

H₂O₂ 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

陈红艳¹, 刘连成¹, 董娟娥¹, 夏广东²

1 西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100

2 西安陆军学院, 陕西 西安 710108

陈红艳, 刘连成, 董娟娥, 等. H₂O₂ 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.

Chen HY, Liu LC, Dong JE, et al. Hydrogen peroxide is involved 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.

摘要: 过氧化氢 (Hydrogen peroxide, H₂O₂) 为活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的一种, 存在于许多生物体系中并介导植物中多种生理和生化过程。为了探讨 H₂O₂ 作为信号分子在水杨酸 (Salicylic acid, SA) 诱导丹参培养细胞合成丹酚酸 B (Salvianolic acid B, Sal B) 过程中的作用, 分别考察了 SA 和 H₂O₂、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、二甲基硫脲 (2-(4-carboxy-2-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl-3-oxide, DMTU) 及咪唑 (Imidazole, IMD) 对苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 和酪氨酸氨基转移酶 (Tyrosine aminotransferase, TAT) 的活性及 Sal B 含量的影响。结果表明, SA 处理可有效地诱导丹参培养细胞中 H₂O₂ 产生、PAL 和 TAT 活性升高以及 Sal B 合成积累量的增加; 外源施加 10~30 mmol/L H₂O₂ 也可以有效促进 PAL、TAT 活性升高和 Sal B 合成积累量的增加; 用 H₂O₂ 的清除剂 CAT 处理发现, CAT 对 SA 或外源 H₂O₂ 诱导的 Sal B 合成积累具有消除作用, 说明 H₂O₂ 可能作为 SA 诱导 Sal B 积累过程中的上游信号分子起作用; 用 H₂O₂ 淬灭剂 DMTU 处理, 可以有效抑制 SA 对 Sal B 合成的促进作用; 用质膜烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide vadenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶 (H₂O₂ 来源的主要酶) 抑制剂 IMD 处理, 可以抑制 Sal B 的合成, 但这种抑制效果可以部分被外源施加的 SA 削弱, 说明通过 NADPH 氧化酶产生的 H₂O₂ 受阻时, SA 诱导的 Sal B 合成积累也会受到抑制。表明 H₂O₂ 是介导 SA 诱导丹参培养细胞中 Sal B 合成积累的信号分子。

关键词: 丹参, 丹酚酸 B, 水杨酸, 过氧化氢, 信号转导

Received: November 9, 2011; **Accepted:** March 12, 2012

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项目资助。

Hydrogen peroxide is involved in the signal transduction of salicylic acid-induced salvianolic acid B biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures

Hongyan Chen¹, Liancheng Liu¹, Juan'e Dong¹, and Guangdong Xia²

¹ College of Life Sciences, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China

² Xi'an Lujun of Technology, Xi'an 710108, Shaanxi, China

Abstract: Hydrogen peroxide (H₂O₂), one of reactive oxygen species, is widely generated in many biological systems, and it mediates various physiological and biochemical process in plants. To investigate the role of H₂O₂ as a signaling molecule in the process of salicylic acid (SA)-induced Salvianolic acid B (Sal B) accumulation, we separately inspected the cultured cells of *Salvia miltiorrhiza* with SA, H₂O₂, Catalase (CAT), 2-(4-carboxy-2-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (DMTU) and Imidazole (IMD) to investigate the influence on the activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and tyrosine aminotransferase (TAT) and the accumulation of Sal B. Treatment of *S. miltiorrhiza* cells with SA resulted in an increase of H₂O₂, the increase of PAL and TAT and accumulation of Sal B. Exogenous application of 10~30 mmol/L H₂O₂ was found to effectively increase PAL and TAT activity as well as the Sal B content. CAT, a H₂O₂ scavenger, eliminated the Sal B-accumulating effects of exogenous H₂O₂ and SA. These indicated that H₂O₂ may serve as an upstream signaling molecule in the SA-induced accumulation of Sal B signal transduction pathway. Disposed by DMTU, a chemical trap for H₂O₂, as observed to be effective in inhibiting SA-induced accumulation of Sal B. IMD strongly inhibits the activity of NADPH oxidase, which is one of the main sources of H₂O₂ formation in plant cells. IMD treatment strongly inhibited the accumulation of Sal B in cultured cells of *S. miltiorrhiza*, but the effects of IMD, can be partially reversed by the exogenous SA. The accumulation of Sal B was blocked once the generation of H₂O₂ by NADPH oxidase was inhibited, and H₂O₂ served as signaling molecule mediated the SA-induced Sal B accumulation.

Keywords: *Salvia miltiorrhiza*, salvianolic acid B, salicylic acid, hydrogen peroxide, signal transduction

药材丹参为唇形科鼠尾草属植物丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 的干燥根及根茎, 具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦等功效^[1]。丹酚酸 B (Sal B) 是丹参中的一种酚酸类物质, 以 Sal B 为代表的酚酸类成分被认为是丹参中发挥药效的活性物质^[2]。Sal B 的生物合成是植物体细胞内一系列相关信号、酶及基因调控的复杂的生理过程, 其合成积累具有可调控性。目前普遍认为, 丹参酚酸类次生代谢物主要合成于两条代谢途径——苯丙烷代谢途径和迷迭香酸代谢途径。

苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是苯丙烷途径的第一关键酶^[3]。在各种生物逆境胁迫下, 植物细胞的特征反应之一是苯丙烷代谢途径的激活^[4]。L-苯丙氨酸被 PAL 催化合成肉桂酸, 再由肉桂酸-4-羟化酶 (Cinnamate-4-hydroxylase, CHA) 催化形成 4-香豆酸, 再转化成咖啡酸; L-酪氨酸被酪氨酸氨基转移酶 (TAT) 催化生成 3,4-二羟基苯丙氨酸, 由羟苯基丙酮酸还原酶 (Hydroxyphenylpyruvate reductase, HPPR) 催化生成 3,4-二羟基苯乳酸, 3,4-二羟基苯乳酸和咖啡酸在迷迭香酸合成酶

