

# $\text{Ca}^{2+}$ 对丹参培养细胞中迷迭香酸合成及其相关酶活性的影响

刘连成<sup>1</sup>, 董娟娥<sup>1</sup>, 张婧一<sup>1</sup>, 党小琳<sup>1</sup>, 行冰玉<sup>1</sup>, 杨喜玲<sup>2</sup>

1 西北农林科技大学生命学院, 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学校医院, 陕西 杨凌 712100

刘连成, 董娟娥, 张婧一, 等.  $\text{Ca}^{2+}$ 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.

Liu LC, Dong JE, Zhang JY, et al. Effects of calcium on synthesis of rosmarinic acid and related enzymes in suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza*. Chin J Biotech, 2012, 28(11): 1359-1369.

**摘要:** 探究了外界  $\text{Ca}^{2+}$  (0~50 mmol/L) 对丹参培养细胞迷迭香酸合成及其相关酶活性的影响, 并利用细胞膜钙离子通道抑制剂异搏定 (Verpamil, VP) 及钙离子载体  $\text{A}_{23187}$  初步探讨了外界  $\text{Ca}^{2+}$  浓度变化影响丹参培养细胞次生代谢的机制。结果显示: 培养 6 d 时的丹参细胞中迷迭香酸积累量与外界  $\text{Ca}^{2+}$  浓度显著相关, 其中 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  最有利于迷迭香酸的合成, 迷迭香酸最大积累量达 20.149 mg/g DW, 比 1 mmol/L 和 3 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  处理分别高 37.3% 和 20.4%。分析迷迭香酸合成的两条支路上的关键酶 PAL 和 TAT 活性变化发现, 两种酶活性亦受外界  $\text{Ca}^{2+}$  浓度影响, 且活性变化先于迷迭香酸的积累, 说明这两种酶均参与迷迭香酸的生物合成, 但 PAL 比 TAT 促进作用更明显。进一步用 VP 和  $\text{A}_{23187}$  处理发现, 外界  $\text{Ca}^{2+}$  影响迷迭香酸的合成是通过影响胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度实现的, 胞外  $\text{Ca}^{2+}$  内流可能参与了这一过程。

**关键词:** 丹参, 迷迭香酸, 钙离子, 苯丙氨酸解氨酶, 酪氨酸氨基转移酶

**Received:** May 23, 2012; **Accepted:** August 7, 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资助。

# Effects of calcium on synthesis of rosmarinic acid and related enzymes in suspension cultures of *Salvia miltiorrhiza*

Liancheng Liu<sup>1</sup>, Juan'e Dong<sup>1</sup>, Jingyi Zhang<sup>1</sup>, Xiaolin Dang<sup>1</sup>, Bingyu Xing<sup>1</sup>, and Xiling Yang<sup>2</sup>

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

2 University Clinic, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi, China

**Abstract:** We studied the influence of the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  (0~50 mmol/L) in culture medium on the synthesis of rosmarinic acid (RA) and related enzymes in *Salvia miltiorrhiza* suspension cultures. Using verpamil (VP, a calcium channel antagonist) and ionophore  $\text{A}_{23187}$ , we studied the mechanism of secondary metabolites of *Salvia miltiorrhiza* suspension cultures influenced by the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the culture medium. The synthesis of intracellular RA in 6-day incubation was significantly dependent on the medium  $\text{Ca}^{2+}$  concentration. At the optimal  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of 10 mmol/L, a maximal RA content of 20.149 mg/g biomass dry weight was reached, which was about 37.3% and 20.4% higher than that at  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations of 1 and 3 mmol/L, respectively. The variation of the activity of PAL and TAT, two key enzymes of the two branches of RA, could be affected by the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in culture medium. The change of their activity occurred prior to the accumulation of RA, which suggested both of the key enzymes be involved in the synthesis of RA. Meanwhile, the enzymatic action of PAL was more distinct than TAT. The treatment of VP and  $\text{A}_{23187}$ , respectively, indicated that the influence of RA affected by the concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in the culture medium was accomplished by the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ , and the flow of  $\text{Ca}^{2+}$  from the extracellular to the intracellular environment could also participate in this process.

**Keywords:** *Salvia miltiorrhiza*, rosmarinic acid, calcium ion, phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine aminotransferase

$\text{Ca}^{2+}$ 作为一种胞内信号分子,主要通过参与细胞信号转导来介导植物的次生代谢应答<sup>[1]</sup>。外源  $\text{Ca}^{2+}$ 同样可以影响植物细胞的次生代谢,如外源  $\text{Ca}^{2+}$ 影响水蓼细胞中黄酮醇<sup>[2]</sup>、咖啡细胞中生物碱<sup>[3]</sup>、田七细胞中人参皂苷  $\text{Rb}_1$ <sup>[4]</sup>和曼陀罗细胞中莨菪碱<sup>[5]</sup>等次生代谢物的生物合成与积累。进一步研究发现,胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 对植物次生代谢物合成积累的影响可能是通过影响其次生代谢途径上的关键酶活性实现的。如不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$ 处理的曼陀罗毛状根中的莨菪碱合成量与其合成途径中的限速酶 PMT 的活性呈正相关关系<sup>[5]</sup>;田七悬浮培养细胞中人参皂苷  $\text{Rb}_1$ 的合成量依赖于外

