiol, 2004, 7(5): 492.
- [31] 陈晓辰,宋经元,董林林,等. 宏基因组学与道地药材研究[J]. 中草药, 2012, 43(12): 2315.
- [32] 吴小丽,黄进勇,岳彩鹏,等. 道地药材怀牛膝生长期间土壤微生物与酶活性研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(23): 11008.
- [33] 余龙江. 次生代谢产物生物合成: 原理与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2017.
- [34] Chen S L, Xu J, Liu C, et al. Genome sequence of the model medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. Nat Comm, 2012, 3: 913.
- [35] 宋经元,罗红梅,李春芳,等. 丹参药用模式植物研究探讨[J]. 药学报, 2013, 48(7): 1099.
- [36] 王尧龙,黄璐琦,袁媛,等. 药用植物转录组研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2055.
- [37] Suhre K, Gieger C. Genetic variation in metabolic phenotypes: study designs and applications [J]. Nat Rev Genet, 2012, 13(11): 759.
- [38] Fiehn O, Kopka J, Dörmann P, et al. Metabolite profiling for plant functional genomics [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(11): 1157.
- [39] 段礼新,代云桃,孙超,等. 药用植物代谢组学研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4090.
- [40] Chan E K, Rowe H C, Corwin J A, et al. Combining genome-wide association mapping and transcriptional networks to identify

- novel genes controlling glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* [J]. PLoS Biol, 2011, 9(8): e1001125.
- [41] Chen W Q, Gao Y B, Xie W, et al. Genome-wide association analyses provide genetic and biochemical insights into natural variation in rice metabolism [J]. Nat Genet, 2014, 46(7): 714.
- [42] Chen W, Wang W S, Peng M, et al. Comparative and parallel genome-wide association studies for metabolic and agronomic traits in cereals [J]. Nat Commun, 2016, 4(7): 12767.
- [43] Wen W, Li D, Li X, et al. Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights [J]. Nat Commun, 2014, 17(5): 3438.
- [44] Gong L, Chen W, Gao Y Q, et al. Genetic analysis of the metabolome exemplified using a rice population [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(50): 20320.
- [45] Gao W, Sun H X, Xiao H, et al. Combining metabolomics and transcriptomics to characterize tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 73.
- [46] Pan T L, Hung Y C, Wang P W, et al. Functional proteomic and structural insights into molecular targets related to the growth inhibitory effect of tanshinone II_A on HeLa cells [J]. Proteomics, 2010, 10(5): 914.
- [47] Li X Z, Zhang S N, Wang K X, et al. iTRAQ-based quantitative proteomics study on the neuroprotective effects of extract of *Acanthopanax senticosus* Harm on SH-SY5Y cells overexpressing A53T mutant alpha-synuclein [J]. Neurochem Int, 2014, 72: 37.
- [48] Wang Q S, Cui Y L, Dong T J, et al. Ethanol extract from a Chinese herbal formula, "Zuojin Pill" inhibits the expression of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 mouse macrophages [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 141(1): 377.
- [49] Dong S, Cai F F, Chen Q L, et al. Chinese herbal formula Fuzheng Huayu alleviates CCl₄-induced liver fibrosis in rats: a transcriptomic and proteomic analysis [J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, doi: 10.1038/aps.2017.150.
- [50] Feng L X, Jing C J, Tang K L, et al. Clarifying the signal network of salvianolic acid B using proteomic assay and bioinformatics analysis [J]. Proteomics, 2011, 11(8): 1473.
- [51] Zhang L, Wei T T, Li Y, et al. Functional metabolomics characterizes a key role for *N*-acetyl-neuraminic acid in coronary artery diseases [J]. Circulation, 2017, 117: 31139.
- [52] Fan Y, Li Y, Chen Y, et al. Comprehensive metabolomic characterization of coronary artery diseases [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 68(12): 1281.
- [53] 黄璐琦, 钱丹, 邓超. 双分子标记法的构建及在中药研究中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 165.
- [54] Duan L X, Chen T L, Li M, et al. Use of the metabolomics approach to characterize Chinese medicinal material Huangqi [J]. Mol Plant, 2015, 5(2): 376.
- [55] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物(Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443.
- [56] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149.
- [57] 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物(Q-marker)研究: 延胡索质量评价及质量标准研究 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1458.
- [58] Varshney R K, Graner A, Sorrells M E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications [J]. Trends Biotechnol, 2005, 23(1): 48.
- [59] Hong J, Yang L, Zhang D, et al. Plant metabolomics: an indispensable system biology tool for plant science [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): 767.
- [60] Deborde C, Moing A, Roch L. Plant metabolism as studied by NMR spectroscopy [J]. Prog Nucl Magn Reson Spectrosc, 2017, 102/103: 61.
- [61] Lu C L, Qu X Y, Jiang J G. Proteomics and syndrome of Chinese medicine [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(12): 2721.
- [62] Dove A. Proteomics: translating genomics into products? [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(3): 233.

[责任编辑 吕冬梅]