

Ca^{2+} 在水杨酸诱发的丹参培养细胞培养基碱化过程中的作用

刘连成, 王聪, 董娟娥, 苏慧, 卓泽群, 薛雅馨

西北农林科技大学生命学院, 陕西 杨凌 712100

刘连成, 王聪, 董娟娥, 等. Ca^{2+} 在水杨酸诱发的丹参培养细胞培养基碱化过程中的作用. 生物工程学报, 2013, 29(7): 986–997.

Liu LC, Wang C, Dong JE, et al. Effect of calcium on medium alkalization induced by salicylic acid in *Salvia miltiorrhiza* suspension cultures. Chin J Biotech, 2013, 29(7): 986–997.

摘要: 利用质膜钙离子通道抑制剂 LaCl_3 、异搏定 (Verapamil, VP), 钙离子载体 A_{23187} , 内膜系统钙离子通道抑制剂 2-APB 和 LiCl 处理, 研究水杨酸 (SA) 诱发的丹参培养细胞内 Ca^{2+} 迸发在培养基碱化过程中的作用。结果显示: SA 处理诱发丹参培养细胞培养基碱化, 质膜钙离子通道抑制剂 LaCl_3 和 VP、内膜系统钙离子通道抑制剂 2-APB 和 LiCl 单独处理均可显著抑制 SA 处理诱发的培养基碱化过程, 但质膜钙离子通道抑制剂对 SA 处理诱发的培养基碱化的抑制作用要显著强于内膜系统钙离子通道抑制剂; 当两类钙离子通道抑制剂同时使用, 培养基碱化过程被完全抑制, 甚至培养基出现酸化趋势; 钙离子载体 A_{23187} 可以显著促进培养基碱化过程。以上结果说明, 由水杨酸诱发的胞外 Ca^{2+} 内流与胞内钙库 Ca^{2+} 释放均参与了丹参培养基碱化的诱导过程, 但胞外 Ca^{2+} 内流的作用更重要。本研究揭示了 SA 诱发的 Ca^{2+} 与丹参细胞培养基碱化之间的关系, 为更深层次地阐明植物次生代谢调控机制提供理论基础。

关键词: 水杨酸, 培养基碱化, 细胞质酸化, Ca^{2+} , 信号转导

Received: January 10, 2013; **Accepted:** April 2, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31170274), Youth Scholar Backbone Supporting Plant Project of Northwest Agricultural & Forestry University.

Corresponding author: Juan'e Dong. Tel: +86-29-87082592; E-mail: dzsys@nwsuaf.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31170274), 西北农林科技大学青年骨干支持计划资助。

Effect of calcium on medium alkalinization induced by salicylic acid in *Salvia miltiorrhiza* suspension cultures

Liancheng Liu, Cong Wang, Juan'e Dong, Hui Su, Zequn Zhuo, and Yaxin Xue

College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: We studied medium alkalinization in *Salvia miltiorrhiza* suspension cultures treated with salicylic acid and the effect of Ca^{2+} in this process through application of calcium channel antagonists (Verapamil, LaCl_3 , LiCl , 2-APB) and ionophore A_{23187} . The results show that salicylic acid could induce significant medium alkalinization in *S. miltiorrhiza* culture. Verapamil and LaCl_3 or LiCl and 2-APB, two different groups of calcium channel antagonist, significantly inhibited the medium alkalinization induced by salicylic acid. However, the suppression effect of verapamil or LaCl_3 on medium alkalinization induced by salicylic acid was higher than that of LiCl or 2-APB. When two types of calcium channel inhibitor (LaCl_3 and 2-APB) were used together, the medium alkalinization induced by salicylic acid was completely suppressed and even reduced the pH in medium. On the other hand, A_{23187} could promote the medium alkalinization. Based on the results above, we speculated that salicylic acid could induce significant medium alkalinization in *S. miltiorrhiza* culture, depending on the calcium from both extracell and intracell. Moreover, calcium from extracell plays a more dominant role in this process. Reveal of relationship in this research between Ca^{2+} and medium alkalinization can provide theory evidence for mechanism of the plant secondary metabolism.

Keywords: salicylic acid, medium alkalinization, cytoplasmic acidification, Ca^{2+} , signal transduction

诱导子激发植物细胞次生代谢应答需要通过 Ca^{2+} ^[1]、 ROS ^[2]、 H^+ ^[3]、 IP_3 ^[4]等信使分子将刺激信息传递至细胞内,深入研究这些信使分子及其之间的关系有助于更好地认识植物次生代谢调控机制,为植物次生代谢的定向调控奠定基础。植物细胞培养基碱化(质外体空间碱化)可以等同于细胞质酸化,通常认为是由于 H^+ -ATPase 被抑制^[5], K^+/H^+ , Na^+/H^+ 交换^[6]等原因造成的,是细胞生理生化反应的调控过程。对动物细胞研究发现,细胞质酸化可诱导蛋白磷酸化、蛋白合成、细胞增殖^[7]等。在植物细胞中,细胞质酸化诱导了活性氧(ROS)产生和次生代谢物合成^[8],细胞质酸化介导诱导子诱导苯并菲啶生物碱的合成^[9],上调大米苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)^[10]、烟草培养