(Rosmarinic acid synthase, RAS) 催化下合成迷迭香酸, 再进一步合成 Sal B。

水杨酸 (Salicylic acid, SA) 是一种存在于植物体内的酚酸类物质, 被认为是一种内源信号调控细胞内氧化物水平从而抵御外界胁迫^[5]。当病原体侵害植物时, SA 可以快速积累到较高水平, 且与 CAT 结合并抑制其活性, 从而导致细胞内 H₂O₂ 含量迅速升高。H₂O₂ 可以作为信号分子诱导病原相关性蛋白表达以及激活系统获得性抗性活化^[6]。已有研究表明, SA 在激活植物对抗各种外界胁迫的抗性方面具有重要作用, 如外源施加 SA 可以有效提高芥菜的耐高温性^[7], 增加黄瓜的耐寒性^[8]、抗盐性^[9]及抗重金属胁迫能力^[10]等。SA 还可作为诱导子被广泛用于促进植物次生代谢物的合成^[11-12]。

H₂O₂ 为活性氧的一种, 具有较高的化学反应活性, 长期以来被认为是植物代谢中产生的一种毒副产品^[13]。现在研究表明, 由于 H₂O₂ 相对稳定、可以跨膜运输, 且较其他活性氧分子半衰期长, 在配体与受体的相互作用, 酶的激活、基因表达、细胞凋亡等过程中均发挥着作用。因此, H₂O₂ 被认为是在活性氧中最适合作信号分子的一种物质, 在植物受到各种刺激后介导多种代谢反应^[13]。植物体内 H₂O₂ 有多种来源, 一方面来自于光合作用和呼吸作用中的电子传递过程; 另一方面来源于酶途径, 包括烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 氧化酶、细胞壁过氧化物酶、胺氧化酶等^[13]。H₂O₂ 介导多种生理生化过程, 如系统获得性抗性 (Systemic acquired resistance, SAR)、过敏反应 (Hypersensitive resistance, HR)^[14-15]、细胞衰老^[16]、细胞程序化死亡

(Programmed cell death, PCD)^[17]等, 是植物对细胞内信号及外界刺激反应的重要调节物, 并可介导 ABA 信号来调节气孔开闭^[18-19]、黄瓜不定根的形成和发育^[20]、介导金丝桃次生代谢产物合成的过程^[21]。

有关 SA 与 H₂O₂ 之间的研究主要集中在 SA 作为防御反应过程中的信号物质与 H₂O₂ 之间的相互关系, 如在防御反应中 SA 参与的信号转导途径与升高的 H₂O₂ 含量水平有关^[6]、SA 作为上游调控物质激活氧化迸发^[22]以及外源施加 SA 对植物细胞内 H₂O₂ 的影响, 如外源施加 SA 和稻瘟病菌诱导水稻细胞内 H₂O₂ 积累及激活防御反应机制^[23]、SA 诱导的 H₂O₂ 参与的信号转导途径介导水稻根对镉的耐受性^[3]。有关 H₂O₂ 是否可以作为信号分子介导 SA 诱导的次生代谢物合成积累方面还知之甚少。

研究表明, 以 SA 作为诱导子可以有效提高丹参培养细胞中 Sal B 的合成^[24]。但对于外源施加的 SA 是如何被丹参细胞内的信号分子感受、传递并引起酚酸类化合物合成代谢的一系列过程还不清楚。目前报道的与植物细胞信号转导有关的生理和生化事件, 包括氧化迸发和活性氧积累、离子跨膜运输、水杨酸的调控作用等有关的信号分子有 Ca²⁺、IP₃、NO 及 cGMP 等^[13]。但对与植物细胞内次生代谢物合成有关的信号分子及其信号途径之间的关系了解还不深入。本文以丹参悬浮培养细胞为材料, 探讨 H₂O₂ 在介导 SA 诱导的丹参细胞 Sal B 合成积累过程中的作用, 以期为进一步了解与植物细胞内次生代谢物合成有关的信号分子及其信号转导途径奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 丹参悬浮培养细胞系的建立及培养条件

丹参种子来源于陕西天士力植物药业有限公司商洛丹参 GAP 药源基地。

1.1.1 无菌苗的诱导

将新鲜丹参种子用自来水冲洗 2~4 h, 用纱布去除表面蜡质层, 再用自来水冲洗 3 次, 然后于无菌操作间灭菌。首先, 在 70%乙醇 (分析纯, 西安三浦化学剂公司) 中冲泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 然后在 0.1% HgCl₂ (分析纯, 利祥汞业化工有限公司) 中灭菌 10~15 min, 无菌水冲洗 3 次, 接种在 MS 固体培养基上。培养基中含有 5.5 g/L 琼脂 (北京康倍斯科技有限公司) 和 30 g/L 蔗糖 (广州市金华大化学试剂有限公司) 培养条件: 培养温度 (25±2) °C, 光照时间 12~16 h, 光照强度 2 000~3 000 Lx。培养 2 个月。

1.1.2 愈伤组织诱导

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 固体诱导培养基上。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, 在光照条件下诱导出愈伤组织。将愈伤组织每 20 d 继代培养 1 次, 2 个月后其形态特征和生长速率稳定。

培养条件: 培养温度 (25±2) °C, 光照时间 12~16 h, 光照强度 2 000~3 000 Lx。

1.1.3 悬浮细胞培养

取转接后培养 15 d 的愈伤组织, 按愈伤组织与培养液 1:15 (W/V) 的比例转接到 MS 液体培养基上 (不含琼脂和植物生长调节物质, 含

30 g/L 蔗糖) 悬浮培养。培养温度为 25 °C, 摇床转速为 125 r/min, 黑暗培养。

1.2 诱导及处理方法

分别将 H₂O₂ (分析纯, 天津天力化学试剂有限公司)、DMTU (208-588-2, Sigma 公司)、CAT (C-9322, Sigma 公司) 及 IMD (B 0074, Sanland Chemical 公司) 溶液用 0.22 μm 微孔过滤膜过滤, 按照试验要求向培养基中加入不同浓度的上述溶液。另一组培养细胞中加入等体积的蒸馏水 (代替 H₂O₂、DMTU、CAT 及 IMD) 作为对照。各种处理试剂的添加时间为 SA 诱导处理前 30 min。

1.3 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 和酪氨酸氨基转移酶 (TAT) 活性检测

取新鲜培养材料, 置定性滤纸上, 用抽滤瓶抽去培养液后, 迅速用蒸馏水冲洗, 再用抽滤瓶抽去表面水分备用。

PAL 活性的测定按文献[25]的方法进行。在 290 nm 下测定吸光度, 以每分钟 OD 值变化 0.01 为一个酶活单位 U。

$$\text{PAL(U/g FW} \cdot \text{h)} = \frac{A_{290} \times V_1 \times v}{0.01 \times V_s \times \text{FW} \times t}$$