源培养基的  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度,并与其代谢途径中的关键酶 UGRdGT 的活性呈正相关关系<sup>[4]</sup>。

胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度升高是植物细胞次生代谢应答信号转导最初事件之一,而跨细胞膜的  $\text{Ca}^{2+}$ 流是胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化的重要来源。Zhao 等<sup>[6]</sup>用钙离子载体<sup>[7]</sup> $\text{A}_{23187}$ (可以携带植物细胞外的  $\text{Ca}^{2+}$ 进入细胞内,使细胞质中  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高)和钙离子通道阻断剂<sup>[8-9]</sup>异搏定 (Verpamil, VP 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  $\text{Ca}^{2+}$ 流入细胞质)等证明了胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流可以促进墨西哥柏 *Cupressus lusitanica* 细胞中  $\beta$ -侧柏醇的合成。马力耕等<sup>[10]</sup>研究发现红光诱

导尾穗苋 *Amaranthus caudatus* 苋红素合成过程中需要的 Ca<sup>2+</sup>主要由胞外流入。外源 Ca<sup>2+</sup>浓度变化可能同样是通过增加胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度而实现对植物细胞生理生化过程的调控,如胞外 Ca<sup>2+</sup>浓度增加可以快速诱导田七悬浮细胞胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度升高,并与细胞内下游信号分子钙调素 (CaM)、钙或钙调素依赖的 NAD 激酶 (CCDNK)、钙依赖的蛋白激酶 (CDPK) 及人参皂苷 Rb<sub>1</sub> 积累量呈正相关。

迷迭香酸 (Rosmarinic acid, RA) 是植物体内的一种酚酸类次生代谢物,具有较强的抗氧化、抗菌、抗炎、保肝、抑肿瘤等作用<sup>[11]</sup>,是丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 中重要的有效成分之一。迷迭香酸的生物合成包括以苯丙氨酸和酪氨酸为起始物的两条平行的分支途径。在以苯丙氨酸为起始物的途径中,苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 是合成 RA 分子结构上咖啡酰基的关键酶<sup>[12]</sup>;在以酪氨酸为起始物的途径中,酪氨酸氨基转移酶 (Tyrosine aminotransferase, TAT) 是合成 RA 分子结构上 4-羟基苯乳酸部分的限速酶<sup>[13-14]</sup>。前期研究已经证明,在水杨酸 (SA) 诱导下,丹参悬浮培养细胞中 RA 的积累量与 PAL 和 TAT 的活性呈正相关关系<sup>[15]</sup>。但对外源 Ca<sup>2+</sup>是否影响迷迭香酸的生物合成及其作用机制仍一无所知。

本研究以丹参悬浮培养细胞为材料,通过设置含梯度浓度 Ca<sup>2+</sup>的培养基,考察外源 Ca<sup>2+</sup>与迷迭香酸积累及其合成相关酶活性的关系;进一步利用质膜 Ca<sup>2+</sup>通道抑制剂 (Verpamil, VP)、Ca<sup>2+</sup>载体 (A<sub>23187</sub>) 处理,探讨外源 Ca<sup>2+</sup>对 RA 生物合成的影响及作用机制,为实现对植物次生代谢的

定向调控提供理论依据。

## 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±2) °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 d 继代培养一次。培养条件同上。

### 1.2 Ca<sup>2+</sup>和抑制剂处理

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 °C、黑暗条件下悬浮培养。培养 6 d 后,取约 3 g 培养细胞,用不含 Ca<sup>2+</sup>的 MS 培养基冲洗掉培养细胞外的 Ca<sup>2+</sup>,然后转入 30 mL 不含 Ca<sup>2+</sup>的 MS 培养基中预培养 1 h,再分别向培养基中添加 Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, Sigma 公司,美国) 母液至实验设定浓度;抑制剂处理时,异搏定 (Sigma 公司,美国) 于 Ca<sup>2+</sup>母液添加前 30 min 加入培养基中进行预处理;钙离子载体处理时, A<sub>23187</sub> (Sigma 公司,美国) 与 Ca<sup>2+</sup>

母液同时添加到培养基。

### 1.3 酶活性检测

#### 1.3.1 PAL 活性测定

PAL 活性的测定按文献[16]的方法进行。取新鲜培养材料约 0.6 g, 迅速用去离子水冲洗掉培养细胞表面杂质, 再用抽滤瓶抽滤表面水分, 置预冷的研钵中。加入 4 mL 4 °C 下预冷的提取介质 [含 0.05 mol/L 硼酸缓冲液、5.0 mmol/L 巯基乙醇 (0482, Amresco)、1.0 mmol/L EDTA-2Na (分析纯, 广州金华大)、5% 甘油 (分析纯, 广东光华)、PVP (101210, 上海蓝季), pH 8.8], 冰浴下迅速研磨匀浆后, 过滤, 滤液在 4 °C 下 4 000 r/min 离心 15 min, 上清液用于检测酶活性。酶活性的测定系统包含: 酶液 0.5 mL, 硼酸缓冲液 (pH 8.8) 2 mL、0.02 mol/L 的 L-苯丙氨酸 (F20100805, 国药集团) 1 mL、蒸馏水 1 mL; 对照不加 L-苯丙氨酸, 用 1 mL 蒸馏水代替。反应液于 37 °C 水浴中保温 60 min 后加入 0.2 mL 6 mol/L HCl (分析纯, 四川西陇) 终止反应, 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。酶活性的计算公式如下:

