

# $\text{Ca}^{2+}$ 对水杨酸诱发的丹参幼苗丹酚酸 B 生物合成的影响

曹蓉蓉, 行冰玉, 党小琳, 姚雅琴, 刘连成, 董娟娥

西北农林科技大学生命科学院, 陕西 杨凌 712100

曹蓉蓉, 行冰玉, 党小琳, 等.  $\text{Ca}^{2+}$ 对水杨酸诱发的丹参幼苗丹酚酸 B 生物合成的影响. 生物工程学报, 2013, 29(12): 1836–1846.

Cao RR, Xing BY, Dang XL, et al. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  on salicylic-acid induced biosynthesis of salvianolic acid B in young seedlings of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. Chin J Biotech, 2013, 29(12): 1836–1846.

**摘要:** 为研究  $\text{Ca}^{2+}$ 在水杨酸诱导丹参幼苗丹酚酸 B 生物合成过程中的作用, 分别用激光共聚焦显微镜和高效液相色谱仪检测胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂 Vp 和  $\text{LaCl}_3$ , 胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂 LiCl 以及胞内钙调素拮抗剂 TFP 处理前、后水杨酸诱导丹参叶片保卫细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 荧光强度和丹酚酸 B 含量的变化。结果表明, 水杨酸 (SA) 处理后 6 min 即可诱发丹参幼苗叶片保卫细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 迸发, 持续时间为 2~3 min, 丹参幼苗丹酚酸 B 生物合成量亦显著增加, 且丹酚酸 B 合成量的增加发生在  $\text{Ca}^{2+}$ 迸发之后。胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂、胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂以及胞内钙调素拮抗剂均可抑制水杨酸诱导的  $\text{Ca}^{2+}$ 迸发和丹酚酸 B 的生物合成。结果表明水杨酸诱发的  $\text{Ca}^{2+}$ 对丹参幼苗丹酚酸 B 生物合成具有重要的调控作用。

**关键词:** 丹参, 水杨酸, 丹酚酸 B,  $\text{Ca}^{2+}$ , 信号转导

## Effects of $\text{Ca}^{2+}$ on salicylic-acid induced biosynthesis of salvianolic acid B in young seedlings of *Salvia miltiorrhiza* Bunge

Rongrong Cao, Bingyu Xing, Xiaolin Dang, Yaqin Yao, Liancheng Liu, and Juan'e Dong

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

**Abstract:** In order to study the effects of  $\text{Ca}^{2+}$  in the biosynthesis of salvianolic acid B (Sal B) induced by salicylic acid

**Received:** March 7, 2013; **Accepted:** April 26, 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: +86-29-87092262; 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。

网络出版时间: 2013-07-22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130722.1549.001.html>

(SA) in the young seedlings of *Salvia miltiorrhiza*, we used confocal laser scanning microscopy and high performance liquid chromatography to measure the change of relative fluorescence intensity of Ca<sup>2+</sup> and the contents of Sal B induced by SA before and after the application of extracellular calcium channel inhibitors (VP and LaCl<sub>3</sub>), intracellular calcium channel inhibitor (LiCl), as well as intracellular calmodulin antagonist (TFP). SA could induce the calcium burst, and the Ca<sup>2+</sup> peak could last to 2–3 min in the guard cells of *S. miltiorrhiza*, which prompted the biosynthesis of Sal B after the Ca<sup>2+</sup> burst. Both Vp or LaCl<sub>3</sub>, and LiCl or TFP could inhibit the burst of Ca<sup>2+</sup> and the biosynthesis of Sal B. The above results demonstrated that Ca<sup>2+</sup> from the extracellular and the intracellular calcium store regulate the biosynthesis of Sal B elicited by salicylic acid in *S. miltiorrhiza* young seedlings.

**Keywords:** *Salvia miltiorrhiza* Bunge, salicylic acid, salvianolic acid B, Ca<sup>2+</sup>, signal transduction

丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 是唇形科鼠尾草属的多年生药用植物, 主要药效成分为酚酸类和二萜醌类化合物。丹酚酸 B (Salvianolic acid B, Sal B) 是丹参中的酚酸类成分, 由于其生物活性强以及在丹参中的含量高而被认为是丹参酚酸类成分中最主要的活性物质之一<sup>[1]</sup>。Sal B 具有很强的抗氧化能力 (能够抑制脂质过氧化, 清除氧自由基), 对脑损伤及心肌缺血再灌注损伤具有保护作用, 还具有抗肿瘤和抗衰老作用<sup>[2]</sup>, 这使丹参在中医药中的作用越来越受到人们的重视。研究表明, 水杨酸可以促进丹参悬浮培养细胞中丹酚酸 B 的生物合成<sup>[3]</sup>, ABA 及其抑制剂也可以影响丹参毛状根中丹酚酸 B 的生物合成<sup>[4]</sup>。