式中, V_1 : 酶液总体积 (mL); FW : 样品鲜重 (g); V_s : 测定时取酶液的体积 (mL); v : 反应液总体积 (mL); t : 反应时间 (h)。

TAT 活性的测定按文献[24]的方法进行。在 331 nm 下测定吸光度, 以每分钟 OD 值变化 0.01 为一个酶活单位 U。

计算公式如下:

$$\text{PAL(U/g FW} \cdot \text{h)} = \frac{A_{290} \times V_1 \times v}{0.01 \times V_s \times \text{FW} \times t}$$

$$\text{TAT}(\text{U/g FW} \cdot \text{h}) = \frac{A_{331} \times V_1 \times v}{0.01 \times V_s \times \text{FW} \times t}$$

式中, V_1 : 酶液总体积 (mL); FW : 样品鲜重 (g); V_s : 测定时取酶液的体积 (mL); v : 反应液总体积 (mL); t : 反应时间 (h)。

1.4 过氧化氢 (H_2O_2) 含量检测

H_2O_2 含量检测采用硫酸钛法^[26]。称取大约 0.2~0.3 g 的新鲜材料, 加入 5 mL 于 4 °C 下预冷的丙酮 (分析纯, 成都科龙), 在冰浴下迅速研磨成匀浆, 在 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min。取 2 mL 上清液, 加入 0.5 mL 5% 硫酸钛 (20044428, 分析纯, 国药集团) 混匀, 再加入 2 mL 浓氨水 (分析纯, 四川西陇) 混匀, 在 4 °C 下 10 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液。用 5 mL 2 mol/L 的浓硫酸 (分析纯, 四川西陇) 溶解沉淀, 在波长 415 nm 处测定吸光度。

1.5 Sal B 提取及含量检测

样品的制备: 收获丹参培养物, 在 1200 r/min 离心后收集细胞, 然后在 47 °C 真空干燥箱中干

燥至恒重。取 0.05 g 左右干燥细胞置具塞试管中, 用 70 : 30 (V/V) 的甲醇-水溶液超声波提取 45 min。提取液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后待检测。

Sal B 含量检测采用高效液相色谱法 (HPLC)^[24], 检测条件进行了适当修改。色谱条件为: 色谱柱, shim-pack VP-ODS (250 mm×4.6 mm, i.d. 5 μm); 流动相, 甲醇-水-冰乙酸 (体积比 43 : 56 : 1); 流速, 1 mL/min; 进样量, 10 μL ; 检测波长, 281 nm; 柱温, 30 °C。

2 结果与分析

2.1 水杨酸诱发丹参培养细胞 H_2O_2 释放、PAL 和 TAT 活化及 Sal B 合成

在水杨酸处理 10 min 后, 丹参培养细胞中 H_2O_2 含量开始明显增加, 并在处理 20 min 时达到第 1 个峰值, 随后下降; 在处理 50 min 时快速增加并在 2 h 左右达到第 2 个峰值 (图 1 A)。丹参培养细胞中 PAL 活性在诱导后 30 min 时出

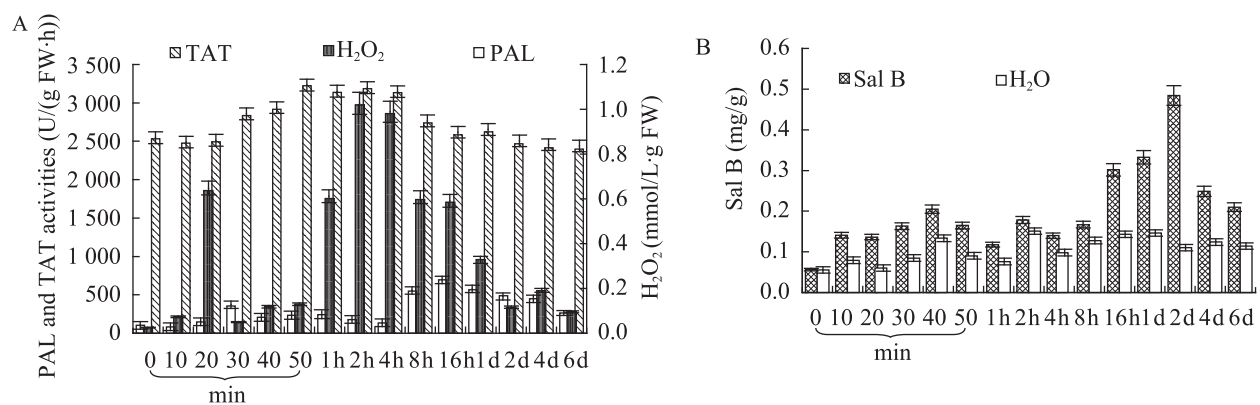


图 1 水杨酸诱导后丹参悬浮培养细胞中 H_2O_2 含量、PAL 活性、TAT 活性及 Sal B 含量变化

Fig. 1 Time courses of H_2O_2 generation, the increase of PAL and TAT activity, as well as Sal B production of *S. miltiorrhiza* suspension cells treated with SA. 8-d-old cells treated with 22 mg/L SA were harvested at the time indicated, and the PAL and TAT activity, contents of H_2O_2 and Sal B were determined. Values are means of three independent experiments. The control received vehicle solvent only. Bars represented standard errors.

现第 1 个峰值, 随后大幅度下降; 在 4 h 时快速增加并在 16 h 左右达到第 2 个峰值 (图 1 A)。TAT 活性在处理 30 min 开始上升, 在 50 min 左右达到峰值, 在 4 h 左右开始下降 (图 1 A)。丹参培养细胞中 Sal B 含量的升高稍晚于 PAL 活性的增加。在水杨酸处理 8 h 后细胞中 Sal B 的含量开始升高, 在 2 d 左右达到最高 (图 1 B)。以上结果表明, 水杨酸诱导的 PAL 活性及 Sal B 含量的升高均发生在 H₂O₂ 产生的峰值之后。说明 H₂O₂ 可能在 SA 诱导丹参培养细胞 Sal B 合成积累的过程中起重要作用。