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

式中,  $V_T$ : 酶液总体积 (mL);  $\text{FW}$ : 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)。

#### 1.3.2 TAT 活性测定

TAT 活性的测定按文献[17]的方法进行。取新鲜材料约 0.5 g, 迅速用去离子水洗净表面杂质, 再用抽滤瓶抽滤表面水分。加入 4 mL 4 °C 下预冷的提取介质[0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液、

0.1 mmol/L EDTA (分析纯, 广州市金华大化学试剂有限公司)、80 mmol/L  $\alpha$ -酮戊二酸 (K0005, WOLSEN)、0.2 mmol/L  $\text{VB}_6$  (01-079, 北京奥博星)、1 mmol/L DTT (C8166, Sanland Chemical), pH 7.3], 冰浴下迅速研磨匀浆后, 过滤, 滤液在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 30 min, 上清液用于酶活性的检测。测定系统含有酶液 0.2 mL、0.2 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.5) 3 mL、10 mmol/L  $\alpha$ -酮戊二酸 0.2 mL、88 mmol/L 酪氨酸 (F20090915, 国药集团) 0.2 mL、0.2 mmol/L  $\text{VB}_6$  0.1 mL。反应液于 37 °C 水浴中保温 30 min 后加入 0.5 mL 10 mol/L NaOH (分析纯, 广州市金华大化学试剂有限公司) 终止反应。然后于 37 °C 水浴中继续保温 30 min。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。酶活性的计算公式如下:

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

式中,  $V_T$ : 酶液总体积 (mL);  $\text{FW}$ : 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 迷迭香酸含量检测

迷迭香酸的提取采用超声波提取法, 含量检测采用高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[15]</sup>。将各处理新鲜的细胞培养物用定性滤纸包好, 在 90 °C 的烘箱中杀酶处理 10 min, 转入 47 °C 下真空干燥箱中干燥至恒重。提取时将培养物研成粉末, 称取约 0.05 g 干粉, 加入 70% 甲醇-水 (V/V) 溶液 3 mL, 用超声波提取 45 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液经 0.45  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜过滤, 待检测。

色谱条件：色谱柱：WondaSil C<sub>18</sub> 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm)；流动相：乙腈-水-磷酸 (25 : 75 : 0.1, V/V/V)，流动相使用前进行过滤和脱气处理；检测波长：285 nm；流速：1.0 mL/min；柱温：30 °C；进样量：10 μL。

标准曲线制作：精密称取迷迭香酸标准品 (纯度≥98%，中国药品生物制品鉴定所) 0.4 mg，溶解于 10 mL 的甲醇中得质量浓度为 0.04 mg/mL 的标准品溶液。将标准品溶液逐级稀释，得质量浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mg/mL 的标准品溶液，用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤后，分别在上述色谱条件下进样，获得相应色谱峰面积。以色谱峰面积与对应的迷迭香酸的浓度制作标准曲线 (图 1)，并计算标准曲线方程。

样品中迷迭香酸的含量计算公式为：

$$C = \frac{3 \times (0.00000006x + 0.016)}{m}$$

式中：C 为样品中迷迭香酸含量 (mg/g, DW)；x 为样品峰面积；m 为样品干重 (g)。

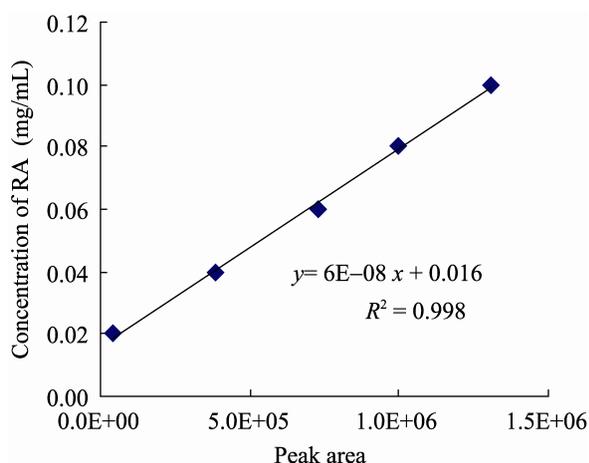


图 1 迷迭香酸标准曲线  
Fig. 1 The standard curves of RA.