水杨酸 (Salicylic acid, SA) 是植物产生过敏反应和系统获得性抗性所必需的激素, 可以调节植物的生长发育、种子萌发、果实形成和提高植物对抗外界不良环境胁迫的能力。SA 作为诱导子能够促进细胞培养物中次生代谢产物的合成及其相关合成酶基因的表达, 如 SA 可以有效诱导茜草培养细胞中蒽醌<sup>[5]</sup>、发根假丝酵母中萜萜烷类生物碱<sup>[6]</sup>、丹参培养细胞中丹酚酸 B<sup>[7]</sup>的生物合成, 乙酰水杨酸能够诱导玫瑰培养

细胞中产生吲哚生物碱<sup>[8]</sup>。

Ca<sup>2+</sup>是植物细胞响应多种刺激 (环境胁迫、激素、诱导子等) 反应的重要第二信使, 是植物响应刺激应答的中心调节子。Ca<sup>2+</sup>作为植物体内重要的第二信使, 信号的变化发生在生理反应之前<sup>[9]</sup>。Ca<sup>2+</sup>对植物次生代谢物质的积累也有非常重要的作用<sup>[10]</sup>, 如 SA 诱导的萝卜悬浮培养中几丁质酶增加的效应与胞外 Ca<sup>2+</sup>有关<sup>[11]</sup>, SA 能引起酵母细胞质游离 Ca<sup>2+</sup>升高, 增加的钙主要来自胞内钙库的释放<sup>[12]</sup>。Leon 等研究表明, 细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度升高来自于胞外 Ca<sup>2+</sup>的内流和胞内钙库中 Ca<sup>2+</sup>的释放, 胞内钙库中的 Ca<sup>2+</sup>发挥主要作用<sup>[13]</sup>。本课题组用外源 Ca<sup>2+</sup>处理丹参悬浮培养细胞, 发现不同浓度的外源 Ca<sup>2+</sup>对丹参酚酸类次生代谢物合成及其相关酶活性均产生了影响, 推测胞外 Ca<sup>2+</sup>内流可能参与了次生代谢物的生物合成<sup>[14]</sup>。但是在植株水平上, SA 作为诱导子是否可以提高丹参幼苗丹酚酸 B 的合成积累量, 以及 SA 诱导后细胞内、外的 Ca<sup>2+</sup>是否参与丹参幼苗丹酚酸 B 次生代谢物质的生物合成还有待研究。

本研究以丹参幼苗为材料, 用 SA 诱导, 并用胞内、外 Ca<sup>2+</sup>通道抑制剂/胞内钙调素拮抗剂

等药理学试剂处理,检测丹参保卫细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  相对荧光强度、叶片中丹酚酸 B 含量和关键酶活性的变化,探讨  $\text{Ca}^{2+}$  在水杨酸诱导丹参幼苗合成丹酚酸 B 过程中的作用,为揭示诱导子诱发的  $\text{Ca}^{2+}$  和次生代谢物质之间的关系提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 丹参幼苗培养

将新鲜的丹参种子(来源于陕西商洛丹参 GAP 药源基地)用自来水浸种 24 h,然后置于滤纸或双层纱布上,在 25 °C 的温室里培育待发芽。待种子发芽后移至营养钵中培养。培养基质为营养土(购自三力试剂公司),培养条件为光暗交替,光照 12 h/d,光照强度为 400  $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ ,每隔 1 d 用自来水浇灌。

### 1.2 水杨酸和药理学试剂处理

水杨酸诱导:待丹参幼苗长到 50 d(约 8~10 片叶片,不包括子叶)时,选取形态、长势、大小基本一致的幼苗,在叶面和叶背喷洒不同浓度的 SA (Sigma 公司)水溶液(以喷清水为对照),喷至叶片上药液欲滴为止。分别在喷洒 SA 后的不同时间(0、8、12、24、48 和 72 h)检测丹酚酸 B 含量,确定 SA 适宜的诱导时间和诱导浓度。

药理学试剂处理:在水杨酸诱导前 60 min 喷施药理学试剂。分别喷施不同浓度的质膜钙通道抑制剂 Verapamil (Vp, 异搏定, Sigma 公司)、 $\text{LaCl}_3$  (上海山浦集团)、胞内钙调素拮抗剂 Trifluoperazine (TFP, Sigma 公司)、胞内钙通道抑制剂 LiCl (Sigma 公司)以及抑制剂/拮抗剂的组合 Vp+ $\text{LaCl}_3$ 、TFP+LiCl,筛选出适宜的  $\text{Ca}^{2+}$