2.2 H₂O₂ 在丹参培养细胞 PAL 和 TAT 活化、Sal B 合成过程中的作用

2.2.1 H₂O₂ 对培养细胞中 PAL、TAT 活性和 Sal B 含量的影响

用 H₂O₂ 水溶液单独处理丹参培养细胞后发现, H₂O₂ 对细胞中 PAL 和 TAT 活性及 Sal B 含量均具有明显的促进作用 (图 2)。

H₂O₂ 处理后, 细胞中的 PAL 活性在 20 min 出现第 1 个峰值, 随后下降; 处理 1 h 时, PAL

活性快速增加, 并在 8 h 达到第 2 个峰值。TAT 活性在处理 30 min 开始上升, 在 40 min 达到峰值, 在处理 4 h 左右开始下降 (图 2 A)。

Sal B 含量的升高稍晚于 PAL 和 TAT 活性的增加。H₂O₂ 处理 8 h 后, Sal B 的含量开始增加, 在处理 1 d 左右达到最高 (图 2 B)。

以上结果表明, H₂O₂ 处理后, 培养细胞中 PAL 和 TAT 的活化及 Sal B 含量的升高均明显比用 SA 单独处理时 (图 1 A) 有所提前。说明丹参培养细胞对 H₂O₂ 反应快于 SA 诱导。

2.2.2 培养细胞中酶活性变化和 Sal B 合成对 H₂O₂ 具有浓度依赖性

用不同浓度的 H₂O₂ 处理后, 与对照相比丹参培养细胞中 PAL 和 TAT 的活化及 Sal B 含量的增加对 H₂O₂ 具有浓度依赖性 (图 3)。

H₂O₂ 浓度在 1~10 mmol/L 范围内, 与对照组 (H₂O) 相比, 丹参细胞中 PAL 和 TAT 活性及 Sal B 含量的变化随着 H₂O₂ 浓度的增加而增加; 当 H₂O₂ 浓度超过 10 mmol/L 时, 对 PAL 和 TAT 活性及 Sal B 合成积累具有抑制作用。表明丹参培

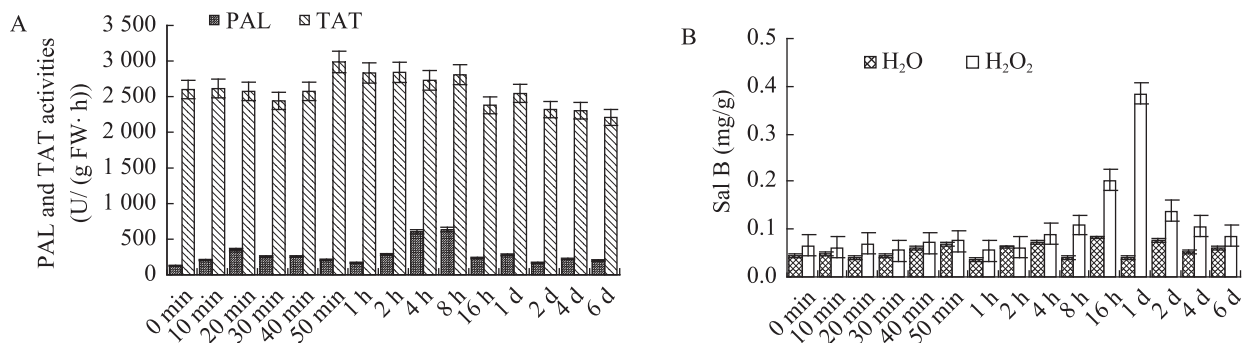


图 2 H₂O₂ 对丹参培养细胞 PAL、TAT 活性和 Sal B 含量的影响

Fig. 2 Time courses of Sal B production and PAL and TAT activity of *S. miltiorrhiza* suspension cells treated with H₂O₂. 8-d-old cells treated with 10 mmol/L H₂O₂ were harvested at the time as indicated, and Sal B contents and PAL and TAT activity were then determined. Values are means of three independent experiments. Bars represented standard errors.

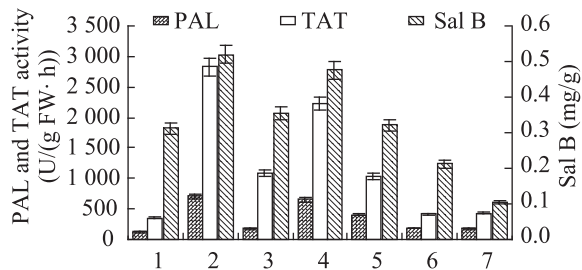


图3 不同浓度的 H₂O₂ 对丹参培养细胞 PAL、TAT 的活性和 Sal B 含量的影响

Fig. 3 Effects of different H₂O₂ concentrations on PAL and TAT activity as well as Sal B production of *S. miltiorrhiza* suspension cells. 8-d-old cells treated with different concentrations of H₂O₂ were harvested 8 h, 16 h and 2 d later, and the TAT and PAL activity as well as Sal B contents were then determined. Values are means of three independent experiments. Bars represented standard errors. 1: H₂O; 2: SA; 3: 1 mmol/L H₂O₂; 4: 10 mmol/L H₂O₂; 5: 30 mmol/L H₂O₂; 6: 50 mmol/L H₂O₂; 7: 70 mmol/L H₂O₂.

养细胞中 PAL 和 TAT 活性及 Sal B 合成积累对 H₂O₂ 具有浓度依赖性, 即低浓度的 H₂O₂ 对 Sal B 合成积累具有促进作用, 较高浓度的 H₂O₂ 对细胞造成伤害甚至杀死细胞, 导致 Sal B 的合成积累受到抑制。

不同浓度的 H₂O₂ 处理组与 SA 处理组相比, 即使使用最适 H₂O₂ 浓度 (10 mmol/L) 处理, 丹参细胞中 PAL 和 TAT 活性及 Sal B 含量仍低于 SA 处理组, 说明 H₂O₂ 并不是 SA 诱导丹参细胞中 Sal B 合成积累的唯一信号分子, 可能还存在其他途径共同介导 SA 诱导丹参细胞中 Sal B 合成积累。

2.3 SA 诱发 Sal B 合成及 PAL 和 TAT 的活化对 H₂O₂ 具有依赖性

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 是一种分子量 (240 kDa) 较大的 H₂O₂ 清除剂, 可以有效地清除