## 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 Ca<sup>2+</sup>对丹参培养细胞中迷迭香酸合成量的影响

不同浓度 Ca<sup>2+</sup> (0~50 mmol/L) 对丹参培养细胞中迷迭香酸合成量的影响如图 2 所示。以 MS 培养基所含的 Ca<sup>2+</sup> (3 mmol/L) 和处理 0 d 作为对照，当培养介质不含 Ca<sup>2+</sup> 时，从培养的第 1~12 d，迷迭香酸合成量均显著低于对照。说明在不含 Ca<sup>2+</sup> 的培养介质中，迷迭香酸不能合成。同时还观察到，在不含 Ca<sup>2+</sup> 的培养介质中丹参细胞不能生长，很快褐化死亡；当培养介质中 Ca<sup>2+</sup> 浓度为 0.1 mmol/L 时，迷迭香酸合成量显著低于对照，但与不含 Ca<sup>2+</sup> 的处理有所不同的是，在培

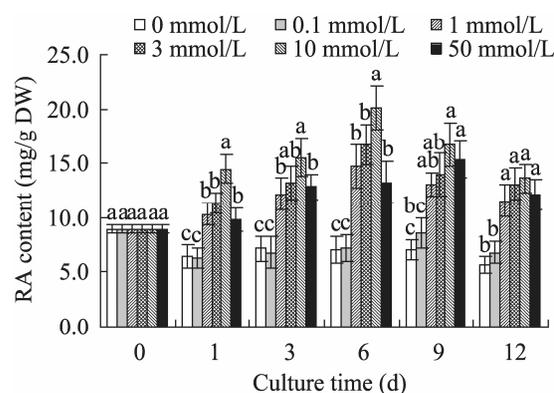


图 2 不同浓度 Ca<sup>2+</sup>对丹参培养细胞中迷迭香酸积累量的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)  
Fig. 2 Effects of Calcium in different concentration on the accumulation of RA in *S. miltiorrhiza* cultures. Different lowercases on the histongraphs with the different pattern indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ).

养的第9天有少量迷迭香酸合成,之后很快随着培养细胞的褐化死亡而消失。在含 0.1 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 的培养介质中,培养细胞仍然不能正常生长,但褐化死亡的时间比不含  $\text{Ca}^{2+}$ 时有所推迟。

当  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为 0~10 mmol/L 时,随着培养介质中  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高,迷迭香酸的合成量呈现升高的趋势,并以 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 处理的积累最高。当培养介质中  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为 50 mmol/L 时,培养细胞仍可以生长,但迷迭香酸的合成量在处理后的各阶段均比 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 处理低。

在处理的 1~12 d,各浓度  $\text{Ca}^{2+}$ 处理的培养细胞中迷迭香酸合成量均呈现先升高后降低的趋势。不同浓度处理表现的规律有所不同。 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为 1~10 mmol/L 时,迷迭香酸在处理后的第6天达到峰值; $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为 50 mmol/L 时,迷迭香酸在处理后的第9天达到峰值,较 10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 处理的积累量降低了 16.8%,但仍略高于 3 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 处理的积累量。

综上所述,在试验设定浓度范围内,10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 有利于丹参悬浮培养细胞中迷

迭香酸的合成积累,且迷迭香酸的积累量在处理后的 6 d 达到峰值 (20.149 mg/g DW),比处理浓度为 3 mmol/L (16.738 mg/g DW)、1 mmol/L (14.674 mg/g DW) 和 50 mmol/L (15.356 mg/g) 的分别高 20.4%、37.3%和 31.2%,在 5%水平上均有显著差异。

以上结果说明,  $\text{Ca}^{2+}$ 不仅是丹参培养细胞生长发育所必需的营养元素,更是迷迭香酸生物合成所不可缺的。培养基中含 1 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 即可满足丹参培养细胞的生长,但适宜浓度 (10 mmol/L) 的胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 可以促进丹参培养细胞中迷迭香酸的合成积累。迷迭香酸的合成积累对外源  $\text{Ca}^{2+}$ 的响应呈现最佳浓度型特征。

## 2.2 $\text{Ca}^{2+}$ 对丹参培养细胞中 PAL 和 TAT 活性的影响

在  $\text{Ca}^{2+}$ 处理后的 1~9 d 培养过程中, PAL 活性变化表现出双峰特性 (图 3A)。对照组 (3 mmol/L) 的酶活性于处理后的 10 h 达到第 1 个峰值,之后迅速下降,16 h 时降到最低值,此后又缓慢上升到处理后的 3 d 达到第 2 个峰值,