细胞 PAL 和 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶基因的转录^[11],这些酶都是苯丙烷和类异戊二烯类次生代谢物合成路径上的关键酶。在细胞质酸化过程中, H^+ -ATPase 和 H^+/Na^+ 交换器起着重要作用。Armero 和 Tena^[12]研究发现,质膜上 H^+ -ATPase 参与了鹰嘴豆 *Cicer arietinum* 幼苗细胞质酸化并激活了植保素和异黄酮的分泌。Viehveger 等^[13]证明液泡膜上 H^+/Na^+ 交换器参与了诱导子诱导花凌草 *California poppy* 培养细胞质酸化及植保素合成。在细胞质酸化和其他信使分子关系的研究中,Toshinori 等^[5]发现细胞质中 Ca^{2+} 浓度变化与细胞质酸化有直接关系,胞内生理浓度范围内的 Ca^{2+} 可逆性地抑制质膜 H^+ -ATPase,高浓度的 Ca^{2+} 可以抑制 H^+ -ATPase 活性,降低胞内 Ca^{2+} 浓度则可解除对 H^+ -ATPase

的抑制,而对 H^+ -ATPase 活性的抑制则是细胞外液碱化的重要原因,说明 Ca^{2+} 可能参与调控培养基碱化(细胞质酸化)过程。

丹参是我国传统大宗药材,为唇形科鼠尾草属植物丹参 *Salviae miltiorrhiza* Bunge 的干燥根及根茎,有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效^[14]。丹参中酚酸类次生代谢物因易被人体吸收,具有较强的抗氧化活性,在改善微循环、抗血栓、促进组织恢复具有较好疗效,而被认为是丹参药效的物质基础。丹参的酚酸类次生代谢物包括丹酚酸 A、丹酚酸 B、丹酚酸 C、迷迭香酸等数十种化合物,其中丹酚酸 B 是丹参质量评价指标性成分之一^[15]。

水杨酸(Salicylic acid, SA)作为诱导子可以有效提高丹参培养细胞中酚酸类次生代谢物的生物合成^[16],并且丹参酚酸类次生代谢物合成与 H_2O_2 ^[17]和 Ca^{2+} ^[18]等胞内信使有关,还与丹参细胞培养基的碱化有关^[19],但 SA 诱发的植物细胞内、外 Ca^{2+} 与丹参培养细胞培养基碱化的关系尚不明确。本实验利用不同浓度的 SA 处理诱发丹参培养细胞培养基碱化和 Ca^{2+} 释放,再利用质膜 Ca^{2+} 通道抑制剂(Verpamil, VP)和 $LaCl_3$ 、钙离子载体 A_{23187} 以及胞内钙库钙离子通道抑制剂 LiCl 和 2-APB 处理,探讨 SA 诱发的 Ca^{2+} 迸发在丹参培养细胞培养基碱化过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织诱导及继代培养

将新鲜的丹参种子(来源于陕西商洛丹参 GAP 药源基地)消毒处理后,在无菌条件下接种于含 30 g/L 蔗糖、5.5 g/L 琼脂、pH 5.8 的 MS 固体培养基上。在温度为 $(25\pm 2)^\circ C$ 、光照时间

为 12~16 h、光照强度为 2 000~3 000 lx 的条件下培养,2 个月后生长出无菌苗。

取出生长 2 个月的无菌苗,将叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块,接种于 MS 固体培养基上。培养基中含有 1.0 mg/L NAA(天津博迪化工有限公司)、1.0 mg/L 6-BA(北京康倍斯科技有限公司)、1.0 mg/L 2,4-D(北京康倍斯科技有限公司)、5.5 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖,在光照条件下诱导形成愈伤组织。将诱导出的愈伤组织每 20 天继代培养 1 次,培养条件同上。

1.2 悬浮细胞建立

将继代培养 3 次的愈伤组织再次继代培养 12 d,转接到含 30 mL 的 MS 液体培养基(无生长调节物质)的 50 mL 的三角瓶中,在转速为 125 r/min、温度为 25 $^\circ C$ 、黑暗条件下悬浮培养。培养 6 d 后,进行 SA 诱导处理。

1.3 SA 处理方法

丹参愈伤组织悬浮培养 6 d 后添加 SA 诱导子,然后分时段使用 pH 计(赛多利斯 PB-21 pH 计,玻璃铂透膜电极,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)测定悬浮培养基的 pH(0、2、4、6、8、10、12、14、16 min)。测定时摇动培养瓶,避免培养物黏在 pH 计电极上。SA(Sigma 公司)诱导子的添加终浓度分别为 11、22 和 44 mg/L。由于 SA 水溶液本身具有一定酸性,加入后可以降低培养液 pH 值 0.5 左右。实验时,将 SA 加入后摇匀,测定值为初始值,之后每隔 2 min 检测培养液 pH 值, pH 变化值为测定值减去初始值,以排除 SA 本身对测定体系 pH 的影响。

1.4 钙离子通道抑制剂及钙离子载体处理方法

细胞质膜钙离子通道抑制剂: Verapamil

(VP), 试验设置终浓度分别为 0.1、0.5、1 mmol/L; LaCl_3 , 试验设置终浓度分别为 0.1、0.5、1 mmol/L。

内膜系统钙离子通道抑制剂: LiCl (IP_3 环化酶抑制剂), 试验设置终浓度分别为 3.5、7、14 mmol/L; 2-APB (IP_3R 拮抗剂), 设置终浓度分别为 7.5、15、30 $\mu\text{mol/L}$ 。

钙离子载体 (A_{23187}): 设置终浓度分别为 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 。

以上药品 (均购自 Sigma 公司) 分别于 SA 诱导子添加前 30 min 加入丹参悬浮培养体系中 (钙离子载体处理组不添加 SA), 预培养 30 min。