细胞质膜外的 H₂O₂^[19]。二甲基硫脲 (DMTU) 是一种常用的 H₂O₂ 淬灭剂^[27]。活性氧 (ROS) 可以通过质膜 NADPH 氧化酶把细胞质中 NADPH 的电子传递给 O₂ 从而形成 O₂⁻, O₂⁻ 然后通过歧化作用生成 H₂O₂^[29]。由质膜 NADPH 氧化酶产生的 H₂O₂ 作为信号分子已有很多报道^[29-30]。在哺乳动物中性粒细胞中发现的 NADPH 氧化酶复合物的抑制剂二苯基碘 (DPI) 和咪唑 (IMD) 能够抑制植物中由病原菌等诱导子诱导产生的 H₂O₂ 的积累^[14,31-32]。为了进一步证实 H₂O₂ 是 SA 促进丹参细胞中 PAL 和 TAT 活化及 Sal B 合成所必需的信号分子, 分别考查 H₂O₂ 清除剂 CAT、H₂O₂ 淬灭剂 DMTU 和 NADPH 氧化酶抑制剂 IMD 对 SA 处理下丹参悬浮细胞中 PAL 和 TAT 活化及 Sal B 合成的影响。

2.3.1 CAT 在 SA 及外源施加 H₂O₂ 诱导丹参培养细胞中 H₂O₂ 产生及 Sal B 积累过程中的作用

100 U CAT 单独处理丹参培养细胞时, CAT 组与对照组 (H₂O) 相比, H₂O₂ 及 Sal B 含量均没有明显变化 (图 4); 当用 CAT 与 22 mg/L SA 或 10 mmol/L H₂O₂ 联合处理时, CAT 对外源 H₂O₂ 诱导的丹参培养细胞内 H₂O₂ 及 Sal B 的含量均具有消除作用, 但不影响 SA 诱导丹参培养细胞内 H₂O₂ 的产生及 Sal B 的积累。这一结果说明, 外源施加的 CAT 不影响 SA 诱导的丹参培养细胞内 H₂O₂ 产生及 Sal B 积累, 但可以通过清除细胞外源 H₂O₂ 从而消除 H₂O₂ 引起的细胞内 H₂O₂ 的产生和 Sal B 的积累。主要是因为 CAT 是非细胞通透性分子, 外源施加不能清除掉细胞内的 H₂O₂。

2.3.2 DMTU 在外源施加 SA 及 H₂O₂ 诱导丹参培养细胞中 H₂O₂ 产生及 Sal B 积累过程中的作用

分别用 100、500 和 700 μmol/L 的 DMTU 单独处理丹参培养细胞, 与对照组 (H₂O) 相比, 当 DMTU 的浓度为 100 μmol/L 时, 丹参培养细胞中 H₂O₂ 及 Sal B 的产生受到抑制; 当 DMTU 的浓度为 500 μmol/L 时, 丹参细胞中 H₂O₂ 及 Sal B 的含量极显著降低 (图 5); 当 DMTU 的浓度为 700 μmol/L 时, 细胞中 H₂O₂ 及 Sal B 的产生被完全抑制 (数据未显示)。

分别用 100、500 和 700 μmol/L 的 DMTU 与

22 mg/L SA 或 10 mmol/L H₂O₂ 联合处理丹参培养细胞, 500 μmol/L 的 DMTU 明显抑制了外源施加的 H₂O₂ 对细胞内 H₂O₂ 及 Sal B 的诱导作用 (图 5); 700 μmol/L 的 DMTU 完全抑制了外源施加 H₂O₂ 或 SA 对丹参细胞内 H₂O₂ 及 Sal B 的诱导作用 (图中未显示)。

以上结果表明, 500 μmol/L 的 DMTU 对丹参细胞内 H₂O₂ 及 Sal B 合成积累的抑制作用可以被外源施加的 H₂O₂ 或 SA 所逆转; DMTU 对 H₂O₂ 或 SA 诱导丹参培养细胞内 H₂O₂ 及 Sal B 的产生的抑制作用具有浓度依赖性。

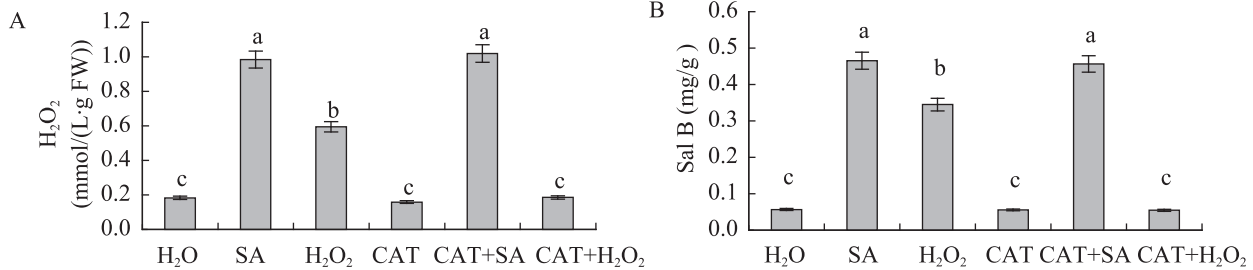


图 4 CAT (100 U) 对 SA (22 mg/L) 和外源 H₂O₂ (10 mmol/L) 处理诱导丹参培养细胞产生 H₂O₂ 及 Sal B 含量的影响
Fig. 4 Effects of CAT (100 U) on H₂O₂ and Sal B content treated with SA (22 mg/L) and H₂O₂ (10 mmol/L). 8-d-old cells treated with CAT before SA treatment 30 min were harvested 8 h and 2 d later, and the H₂O₂ and Sal B contents were then determined. Values are means of three independent experiments. Bars represented standard errors.

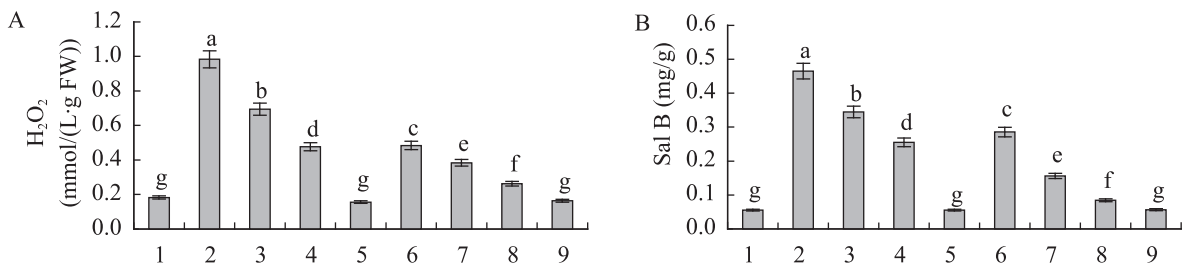


图 5 DMTU 对 SA (22 mg/L) 和外源施加 H₂O₂ (10 mmol/L) 处理诱导丹参培养细胞产生 H₂O₂ 及 Sal B 含量的影响
Fig. 5 Effects of different concentrations of DMTU on H₂O₂ and Sal B content treated with SA (22 mg/L) and H₂O₂ (10 mmol/L). 8-d-old cells treated with DMTU before SA treatment 30 min as indicated were harvested 8 h and 2 d later, and the H₂O₂ and Sal B contents were then determined. Values are means of three independent experiments. Bars represented standard errors. 1: H₂O; 2: SA; 3: H₂O₂; 4: 100 μmol/L DMTU; 5: 500 μmol/L DMTU; 6: 100 μmol/L DMTU+SA; 7: 500 μmol/L DMTU+SA; 8: 100 μmol/L DMTU+H₂O₂; 9: 500 μmol/L DMTU+H₂O₂.