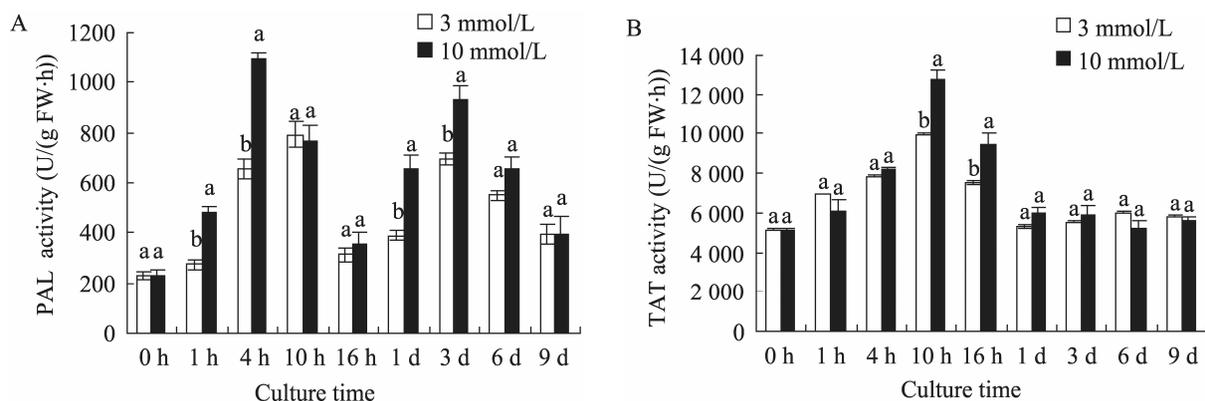


图 3 不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$ 对丹参细胞中 PAL (A) 和 TAT (B) 活性的影响 (图中不同的字母表示在 5%水平差异显著)  
Fig. 3 Time course of PAL (A) and TAT (B) activities after Calcium treatment. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ).

之后又下降至第9天时的最低值。10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 处理组 PAL 活性的第 1 个峰值出现在处理后的 4 h, 显著高于对照; 处理 3 d 时达到第 2 个峰值, 也显著高于对照组酶活性 ( $P < 0.05$ )。说明 10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 处理显著提高了 PAL 活性, 并使酶活性的峰值出现时间提前、持续时间延长。

在培养的 1~9 d, TAT 活性变化表现出单峰特征 (图 3B)。对照组 (3 mmol/L) 的酶活性变化与处理组 (10 mmol/L) 的变化趋势一致, 均是在处理后的 10 h 出现峰值; 在处理 1~9 d 期间, 酶活性变化较为平缓。从酶活性的峰值来看, 处理组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。说明 10 mmol/L 的  $\text{Ca}^{2+}$ 处理也显著提高了 TAT 活性。

### 2.3 异搏定 (VP) 及钙离子载体 ( $\text{A}_{23187}$ ) 对丹参培养细胞中迷迭香酸合成的影响

为了探讨外源  $\text{Ca}^{2+}$ 是如何影响丹参培养细胞中迷迭香酸合成及其相关酶活性, 选用质膜钙离子通道阻断剂 VP 和钙离子载体  $\text{A}_{23187}$  对培养体系进行处理。结果见图 4 和图 5。

在含 3 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 培养环境下 (对照), 0.1 mmol/L 的 VP 显著抑制了迷迭香酸的合成。处理第 6 天时, 迷迭香酸积累量较对照低 40.5%。将培养环境中的  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度提高到 10 mmol/L 时, 有效缓解了 VP 对迷迭香酸合成的抑制作用。在处理后的第 6 天, 迷迭香酸积累量与对照无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

在含 3 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 培养环境下, 0.1 mmol/L 的 VP 和 1  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{A}_{23187}$  共处理, 可以有效逆转 VP 对迷迭香酸合成的抑制作用。处理后的第 6 天, 迷迭香酸含量与对照无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

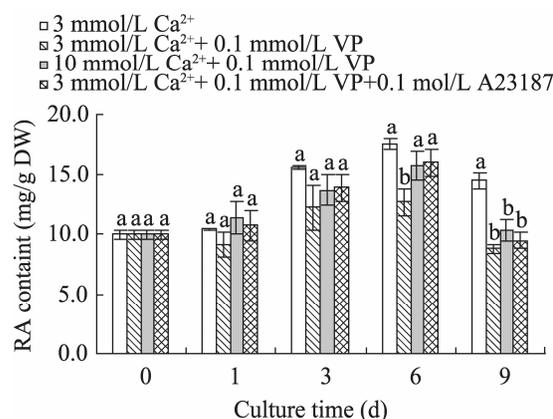


图 4 异搏定、 $\text{A}_{23187}$  和  $\text{Ca}^{2+}$ 对丹参细胞迷迭香酸积累量的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)  
Fig. 4 Effects of verapamil and  $\text{A}_{23187}$  on the accumulation of RA in *S. miltiorrhiza* cell cultures. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ).

以上结果说明, 胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流可能参与了丹参培养细胞中迷迭香酸的合成, 提高外源  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度促进了胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 流入细胞内而促进培养细胞中迷迭香酸的合成。

### 2.4 异搏定及 $\text{A}_{23187}$ 对丹参培养细胞中 PAL 和 TAT 活性的影响

为了说明细胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 通过流入细胞内而促进迷迭香酸的合成, 进一步考察了 VP、 $\text{A}_{23187}$  处理对 PAL 和 TAT 活性的影响。

在 3 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 培养环境下 (对照), 0.1 mmol/L 的 VP 有效抑制了 PAL 的活性 (图 5A), PAL 活性的峰值显著降低 ( $P < 0.05$ )。VP 处理 10 h 时的酶活降低为对照的 50.3%, 处理 3 d 时的酶活降低为对照的 48.5%。将外界培养环境的  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度提高到 10 mmol/L 或添加 1  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{A}_{23187}$  处理, 明显缓解了 VP 对 PAL 酶活的抑制作用, 处理 10 h 和 3 d 时的酶活性与对照无显著差异。