1.5 数据统计方法

试验结果采用 SPSS 软件进行统计分析。实验为单因素完全随机设计, 多重比较采用邓肯新复极差法。每个试验均重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 SA 对丹参悬浮细胞培养基 pH 的影响

SA 诱导丹参悬浮培养细胞培养基 pH 的变

化如图 1 所示。在诱导过程中, 培养基 pH 呈上升趋势。在诱导的前 8 min, 培养基 pH 值增加迅速, 8 min 后增加缓慢。空白对照组的 pH 亦呈上升趋势, 但处理组 pH 升高均明显高于空白对照。

培养基的 pH 变化与 SA 的诱导浓度有关, 在实验设置的浓度范围内, 22 mg/L 的 SA 诱导后培养基的 pH 变化最显著。在诱导后的 8 min, pH 值增加了 0.54, 为空白对照组 pH 变化值 (0.14) 的 3.8 倍, 为 11 mg/L SA 诱导组 pH 变化值 (0.24) 的 2.2 倍, 44 mg/L SA 诱导组 pH 变化值 (0.38) 的 1.4 倍, 差异显著 ($P < 0.05$)。

综上所述, SA 可明显诱导丹参培养细胞培养基的碱化, 且碱化程度与 SA 诱导子的浓度有关。在实验设定浓度范围内, 22 mg/L 的 SA 诱导产生的 pH 变化最显著。后续实验均以 22 mg/L 的 SA 为处理浓度。

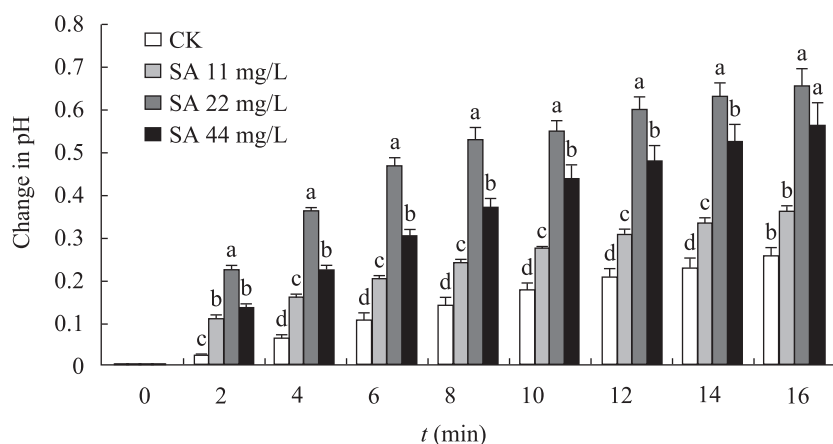


图 1 水杨酸对丹参细胞培养液 pH 的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 1 Effect of SA on the change of pH in the culture medium of *S. miltiorrhiza* suspension culture. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ($P < 0.05$).

2.2 质膜钙离子通道抑制剂对 SA 诱导丹参悬浮细胞培养基 pH 变化的影响

2.2.1 LaCl_3 对 SA 诱导丹参悬浮细胞培养基 pH 变化的影响

LaCl_3 对 SA 诱导丹参培养细胞培养基 pH 变化如图 2 所示。 LaCl_3 可以有效抑制 SA 诱导的培养基碱化过程, 在实验设定浓度范围内, LaCl_3 抑制效果与其浓度呈正相关。处理 8 min 时, 1 mmol/L 的 LaCl_3 处理组培养基 pH 仅上升 0.085, 比单独用 SA 处理 (0.543) 的低 84.3%, 也显著低于 0.1 mmol/L 的 LaCl_3 处理 (0.590)、0.5 mmol/L 的 LaCl_3 处理组 (0.220) 和空白对照组。0.1 mmol/L 的 LaCl_3 处理组 pH 变化值明显高于空白对照组, 与 SA 单独处理组差异不显著 ($P>0.05$), 说明 0.1 mmol/L 的 LaCl_3 对 SA 的诱导效应的抑制作用不明显。0.5 mmol/L LaCl_3 的处理组 pH 变化值 (前 10 min) 显著高于空白对照, 但显著低于 SA 单独处理组 ($P<0.05$)。表明 0.5 mmol/L 的 LaCl_3 可抑制由 SA 诱导而引起的丹参悬浮细胞培养基的碱化。

2.2.2 VP 对 SA 诱导丹参悬浮培养基 pH 变化的影响

VP 对 SA 诱导丹参培养细胞培养基 pH 变化如图 3 所示。

与 LaCl_3 的抑制效果不同的是, 0.1 mmol/L VP 处理即可显著抑制 SA 诱导的碱化过程, 且随着 VP 的浓度增大, 抑制效果也随之加强, 但当 VP 浓度达到 1 mmol/L 时抑制效果反而减弱, 说明 VP 对 SA 诱导碱化过程的抑制效应具有最佳浓度型特征。各处理浓度中 0.5 mmol/L VP 抑制效果最明显。处理 8 min 时, 该组 pH 上升 0.103, 与空白对照组 (0.143) 无显著差异 ($P>0.05$), 比 SA 处理组 (0.543)、0.1 mmol/L VP 处理组 (0.350), 1 mmol/L VP 处理组 (0.285) 分别低 81.0%、70.6%、63.8%, 差异显著 ($P<0.05$)。

LaCl_3 和 VP 是熟知的细胞质膜钙离子通道抑制剂, 可以使钙离子通道开放程度减弱或使其开放时间缩短, 阻止或减弱 Ca^{2+} 流入细胞质中。试验还考察了 LaCl_3 和 VP 单独使用对丹参培养