2.3.3 IMD 在外源施加 SA 及 H₂O₂ 诱导丹参培养细胞中 H₂O₂ 产生及 Sal B 积累过程中的作用

NADPH 氧化酶是植物细胞内 H₂O₂ 产生的主要来源^[14,33-34]。IMD 是 NADPH 氧化酶特异性抑制剂,能够有效抑制 NADPH 氧化酶活性^[22-23]。前文证明了细胞内的 H₂O₂ 由 SA 诱导产生且对 Sal B 合成积累具有一定的作用,为了进一步明确 H₂O₂ 为 SA 诱导产生的细胞内的信号分子在诱导次生代谢物合成积累中的作用,用 IMD 抑制丹参培养细胞内 H₂O₂ 的产生,考察 H₂O₂ 的作用。

用 100~300 μmol/L 的 IMD 单独处理时,与对照组 (H₂O) 相比,IMD 可以有效抑制培养细胞中 H₂O₂ 及 Sal B 的产生;用 100 μmol/L 的 IMD 与 22 mg/L 的 SA 或 10 mmol/L 的 H₂O₂ 联合处理

时(图 6),100 μmol/L 的 IMD 的抑制作用可以被外源施加的 H₂O₂ 或 SA 逆转。当 IMD 的浓度高于 100 μmol/L 时,IMD 的抑制作用不会被外源施加的 H₂O₂ 或 SA 逆转(图中未显示)。原因是当用较高浓度的 IMD 处理时,IMD 通过抑制 NADPH 氧化酶活性从而抑制 H₂O₂ 产生,而 H₂O₂ 又是介导 Sal B 产生的信号分子,从而导致 Sal B 合成量降低;当用较高浓度的 IMD 与 SA 联合处理时,由于 NADPH 氧化酶的活性完全被抑制,SA 又无法诱导 NADPH 氧化酶活化,从而无法诱导 H₂O₂ 产生,最终导致 Sal B 的合成积累受阻。

综上所述,SA 在诱导丹参培养细胞 Sal B 合成积累过程中依赖于 NADPH 氧化酶产生的 H₂O₂,H₂O₂ 在介导 SA 诱导 Sal B 合成过程中起着信号分子的作用。

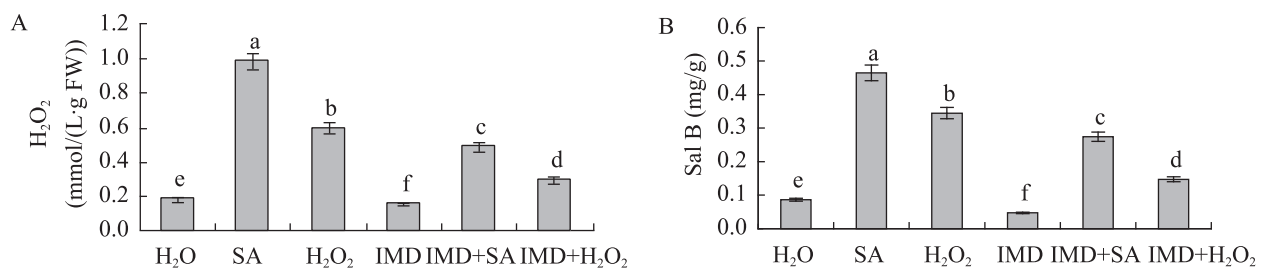


图 6 IMD (100 μmol/L) 对 SA (22 mg/L) 和外源施加 H₂O₂ (10 mmol/L) 处理诱导丹参培养细胞产生 H₂O₂ 及 Sal B 含量的影响

Fig. 6 Effects of IMD (100 μmol/L) on H₂O₂ and Sal B content treated with SA (22 mg/L) and H₂O₂ (10 mmol/L). 8-d-old cells treated with IMD before SA treatment 30 min as indicated were harvested 8 h and 2 d later, and the H₂O₂ and Sal B contents were then determined. Values are means of three independent experiments. Bars represented standard errors.

3 讨论与结论

在诱导子胁迫下,植物细胞可以活化多种生理和生化反应^[13],包括系统获得抗性(SAR)和过敏反应(HR),衰老、细胞程序化死亡、气孔

关闭、细胞壁发育等^[14]。其中通过过敏反应生成次生代谢物来缓解外界胁迫是植物细胞最典型的防卫反应之一。SA 作为诱导子可以有效提高丹参培养细胞中过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)及苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性^[35],而

这些酶与植物抗逆性密切相关,是植物防卫和生化反应的重要指标,酶活性的增高在一定程度上表征了植物细胞次生代谢能力的增强,有利于次生代谢产物的合成和积累。SA 有效地诱导丹参培养细胞中与次生代谢相关的酶类,如 PAL 和 TAT 活化及次生代谢产物咖啡酸和丹酚酸 B 的合成积累^[24,35]。本研究观察到,SA 处理丹参培养细胞后,PAL 和 TAT 活性均有所升高,二者在作用时间上互补,共同起着促进丹参培养细胞中 Sal B 合成积累的作用。

SA 在诱导防御反应中的作用机制是通过上游调控活性氧水平(如 H₂O₂ 含量)来完成^[22],如外源施加 SA 可以有效诱导烟草和拟南芥叶片中 H₂O₂ 的积累^[22,36]。SA 诱导丹参培养细胞 Sal B 合成积累过程中伴随有抗氧化酶类如 POD、SOD、CAT 活性的变化^[24],表明 SA 诱导 Sal B 积累过程中有活性氧的参与。本研究结果显示,SA 诱导丹参培养细胞中 H₂O₂ 的产生先于 PAL 活化及 Sal B 合成加强,说明丹参细胞中 H₂O₂ 的产生位于 PAL 活化和 Sal B 合成途径激活的上游。这与 Hung 等^[16]对 ABA 诱导水稻细胞花青素合成积累的研究结果相一致。