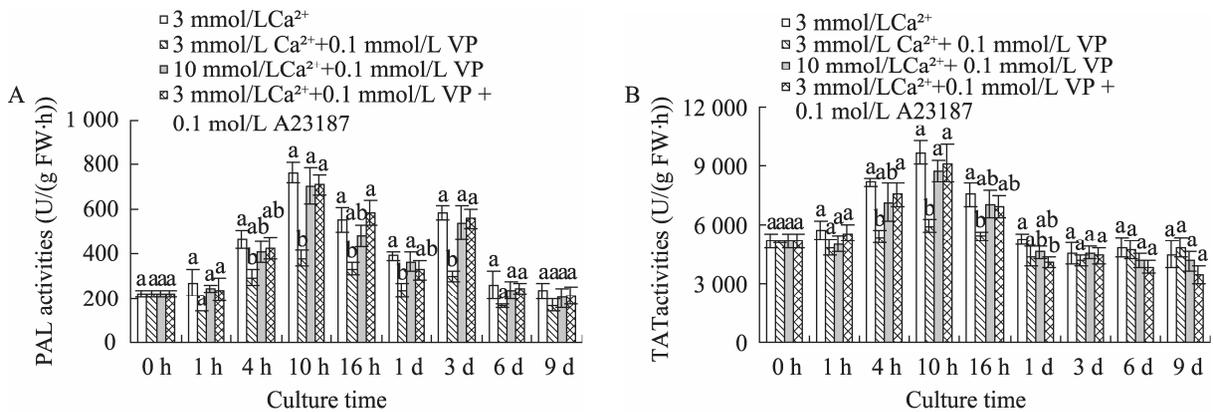


图5 异搏定、A<sub>23187</sub>和Ca<sup>2+</sup>对丹参细胞中PAL(A)和TAT(B)活性的影响(图中不同的字母表示在5%水平差异显著)

Fig. 5 Time course of PAL (A) and TAT (B) activities after Verapamil, Calcium and ionophore A<sub>23187</sub> treatment. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ).

VP同样有效抑制了TAT的活性(图5B)。3 mmol/L的Ca<sup>2+</sup>培养环境下,0.1 mmol/L VP处理下TAT活性的峰值显著低于对照( $P < 0.05$ ),处理10 h时TAT活性降低为对照的38.5%。将培养环境的Ca<sup>2+</sup>浓度提高到10 mmol/L或添加1 μmol/L A<sub>23187</sub>处理,明显缓解了VP对TAT酶活性的抑制作用,处理10 h时酶活性与对照无显著差异。

### 3 讨论与结论

Ca<sup>2+</sup>是植物必需的大量元素之一,在植物生长发育和抗逆性中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。Ca<sup>2+</sup>还可以影响植物的次生代谢,如尾穗苋中苋红素<sup>[10]</sup>,拟南芥叶片中花色苷<sup>[19]</sup>的合成均需培养液中Ca<sup>2+</sup>的参与;提高培养介质中Ca<sup>2+</sup>还可以提高水蓼细胞中黄酮醇<sup>[2]</sup>,咖啡中的生物碱<sup>[3]</sup>,田七细胞中人参皂苷Rb<sub>1</sub>的含量<sup>[4]</sup>,低浓度的Ca<sup>2+</sup>可以降低曼陀罗细胞中莨菪碱的积累<sup>[5]</sup>。但与以上结果不同的是,在洋地黄强心苷<sup>[20]</sup>的积累中,培养介质

中的Ca<sup>2+</sup>却是限制因素,去除培养液中Ca<sup>2+</sup>可以显著提高强心苷的含量。这说明外界Ca<sup>2+</sup>对不同植物或不同次生代谢物合成的影响是不同的。本研究表明,Ca<sup>2+</sup>在丹参培养细胞迷迭香酸合成中是必需的,当培养基中Ca<sup>2+</sup>浓度小于0.1 mmol/L时,迷迭香酸几乎不合成。0.1~50 mmol/L的Ca<sup>2+</sup>环境下,迷迭香酸合成积累均可进行。在试验范围内,10 mmol/L的Ca<sup>2+</sup>有利于迷迭香酸的合成与积累,可在短时间内达到积累高峰。说明Ca<sup>2+</sup>对迷迭香酸的合成的促进作用具有最佳浓度型特征,与对田七的研究结果一致<sup>[4]</sup>。

细胞外Ca<sup>2+</sup>对植物次生代谢的影响通过改变相应次生代谢途径中相关酶的活性而实现,如降低培养基中Ca<sup>2+</sup>浓度,在曼陀罗细胞中莨菪碱合成减少的同时,与之合成积累密切相关的钙依赖的氧化酶及莨菪碱合成途径关键酶PMT的活性均有相应降低;在0~8 mmol/L浓度的Ca<sup>2+</sup>环境中,田七细胞中人参皂苷Rb<sub>1</sub>合成量与其合成途径关键酶UDPG活性呈正相关关系。本研究