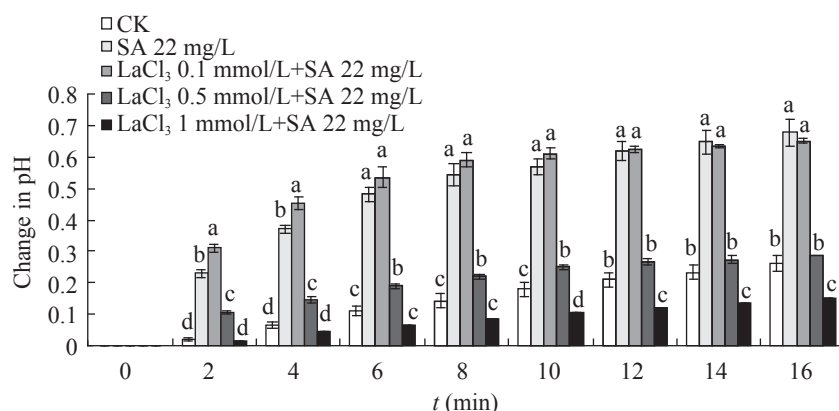


图 2 LaCl_3 对水杨酸诱导后丹参细胞培养液 pH 变化的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 2 Effect of lanthanum on the change of pH induced by SA in the culture medium of *S. miltiorrhiza* suspension culture. Different lowercases on the histongraphs with the different pattern indicate the significant differences ($P<0.05$).

细胞培养基 pH 的影响,发现在无 SA 时, LaCl_3 和 VP 并不影响丹参悬浮培养细胞液的 pH (数据未显示), 结合以上数据和前期研究结果推测, LaCl_3 和 VP 对 SA 诱导的丹参细胞培养基碱化的抑制作用可能是通过抑制胞外 Ca^{2+} 内流实现的。

2.3 钙离子载体 A_{23187} 对丹参培养细胞培养基 pH 的影响

钙离子载体 A_{23187} (可以携带细胞外的 Ca^{2+} 进入细胞内, 使细胞质中 Ca^{2+} 浓度升高) 对丹参培养细胞培养基 pH 影响如图 4 所示。

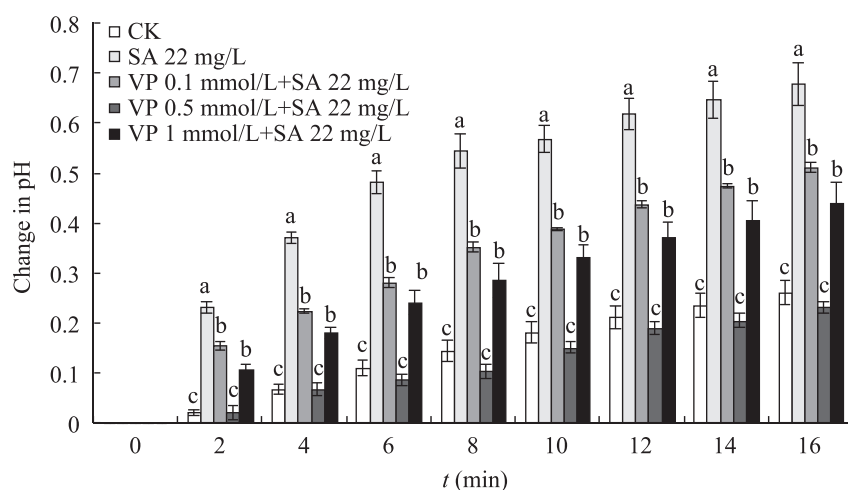


图 3 VP 对水杨酸诱导后丹参悬浮细胞培养液 pH 变化的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 3 Effect of verapamil on the change of pH induced by SA in the culture medium of *S. miltiorrhiza* suspension culture. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ($P<0.05$).

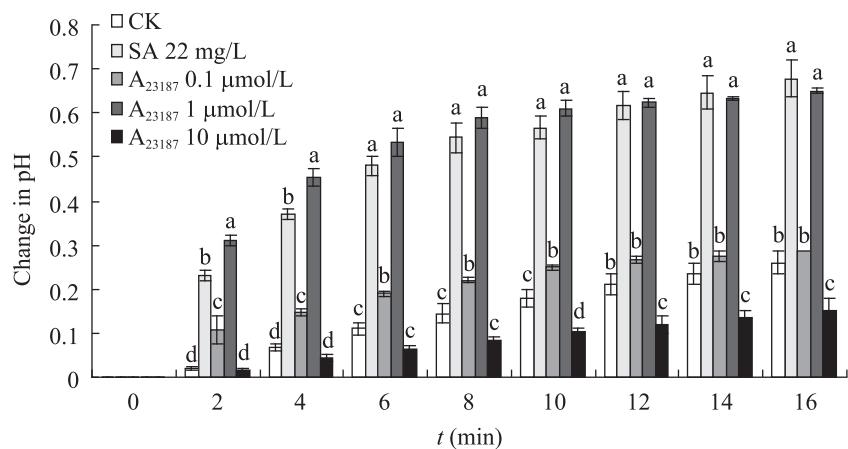


图 4 A_{23187} 对丹参悬浮细胞培养液 pH 的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 4 Effect of A_{23187} on the change of pH in the culture medium of *S. miltiorrhiza* suspension culture. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ($P<0.05$).