本实验中,外源施加低浓度的 H₂O₂ 可以有效促进丹参培养细胞中 PAL 和 TAT 活化和 Sal B 的合成积累(图 2),表明 H₂O₂ 是触发丹参细胞中 PAL 和 TAT 活化及 Sal B 合成加强的充分条件,且 Sal B 的合成积累对 H₂O₂ 具有浓度依赖性(图 3),但即使是在最适 H₂O₂ 浓度(10 mmol/L)作用下,丹参细胞中 Sal B 含量仍低于 SA 处理组,且 TAT 活性升高起始于 H₂O₂ 和 PAL 的第 1 个峰值出现之后,结束于 H₂O₂ 第 2 个峰值出现

之后(图 1),说明 H₂O₂ 是介导 Sal B 合成的重要信号分子,但不是唯一的决定因子。在丹参细胞中除了 H₂O₂ 外,可能还存在着其他信号分子或信号途径共同参与介导 SA 诱导丹参细胞中 Sal B 合成。

CAT 是 H₂O₂ 的有效清除剂,只能清除细胞外的 H₂O₂,对细胞内的 H₂O₂ 没有清除作用^[4,13]。本实验中,CAT 对外源施加的 H₂O₂ 诱导丹参培养细胞内 H₂O₂ 的产生及 Sal B 含量的积累具有消除作用,但不影响 SA 诱导丹参培养细胞内 H₂O₂ 的产生及 Sal B 的合成积累,说明 CAT 对丹参培养细胞内 H₂O₂ 产生及 Sal B 的合成并无作用,但是可以通过清除细胞外源 H₂O₂ 从而消除 H₂O₂ 对丹参细胞内 H₂O₂ 的产生和 Sal B 合成的促进作用。由于 CAT 不能透过细胞质膜,所以对 SA 诱导丹参细胞内 H₂O₂ 产生及 Sal B 合成积累没有产生影响,进一步说明 H₂O₂ 是由 SA 诱导后在丹参细胞内产生并起作用。

DMTU 作为一种 H₂O₂ 淬灭剂可以有效清除细胞内的 H₂O₂,如 DMTU 可以有效抑制 ABA 诱导水稻细胞中花青素的产生^[28]。本实验用 500 μmol/L 的 DMTU 处理可以抑制丹参细胞内 H₂O₂ 及 Sal B 的产生,且这种抑制作用可以被外源施加的 H₂O₂ 或 SA 逆转;但较高浓度(700 μmol/L)的 DMTU 可以完全抑制外源施加的 H₂O₂ 或 SA 对丹参细胞内 H₂O₂ 及 Sal B 的诱导作用,且抑制作用不可被 SA 或 H₂O₂ 逆转,表明一定浓度的 DMTU 可以削弱 H₂O₂ 或 SA 对丹参细胞中 Sal B 合成的诱导作用,说明 SA 诱导丹参培养细胞合成 Sal B 是通过 H₂O₂ 所介导的信号转导途径。

NADPH 氧化酶是植物细胞产生 H_2O_2 的主要酶类^[31,37]。IMD 能够有效抑制 NADPH 氧化酶的活性,从而抑制 H_2O_2 的产生。用 0.1 mmol/L 的 IMD 处理可以有效清除 ABA 诱导的水稻叶片中由 NADPH 氧化酶产生的 H_2O_2 ^[15]; 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 IMD 降低了 ABA 诱导的水稻叶片中花青素的合成,说明 H_2O_2 可能作为信号分子介导花青素的合成^[16]。本实验用 100 $\mu\text{mol/L}$ IMD 与 22 mg/L 的 SA 或 H_2O_2 联合处理丹参培养细胞,发现 IMD 对细胞内 H_2O_2 和 Sal B 的抑制作用可以被外源施加的 H_2O_2 或 SA 逆转。当用浓度大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 IMD 处理时,IMD 完全抑制了 NADPH 氧化酶的活性,以致完全阻断了 SA 诱导 Sal B 的合成。说明 IMD 对丹参培养细胞内 Sal B 合成积累的抑制作用依赖于由 NADPH 氧化酶所产生的 H_2O_2 , H_2O_2 作为信号分子在 SA 诱导丹参细胞合成 Sal B 中起重要作用。

综上所述,水杨酸可以诱导丹参悬浮细胞中 PAL 和 TAT 活化、Sal B 合成及 H_2O_2 产生,且水杨酸诱导丹参细胞中 H_2O_2 的产生先于 PAL 活化及 Sal B 合成加强,说明丹参细胞中 H_2O_2 的产生可能位于 PAL 活化及 Sal B 合成途径激活的上游。外源 H_2O_2 单独处理也能提高丹参细胞中 PAL 和 TAT 的活性及 Sal B 含量,表明 H_2O_2 是触发丹参细胞中 PAL 和 TAT 活化及 Sal B 合成加强的充分条件。 H_2O_2 清除剂 CAT、 H_2O_2 的淬灭剂 DMTU 和 NADPH 氧化酶抑制剂 IMD 阻断了水杨酸对丹参悬浮细胞中 H_2O_2 及 Sal B 合成的促进作用,又表明 H_2O_2 是水杨酸诱导子诱发丹参细胞中 Sal B 合成加强的必要条件。但由于 SA 和外源 H_2O_2 在诱导丹参培养细胞 Sal B 合成积累过程中, H_2O_2 的产生和 TAT 的活化没有时间上的

相关性,且即使在最佳浓度 H_2O_2 诱导下, H_2O_2 诱导的 Sal B 的合成量也未达到 SA 处理组,说明丹参细胞中还存在着其他信号分子或其他信号途径共同参与介导 SA 诱导 Sal B 合成积累。以上结果说明, H_2O_2 是水杨酸促进丹参培养细胞中 Sal B 合成、PAL 和 TAT 活化信号转导途径中所必需的信号分子,但不是唯一的信号分子。