中, 10 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ 处理后, 迷迭香酸的积累量在处理后的第 1 天开始升高, 到处理后的第 6 天达到峰值, 与对照达到显著差异 ( $P < 0.05$ ), 之后缓慢下降, 但整个处理过程始终高于对照。与酶活性变化趋势相比 (图 3), 在迷迭香酸积累量达到高峰前, PAL 和 TAT 的活性均有显著提高, 且迷迭香酸的合成积累出现在酶活化之后。 $\text{Ca}^{2+}$ 处理后, PAL 活性表现出双峰特征, 且随  $\text{Ca}^{2+}$ 处理浓度增大, 酶活升高提前, 峰值持续时间延长; TAT 只在处理后 10 h 时出现酶活性的峰值, 且峰值持续时间也相对较短, 之后更长时间内再无明显变化。PAL 和 TAT 第一个峰值的出现可能是因为“转移”或“稀释”效应<sup>[23]</sup>引起的, 与牛舌草<sup>[21]</sup>和紫草<sup>[22]</sup>的研究结果一致。在处理 1 d 后, 培养细胞内有少量迷迭香酸增加, 推测是由  $\text{Ca}^{2+}$ 处理 10 h 后的 PAL 和 TAT 活化引起; 在处理后的 1~6 d, PAL 有明显的第二次活化, TAT 却没有较大变化, 说明 PAL 和 TAT 均与迷迭香酸的生物合成有关, 但迷迭香酸的合成积累与 PAL 相关性较强<sup>[15]</sup>。

胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 是植物细胞中将外界刺激转换成胞内信号的关键信使分子之一<sup>[24]</sup>, 胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化与植物生理生化反应密切相关。胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 可以通过影响胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度进而影响植物细胞的生理生化反应, 这一点已经在保卫细胞的研究中得到证实<sup>[25]</sup>, Yue 等<sup>[4]</sup>证明, 胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加可以快速诱导田七悬浮细胞胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高, 并且该变化与细胞中人参皂苷  $\text{Rb}_1$  积累量成正比。进一步利用异搏定处理证明, 胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度增加是由胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流造成的。Zhao 等<sup>[6]</sup>发现钙离子载体  $\text{A}_{23187}$  可以单独或协同真菌诱导子促进墨西哥柏细胞合成  $\beta$ -欧侧柏酚的合成, 异搏

定等质膜钙离子通道抑制剂可以部分抑制上述促进效应, 说明胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流促进了  $\beta$ -欧侧柏酚的生物合成。本试验中, 在 3 mmol/L 环境下, 用 0.1 mmol/L 的 VP 处理, 可以显著降低迷迭香酸积累量, 同时 PAL 和 TAT 活性也均显著降低。这说明胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流可能也参与了迷迭香酸合成的调控。用 0.1 mmol/L 的 VP 与 1  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{Ca}^{2+}$ 载体  $\text{A}_{23187}$  联合处理, 发现 VP 对迷迭香酸合成的抑制作用被显著缓解, PAL 和 TAT 活性也有所提高, 与对照无显著差异。说明胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流可能参与了丹参培养细胞迷迭香酸合成的调控。当将外界  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度由 3 mmol/L 升高到 10 mmol/L 时, 0.1 mmol/L 的 VP 处理对迷迭香酸合成的抑制作用同样被消除, 说明高浓度的外界  $\text{Ca}^{2+}$ 通过某种机制促进了胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 内流, 进而产生特定的胞内钙信号传递至下游, 提高了迷迭香酸的合成积累。

综上所述, 适宜浓度的  $\text{Ca}^{2+}$ 处理可以显著提高丹参培养细胞中迷迭香酸积的合成积累量, 并且这种促进作用主要是通过影响迷迭香酸合成途径中关键酶 PAL 活性实现的。适当提高培养介质中  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度, 增加了丹参培养细胞外界  $\text{Ca}^{2+}$ 内流参与了 PAL 的活化, 进而调控了丹参培养细胞中迷迭香酸的生物合成。

## REFERENCES

- [1] Reddy ASN. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci*, 2001, 160(3): 381–404.
- [2] Nakao M, Ono K, Takio S. The effect of calcium on flavanol production in cell suspension cultures of *Polygonum hydropiper*. *Plant Cell Rep*, 1999, 18(9): 759–763.
- [3] Bramble JL, Graves DJ, Brodelius P. Calcium and