在实验设定浓度范围内, A_{23187} 对丹参培养细胞培养基 pH 影响表现出最佳浓度型特征, $0.1 \mu\text{mol/L}$ A_{23187} 只能少量提高培养基 pH, 但与空白对照相比仍有显著差异 ($P<0.05$)。 $1 \mu\text{mol/L}$ A_{23187} 可以显著促进培养基碱化, 效果与 22 mg/L 水杨酸处理相当, 但在处理后 4 min, A_{23187} 处理组培养基碱化速度显著快于水杨酸处理组 ($P<0.05$), 6 min 以后两处理 pH 变化差异不再显著 ($P>0.05$)。但当将 A_{23187} 浓度提高到 $10 \mu\text{mol/L}$ 时, A_{23187} 对培养基碱化不再具有促进作用, pH 变化甚至低于空白对照。

2.4 内膜系统钙离子通道抑制剂对 SA 诱导丹参培养细胞培养基 pH 的影响

2.4.1 2-APB 对 SA 诱导后丹参悬浮细胞培养基 pH 变化的影响

2-APB 对 SA 诱导丹参培养细胞培养基 pH 变化如图 5 所示, 2-APB 可以部分抑制 SA 诱导的培养基碱化过程, 但各处理组 pH 变化仍显著

高于空白对照, 2-APB 的抑制效果与其浓度呈正相关 (图 5)。在实验设定的浓度范围内, $30 \mu\text{mol/L}$ 的 2-APB 对 SA 诱导的丹参细胞培养基碱化的抑制效果最强。在处理 8 min 时, $30 \mu\text{mol/L}$ 的 2-APB 处理组 pH 上升了 0.313, 比 SA 单独处理组 (0.543) 低 42.4%, $15 \mu\text{mol/L}$ 处理组 (0.376) 和 $7.5 \mu\text{mol/L}$ 处理组 (0.483) 分别比 SA 单独处理组的 pH 变化低 16.8% 和 35.2%, 但即使是 $30 \mu\text{mol/L}$ 2-APB 处理组的 pH 上升值仍比空白对照组 (0.143) 高 119%, 差异显著 ($P<0.05$)。

2.4.2 LiCl 对 SA 诱导后丹参悬浮培养基 pH 变化的影响

LiCl 对 SA 诱导的培养细胞 pH 变化影响如图 6 所示。与 2-APB 抑制效果相似, LiCl 各浓度处理均可有效抑制 SA 诱导的培养基碱化过程, 但其 pH 上升仍显著高于空白对照 ($P<0.05$)。抑制效果随 LiCl 浓度增加而逐渐加强, 各处理组的 pH 变化差异显著 ($P<0.05$)。

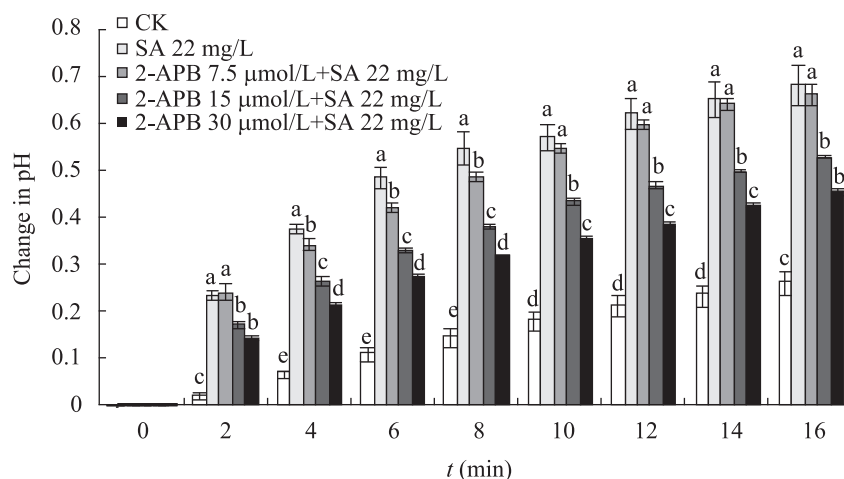


图 5 2-APB 对水杨酸诱导后丹参细胞培养液 pH 变化的影响 (图中不同字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 5 Effect of 2-APB on the change of pH induced by SA in the culture medium of *S. miltiorrhiza* suspension culture. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ($P<0.05$).

2.5 2-APB 与 LaCl_3 共处理对 SA 诱导后丹参悬浮培养基 pH 变化的影响

用 1 mmol/L 的 LaCl_3 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-APB 共处理, 结果显示 (图 7), 共处理组的培养基 pH 变化与空白对照无显著差异, 说明两种抑制剂同

时使用对培养基 pH 无明显影响。用水杨酸与两种抑制剂共处理, 结果显示培养基的 pH 呈现下降的趋势。说明 1 mmol/L 的 LaCl_3 和 30 $\mu\text{mol/L}$ 的 2-APB 可以完全抑制 SA 诱导的丹参细胞培养基碱化, 甚至还可以导致培养基酸化。