REFERENCES

- [1] The Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia. Beijing: Chemical Industry Press, 2005: 53.
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.
- [2] 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.
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.
- [3] Pellinen RI, Korhonen MS, Tauriainen AA, et al. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in Birch. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 549-560.
- [4] Kima SH, Kronstad JW, Ellis BE. Induction of phenylalanine ammonia-lyase activity by tryptophan in *Ustilago maydis*. *Phytochemistry*, 2001, 58(6): 849-857.
- [5] Guo B, Liang YC, Zhu YG, et al. Role of salicylic acid in alleviating oxidative damage in rice roots (*Oryza sativa*) subjected to cadmium stress. *Environ Pollut*, 2007, 147(2): 743-749.
- [6] Chen ZX, Silvia H, Klessig DF. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 1993, 262(5141): 1883-1886.
- [7] Dat JF, Foyer CH, Scott IM. Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermo

- tolerance in mustard seedlings. *Plant Physiol*, 1998, 118(4): 1455–1461.
- [8] Kang HM, Saltveit ME. Chilling tolerance of maize, cucumber and rice seedling leaves and roots are differentially affected by salicylic acid. *Physiol Plant*, 2002, 115(4): 571–576.
- [9] Borsani O, Valpuesta V, Botella MA. Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*, 2001, 126(3): 1024–1030.
- [10] Metwally A, Finkemeier I, Georgi M, et al. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiol*, 2003, 132(1): 272–281.
- [11] Miao ZQ, Wei ZJ, Yuan YJ. Study on the effects of salicylic acid on tuxol biosynthesis. *Chin J Biotech*, 2000, 16(4): 509–513.
苗志奇, 未作君, 元英进. 水杨酸在紫杉醇生物合成中诱导作用的研究. *生物工程学报*, 2000, 16(4): 509–513.
- [12] Zhang Y, Wang Y, Jiang SC, et al. Cloning of the differential expression fragment from ginseng culture induced by salicylic acid. *Genomics Appl Biol*, 2009, 28(2): 245–250.
张悦, 王义, 蒋世翠, 等. 水杨酸诱导下人参培养物差异表达基因片段的克隆. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(2): 245–250.
- [13] Neill S, Desikan R, Hancock J. Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5(5): 388–395.
- [14] Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, et al. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, 1998, 92(6): 773–784.
- [15] Melillo MT, Leonetti P, Bongiovanni M, et al. Modulation of reactive oxygen species activities and H₂O₂ accumulation during compatible and incompatible tomato-root-knot nematode interactions. *New Phytol*, 2006, 170(3): 501–512
- [16] Hung KT, Hsu YT, Kao CH. Hydrogen peroxide is involved in methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. *Physiol Plant*, 2006, 127(2): 293–303.
- [17] Levine A, Tenhaken R, Dixon RA, et al. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 1994, 79(4): 583–593.
- [18] Lee S, Choi H, Suh S, et al. Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol*, 1999, 121(1): 147–152.
- [19] Zhang X, Zhang L, Dong FC, et al. Hydrogen peroxide is involved in abscisic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 1438–1448
- [20] Li SW, Xue LG, Xu SJ, et al. Hydrogen peroxide involvement in formation and development of adventitious roots in cucumber. *Plant Growth Regul*, 2007, 52(2): 173–180.
- [21] Xu MJ, Dong JF, Zhang XB. NO and H₂O₂ signal interaction in the cell-mediated heat shock-induced synthesis of hypericin in *Hypericum*. *Sci China (Ser C): Life Sci*, 2008, 38(7): 643–653.
徐茂军, 董菊芳, 张新波. NO 和 H₂O₂ 在介导热激诱发金丝桃细胞合成金丝桃素中的信号互作. *中国科学(C 辑): 生命科学*, 2008, 38(7): 643–653.
- [22] Chen Z, Ricigliano JW, Klessig DF. Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(20): 9533–9537.
- [23] Ganesan V, Thomas G. Salicylic acid response in rice: influence of salicylic acid on H₂O₂ accumulation and oxidative stress. *Plant Sci*, 2001, 160(6): 1095–1106.
- [24] Dong J, Wan GW, Liang ZS. 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(2/3): 99–104.
- [25] Wan GW, Dong JE, Lang ZS, et al. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) and polyphenol oxidase

- (PPO) activities of *in vitro* root under different culturing conditions in *Salvia miltiorrhiza*. Acta Bot Bor-Occident Sin, 2007, 27(12): 2417–2477.
- 宛国伟, 董娟娥, 梁宗锁, 等. 培养条件对离体丹参根苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶活性的影响. 西北植物学报, 2007, 27(12): 2471–2477.
- [26] Li SW, Xue LG, Xu SJ, et al. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. Environ Exp Bot, 2009, 65(1): 63–71.
- [27] Casano LM, Martín M, Sabater B. Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in Barley. Plant Physiol, 2001, 125(3): 1450–1458.
- [28] Kuo TH, Cheng DG, Hsu YT, et al. Abscisic acid-induced hydrogen peroxide is required for anthocyanin accumulation in leaves of rice seedlings. J Plant Physiol, 2008, 165(12): 1280–1287.
- [29] Tanou G, Molassitis A, Diamantidis G. Hydrogen peroxide- and nitric oxide-induced systemic antioxidant prime-like activity under NaCl-stress and stress-free conditions in citrus plants. J Plant Physiol, 2009, 166(17): 1904–1913.
- [30] Wang J, Higin VJ. Nitric oxide modulates H₂O₂-mediated defenses in the *Colletotrichum coccodes*-tomato interaction. Physiol Mol Plant Pathol, 2005, 67(3/5): 131–137.
- [31] Auh CK, Murphy TM. Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of O₂⁻ and H₂O₂ by phytophthora elicitor-stimulated rose cells. Plant Physiol, 1995, 107(4): 1241–1247.
- [32] Bestwick CS, Brown IR, Bennett MHR, et al. Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. Plant Cell, 1997, 9(2): 209–221.
- [33] Desikan R, Cheung MK, Bright J, et al. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. J Exp Bot, 2004, 55(395): 205–212.
- [34] Potikha TS, Collins CC, Johnson DI, et al. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. Plant Physiol, 1999, 119(3): 849–858.
- [35] Wan GW. Effect of elicitor on accumulation of salvianolic acid and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* Bunge callus[D]. Yangling: Northwest Agricultural and Forest University, 2008.
- 宛国伟. 诱导子对丹参酚酸类化合物含量及合成酶的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [36] Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP, et al. Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes: salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. Plant Physiol, 1997, 115(1): 137–149.
- [37] Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature, 2003, 422(6930): 442–446.