- phosphate effects on growth and alkaloid production in *Coffea arabica*: experimental results and mathematical model. *Biotechnol Bioeng*, 1991, 37(9): 859–868.
- [4] Yue CJ, Zhong JJ. Impact of external calcium and calcium sensors on ginsenoside Rb<sub>1</sub> biosynthesis by *Panax notoginseng* cells. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 89(4): 444–452.
- [5] Piñol MT, Palazón J, Cusidó RM, et al. Influence of calcium ion-concentration in the medium on tropane alkaloid accumulation in *Datura stramonium* hairy roots. *Plant Sci*, 1999, 141(1): 41–49.
- [6] Zhao J, Sakai K. Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced  $\beta$ -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *J Exp Bot*, 2003, 54(383): 647–656.
- [7] Christie JM, Jenkins GI. Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce ehalconesynthase gene expression in *Arabidopsis* cell. *Plant Cell*, 1996, 8(9): 1555–1567.
- [8] Gelli A, Blumwald E. Calcium retrieval from vacuolar pools (Characterization of a vacuolar calcium channel). *Plant Physiol*, 1993, 102(4): 1139–1146.
- [9] Klüsener B, Boheim G, Liss H, et al. Gadolinium sensitive, voltage dependent calcium release channels in the endoplasmic reticulum of a higher plant mechanoreceptor organ. *EMBO J*, 1995, 14(12): 2708–2714.
- [10] Ma LG, Zhou JL, An Y, et al. Effects of calcium in the biosynthesis of Amaranthin regulated by red light in *Amaranthus caudatus*. *Chin Sci Bull*, 1995, 40(10): 944–946.  
马力耕, 周君莉, 安宜, 等. 钙在红光调节的尾穗苋苋红素合成中的作用. *科学通报*, 1995, 40(10): 944–946.
- [11] Su P, Wang GN, Wu D, et al. Progress in rosmarinic acid biological activities and its sources. *Food Ferment Ind*, 2008, 34(12): 135–138.  
苏平, 王根女, 吴丹, 等. 迷迭香酸的生理活性功能及其来源研究进展. *食品与发酵工业*, 2008, 34(12): 135–138.
- [12] Mizukami H, Ogawa T, Ohashi H, et al. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. *Plant Cell Rep*, 1992, 11(9): 480–483.
- [13] Yan Q, Shi M, Ng J, et al. Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Sci*, 2006, 170(4): 853–858.
- [14] Mizukami H, Tabira Y, Ellis BE. Methyl jasmonate-induced rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*, 1993, 12(12): 706–709.
- [15] 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.  
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.
- [16] 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.
- [17] Wan GW, Dong JE, Liang 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.
- [18] Sun X. Mechanisms of Plant Nutrition. Beijing: China Agricultural University Press, 1991.  
孙羲. 植物营养原理. 北京: 中国农业出版社, 1991.
- [19] Wang M, Zhang YJ, Wang XJ. Extracellular Ca<sup>2+</sup> and cell membrane components involved in anthocyanin accumulation induced by blue light in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Biophys Sin*, 2008, 24(6): 451–459.

- 王曼, 张玉进, 王小菁. 胞外钙离子以及细胞膜组分参与蓝光诱导拟南芥叶片花色素苷的积累. 生物物理学报, 2008, 24(6): 451-459.
- [20] Cacho M, Morán M, Tárrago JF, et al. Calcium restriction induces cardenolide accumulation in cell suspension cultures of *Digitalis thapsi* L. Plant Cell Rep, 1995, 14(12): 786-789.
- [21] Mizukami H, Ellis BE. Rosmarinic acid formation and differential expression of tyrosine aminotransferase isoforms in *Anchusa officinalis* cell suspension cultures. Plant Cell Rep, 1991, 10(6/7): 321-324.
- [22] Mizukami H, Ogawa T, Ohashi H, et al. Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. Plant Cell Rep, 1992, 11(9): 480-483.
- [23] Hahlbrock K, Schröder J. Specific effects on enzyme activities upon dilution of *Petroselinum hortense* cell cultures into water. Arch Biochem Biophys, 1975, 171(2): 500-506.
- [24] Bush DS. Calcium regulation in plant cells and its role in signaling. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1995, 46(1): 95-122.
- [25] Hetherington AM, Woodward FI. The role of stomata in sensing and driving environmental change. Nature, 2003, 424(6951): 901-908.



### 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

## 2012 工业生物技术发展报告



**作者:** 中国科学院生命科学与生物技术局

**ISBN:** 9787030356857

**定价:** 98

**开本:** 16 **装帧:** 平装 **页码:** 412

**初版时间:** 2012-10-1

**专业分类:** 生物技术

**读者对象:** 《2012 工业生物技术发展报告》可供相关科研院所、高等院校和企业等从事工业生物技术研究 and 开发工作的科研管理人员、科研工作者和研发生产人员借鉴与参考。

### 内容介绍

《2012 工业生物技术发展报告》是基于工业生物技术知识环境出版的信息产品之一, 主要报道了工业生物技术领域内的重大规划与政策、技术和产品的研发进展、产业发展等。为了能够全面了解工业生物技术发展的最新进展, 本书设置了发展战略篇、研发进展篇、产业篇和青年人才篇。在选题上, 着重突出了工业生物技术领域的热点和前沿。为了突出各领域的技术进展并使内容更有层次感, 本书在研发进展篇采用主题的形式组织稿件, 重点报道了合成生物学、工业微生物生理与代谢工程、生物炼制和生物发酵技术、工业蛋白质工程、生物过程工程、微藻生物能源等在工业生物技术领域中的研发进展等内容。为了扩大本报告的读者范围, 使国外读者能了解中国工业生物技术的现状、产业情况, 我们在形式上增加了英文题名、摘要, 以及英文作者简介。此外, 我们通过对 2011 年国内外工业生物技术领域重要事件的回顾, 与读者一起梳理过去一年本领域发展的整体脉络。