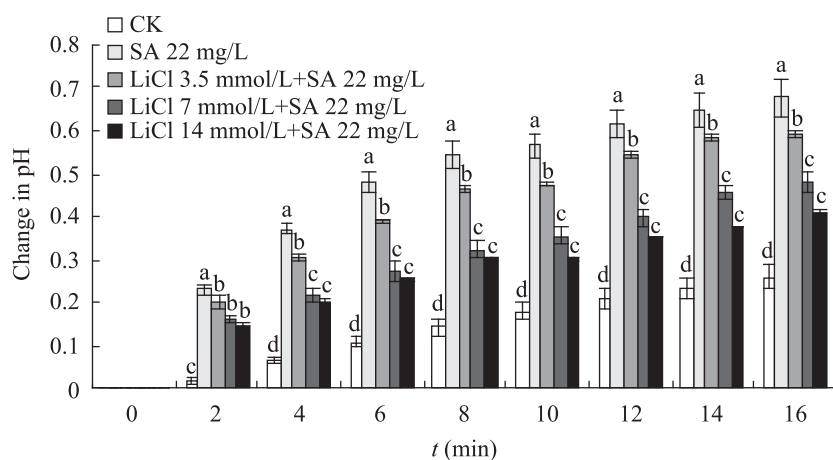


图 6 LiCl 对水杨酸诱导后丹参悬浮培养液 pH 变化的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 6 Effect of lithium chloride on the change of pH induced by SA in the culture medium of *S. miltiorrhiza* suspension culture. Different lowercases on the histongraphs with the different pattern indicate the significant differences ($P < 0.05$).

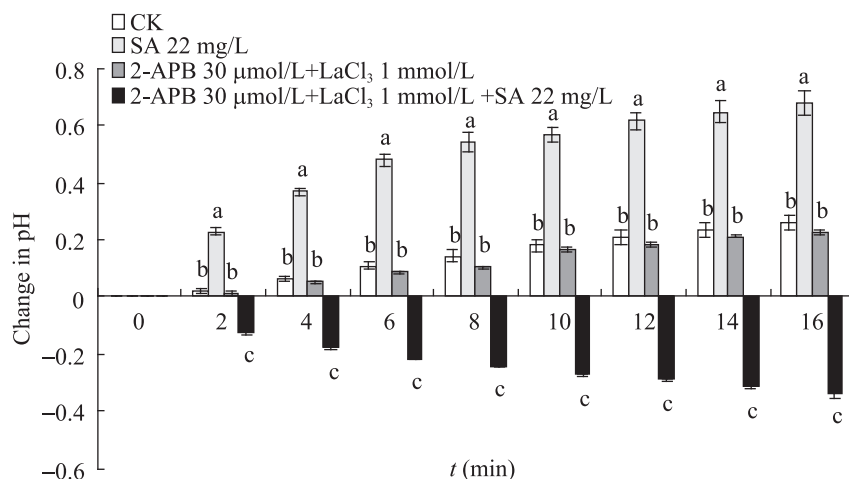


图 7 2-APB 和 LaCl_3 共处理对 SA 诱导丹参细胞培养液 pH 变化的影响 (图中不同字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 7 Effect of 2-APB and lanthanum on SA induced the change of *S. miltiorrhiza* suspension culture. Different lowercases on the histongraphs with the different pattern indicate the significant differences ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

培养基碱化(细胞质酸化)是植物细胞信号转导的早期信号事件^[20],广泛参与植物的生长发育及生理生化调控,如根尖生长^[21]、结瘤^[22]、次生代谢物的合成^[9,12]和植物抗性反应^[23]等。植物细胞膜两侧 pH 变化对于不同诱导子可能具有不同的响应机制,如来自黄枝孢霉的诱导子可以快速诱导番茄培养细胞培养基酸化^[24]。但大多数数据显示,伴随诱导发生的是培养基碱化(细胞质酸化),如赤霉素^[25]、ABA^[26]、核黄素^[27]、寡聚糖^[28]等诱导子均可以诱导培养基碱化过程的发生。与大部分实验结果一致,SA 可以有效诱导丹参培养细胞培养基碱化,并且培养基 pH 在诱导的前 8 min 迅速上升,后增长渐缓,但始终显著高于空白对照水平。pH 变化与 SA 处理浓度有明显的关系,表现出最佳浓度型特征。在试验设定范围内,22 mg/L 的 SA 诱导的 pH 升高最显著,与本课题前期对 SA 诱导丹参酚酸类次生代谢物生物合成的最佳浓度一致^[17]。

培养基碱化作为信号转导的一个重要步骤,与胞内其他信使有着密切联系。细胞质中 Ca^{2+} 浓度变化与细胞质酸化有直接关系,细胞质中高浓度的 Ca^{2+} 会抑制 H^+ -ATPase 的活性^[5]。降低 Ca^{2+} 的浓度可解除对 H^+ -ATPase 活性的抑制,使用钙离子螯合剂 BAPTA、EGTA 等调节 Ca^{2+} 浓度可以收到同样的效果,而 H^+ -ATPase 的抑制便会造成培养基的碱化^[12]。说明 Ca^{2+} 参与植物细胞培养基碱化过程的调控。在本试验中,质膜钙离子通道抑制剂 VP 和 LaCl_3 、内膜系统钙离子通道抑制剂 2-APB 和 LiCl 对 SA 诱导丹参细胞培

养培养基碱化具有显著的抑制作用。VP 和 LaCl_3 单独处理时,最佳浓度处理组培养基碱化程度显著低于 SA 单独处理组 ($P<0.05$),与空白对照无显著差异,说明抑制 Ca^{2+} 内流可以有效抑制水杨酸诱导的培养基碱化。钙离子载体 A_{23187} 处理同样可以诱导培养基的碱化过程,这从另一方面证明了 SA 诱导胞外 Ca^{2+} 内流参与了培养基碱化的调控。而用 2-APB 和 LiCl 单独处理时,最佳浓度处理培养基碱化程度也显著低于 SA 单独处理 ($P<0.05$),但仍显著高于空白对照组 ($P<0.05$)。说明 VP 和 LaCl_3 对培养基碱化过程的抑制较 2-APB 和 LiCl 更显著。从培养基碱化机制角度讲,胞外 Ca^{2+} 内流与 SA 诱导丹参培养细胞培养基碱化的关系比胞内钙库 Ca^{2+} 释放更密切。而当两类抑制剂同时使用时(2-APB 和 LaCl_3),培养基碱化过程不但完全被抑制,甚至出现酸化过程,表明除了细胞质中 Ca^{2+} 迸发参与了 SA 诱导的丹参培养细胞培养基碱化过程外,可能还存在着更复杂的机制调控质膜两侧的 pH 变化。植物细胞内 SA 受体具有过氧化氢酶活性^[29],与 SA 结合后酶活被抑制,进而诱发活性氧 (ROS) 积累^[17],而 ROS 也可有效激活质膜上的 H^+ -ATPase^[30],这可能是在抑制了 Ca^{2+} 迸发的同时添加 SA 引起培养基酸化的原因之一,但这一推测还缺乏直接的实验证据。

培养基碱化(细胞质酸化)发生迅速,用糖肽处理豌豆愈伤,30 s 后即出现跨膜 H^+ 流^[28],细胞质酸化可以诱发 ROS 迸发^[8],调节 K^+/Na^+ ^[30]从而增强植物抗逆性;上调植物次生代谢途径关键酶 PAL^[31-32]、3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶^[11]等酶的表达进而影响到植物次生代谢产物

的合成。本课题组前期研究结果表明, SA 作为诱导子可以有效提高丹参培养细胞中丹酚酸 B^[16-17]和迷迭香酸^[33]的生物合成, 胞内 H_2O_2 ^[17]和胞外 Ca^{2+} 内流^[18]等均与酚酸类次生代谢物的生物合成有关。诱导丹参培养细胞培养基碱化的 SA 最佳浓度与诱导丹参 PAL 等酶活性变化和酚酸类次生代谢物生物合成的最佳浓度一致^[17]。由此推测细胞质酸化参与了水杨酸诱导丹参培养细胞合成酚酸类次生代谢物过程。当然仅通过以上工作很难解释清楚细胞质酸化是如何介导 SA 诱导丹参培养细胞次生代谢应答以及 Ca^{2+} 在细胞质酸化过程中的作用, 需要通过进一步研究得出更详尽和更直接的证据。

综上所述, SA 可以有效诱导丹参培养细胞培养基碱化, SA 诱导的 Ca^{2+} 迸发参与了培养基碱化的诱导过程, 并且胞外 Ca^{2+} 内流对培养基碱化的影响比胞内钙库 Ca^{2+} 释放更显著。

REFERENCES

- [1] Reddy ASN. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci*, 2001, 160: 381–404.
- [2] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 388–395.
- [3] Roos W. Confocal pH topography in plant cells: shifts of proton distribution involved in plant signalling//Rengel Z, ed. *Handbook of Plant Growth: pH as A Major Variable in Plant Growth*. New York: CRC Press, 2001: 55–86.
- [4] Renelt A, Colling C, Hahlbrock K, et al. Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defense. *J Exp Bot*, 1993, 44: 257–268.
- [5] Toshinori K, Mitsuo N, Ken-ichiro S. Cytosolic concentration of Ca^{2+} regulates the plasma membrane H^+ -ATPase in guard cells of *Fava Bean*. *Plant Cell*, 1995, 7: 1333–1342.
- [6] Boller T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 189–214.
- [7] Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, et al. Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. *Eur J Biochem*, 1993, 213: 349–357.
- [8] Sakano K. Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism. *Int Rev Cytol*, 2001, 206: 1–44.
- [9] Werner R, Sven E, Margit H, et al. Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. *Plant Physiol*, 1998, 118: 349–364.
- [10] He DY, Yazaki Y, Nishiwawa Y, et al. Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, N-acetylchitoheptaose. *Mol Plant Microbe Interact*, 1998, 11: 1167–1174.
- [11] Lapous D, Mathieu Y, Guern J, et al. Increase of defense gene transcripts by cytoplasmic acidification in tobacco cell suspension cultures. *Planta*, 1998, 205(3): 452–458.
- [12] Armero J, Tena M. Possible role of plasma membrane H^+ -ATPase in the elicitation of phytoalexin and related isoflavone root secretion in chickpea (*Cicer arietinum* L.) seedlings. *Plant Sci*, 2001, 161: 791–798.
- [13] Viehveger K, Dordschbal B, Roos W. Elicitor-activated phospholipase A_2 generates lysophosphatidylcholines that mobilize the vacuolar H^+ -pool for pH signaling via the activation of Na^+ -dependent proton fluxes. *Plant Cell*, 2002, 14: 1509–1525.
- [14] The Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 53 (in Chinese).
中华人民共和国药典委员会. 中国药典. 北京:

- 化学工业出版社, 2005: 53.
- [15] Du GH, Zhang JT. Water-soluble phenolic compounds of *Salvia miltiorrhiza* advances in research of salvianolic acid. *Bas Med Sci Clin*, 2000, 20(5): 10–14 (in Chinese).
杜冠华, 张均田. 丹参水溶性有效成分——丹酚酸研究进展. *基础医学与临床*, 2000, 20(5): 10–14.
- [16] Dong J, Wan G, Liang Z. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *J Biotechnol*, 2010, 148(2): 99–104.
- [17] Chen HY, Liu LC, Dong JE, et al. Hydrogen peroxide involves in the signal transduction of salicylic acid-induced salvianolic acid B biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Chin J Biotech*, 2012, 28(7): 834–846 (in Chinese).
陈红艳, 刘连成, 董娟娥, 等. H_2O_2 参与水杨酸诱导丹参培养细胞中丹酚酸 B 合成的信号转导. *生物工程学报*, 2012, 28(7): 834–846.
- [18] Liu LC, Dong JE, Zhang JY, et al. Effects of calcium on synthesis of rosmarinic acid and related enzymes in the suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Chin J Biotech*, 2012, 28(11): 1359–1369 (in Chinese).
刘连成, 董娟娥, 张婧一, 等. Ca^{2+} 对丹参培养细胞中迷迭香酸合成及其相关酶活性的影响. *生物工程学报*, 2012, 28(11): 1359–1369.
- [19] Liu YB. Effects of salicylic acid induced *Salvia miltiorrhiza* suspension cells on secondary metabolism, cytoplasmic acidification and active oxygen[D]. Yangling: Northwest Agricultural and Forest University, 2008 (in Chinese).
刘元柏. 水杨酸对丹参悬浮培养细胞次生代谢、细胞质酸化和活性氧迸发的诱导作用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [20] Md AK, Sylvia L. Cytosolic calcium and pH signaling in plants under salinity stress. *Plant Signaling Behavior*, 2010, 5(3): 233–238.
- [21] Gibbon BC, Kropf DL. Cytosolic pH gradients associated with tip growth. *Science*, 1994, 263: 1419–1421.
- [22] Felle HH, Kondorosi E, Kondorosi A, et al. Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitooligosaccharide signals. *Plant J*, 1996, 10: 295–301.
- [23] Roos W, Viehweger K, Dordschbal B, et al. Intracellular pH signals in the induction of secondary pathways—the case of *Eschscholzia californica*. *J Plant Physiol*, 2006, 163: 369–381.
- [24] Rosario VE, Bronwyn JB, Verna JH, et al. Plant defense response to fungal pathogens: activation of host-plasma membrane H^+ -ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation. *Plant Physiol*, 1994, 104: 209–215.
- [25] Swanson S J, Jones R L. Gibberellic acid induces vacuolar acidification in barley aleurone. *Plant Cell*, 1996, 8: 2211–2221.
- [26] Beffagna N, Romai G, Meraviglia G, et al. Effects of abscisic acid and cytoplasmic pH on potassium and chloride efflux in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 503–510.
- [27] Liu F, Wei FF, Wang L, et al. Activation of reactive oxygen species and defense responses in tobacco cells treated with riboflavin. *Sci Agri Sin*, 2009, 42(12): 4175–4181 (in Chinese).
刘菲, 魏芳芳, 王蕾, 等. 核黄素对烟草悬浮细胞活性氧和防卫反应的激活作用. *中国农业科学*, 2009, 42(12): 4175–4181.
- [28] Masashi A, Kazuhiro T, Yuki I, et al. Association between ion fluxes and defense responses in pea and cowpea tissues. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(6): 698–706.
- [29] Chen Z, Silva H, Klessig DF. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, 262: 1883–1886.
- [30] Zhang F, Wang YP, Yang YL, et al. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 775–785.
- [31] Tsukahara H, Yoshimoto O. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activation and

- isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexins elicitors, vanadate and elevation of medium pH. *Plant Cell Physiol*, 1985, 26: 1101–1110.
- [32] Marc JM, Hagendoorn AM, Poortinga HW, et al. Effect of elicitors on the plasma membrane of *Petunia hybrida* cell suspensions: role of ΔpH in signal transduction. *Plant Physiol*, 1991, 96: 1261–1267.
- [33] Jiao ML, Cao RR, Chen HY, et al. Effects of salicylic acid on synthesis of rosmarinic acid and related enzymes in the suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Chin J Biotech*, 2012, 28(3): 320–328 (in Chinese).
- 焦蒙丽, 曹蓉蓉, 陈红艳, 等. 水杨酸对丹参培养细胞中迷迭香酸生物合成及其相关酶的影响. *生物工程学报*, 2012, 28(3): 320–328.
- (本文责编 郝丽芳)

英国科学家用大肠杆菌生产生物柴油

英国研究人员 4 月 22 日在美国《国家科学院学报》上报告说, 他们利用经基因工程改造的大肠杆菌, 成功生产出一种生物柴油。研究人员说, 这种柴油与传统柴油几乎一样, 不过要实现商业生产仍面临许多挑战。

现有含酒精或生物柴油的生物燃料需要复杂的生产工艺, 而且这种燃料不能与多数现代发动机完全兼容, 满足的只是一小部分需求。英国埃克塞特大学的研究小组希望找到一种具有类似石油属性的生物燃料。

大肠杆菌能将植物中的糖转化为脂肪, 研究人员利用这一特性通过合成生物学技术来制造生物柴油。他们从能发出生物冷光的发光杆菌等多种细菌中分离出代谢基因, 然后利用它们来改造大肠杆菌。经过改造的大肠杆菌能将植物中的糖转化为一种碳氢化合物分子, 这种分子在结构和化学性质上与 10 种零售柴油燃料中的碳氢化合物分子相同。

研究负责人说, 他们的目标是生产出一种无需改造发动机就能使用的生物燃料, 汽车生产厂家、消费者和加油站甚至都不会注意到它和传统燃料之间的差别, 或许可以称之为“生物化石燃料”。

研究人员表示, 尽管这种柴油与传统柴油几乎一样, 市面上的发动机等无需改造就可使用, 但目前还只能在实验室中少量生产, 他们接下来将继续研究这种生物燃料制造方式是否可用于商业化生产。

(来源: 新华网 2013-04-24)