通道抑制剂/拮抗剂浓度。根据前期试验筛选, Vp 的处理浓度 250  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,  $\text{LaCl}_3$  处理浓度为 4 mmol/L, TFP 处理浓度为 200  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , LiCl 处理浓度为 4 mmol/L。

### 1.3 丹酚酸 B 的提取和含量检测

丹酚酸 B 的提取及含量检测按照文献的方法<sup>[15]</sup>。

样品提取:收获不同处理的丹参幼苗叶片,在 47 °C 真空干燥至恒重。将干燥的叶片研磨成粉末,称取 0.01 g 左右置具塞试管中,用 70:30 (V/V) 的甲醇-水溶液在超声波提取器中提取 45 min。提取液在 8 000 r/min 下离心 10 min,上清液用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤后待检测。

含量检测:采用高效液相色谱法 (HPLC)。色谱条件为:色谱柱, shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mm i.d. 5  $\mu\text{m}$ );流动相,乙腈:水:磷酸(体积比 25:75:0.1);流速, 1 mL/min;进样量, 10  $\mu\text{L}$ ;检测波长, 285 nm;柱温, 25 °C。

### 1.4 $\text{Ca}^{2+}$ 相对荧光强度的检测

#### 1.4.1 Fluo-3/AM 探针的装载

用 DMSO 配制 FLUO-3/AM 母液 1 mmol/L,用 10 mmol/L 的 HEPES 缓冲液 (Sigma 公司) 稀释母液到 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ,撕取丹参幼苗最上一对完全展开叶的下表皮放入 20  $\mu\text{mol}/\text{L}$  的染料中,在 4 °C 避光孵育 2 h,取出后用 HEPES 洗 2 次。于室温下再避光放置 2 h,在激光共聚焦显微镜 (Nikon A1R) 下观察。

#### 1.4.2 激光共聚焦显微镜观察

将冲洗好的丹参叶片表皮条置载玻片上,盖上两块盖片,盖片之间留有缝隙(从此缝隙轻

轻加入外源物,以保持表皮条不动),用波长 488 nm 的激光对叶片进行断层扫描,激光共聚焦显微镜观察保卫细胞中 Ca<sup>2+</sup>荧光在不同层面上的分布,选取一个层面作为检测对象。然后给载玻片加入 2 mmol/L 的 SA,用 Timecourse 软件记录 Ca<sup>2+</sup>荧光强度随时间变化情况。在 40×物镜下采集图像,Zoom 为 1.00×,每 30 s 扫描一次并记录一张照片,共扫描 15 min。参数为: Laser Wavelength, 488.0; Laser Power, 20.4; PMT HV, 138; PMT Offset, 0。

#### 1.4.3 Ca<sup>2+</sup>抑制剂/拮抗剂、水杨酸处理后荧光观察

FLUO-3/AM 标记完成后,于室温下放置 1 h,用抑制剂/拮抗剂处理,室温放置 1 h后,再用 SA 处理,用 CLSM 观察 Ca<sup>2+</sup>荧光强度。

#### 1.5 数据分析

采用 SPSS 软件进行相关性分析和显著性检验,用 Photoshop 软件编辑图片,Graphpad

软件进行误差分析。实验为单因素完全随机设计。每次实验均重复 3 次。

## 2 结果与分析

### 2.1 SA 对丹参幼苗丹酚酸 B 生物合成的影响

分别用 0.5、2.0、4.0 mmol/L 的 SA 处理丹参幼苗,检测丹参叶片丹酚酸 B 合成积累量,考察 SA 适宜的诱导浓度和诱导时间。结果如图 1 所示,在 SA 处理前,对照组丹酚酸 B 的含量为 (26.66±2.27) mg/g。SA 处理后 8 h 丹酚酸 B 含量开始上升,24 h 达到最高值,之后逐渐下降。

在 SA 处理的整个时期,丹酚酸 B 含量均高于对照组,说明 0.5~4 mmol/L 的 SA 均可促进丹参幼苗丹酚酸 B 的合成。2 mmol/L 的 SA 在处理 24 h 丹酚酸 B 含量达到 (66.04±3.52) mg/g,是对照的 1.97 倍,也显著高于其他处理组。说明丹酚酸 B 的生物合成对 SA 的响应具有浓度差异性。2.0 mmol/L 的 SA 可在

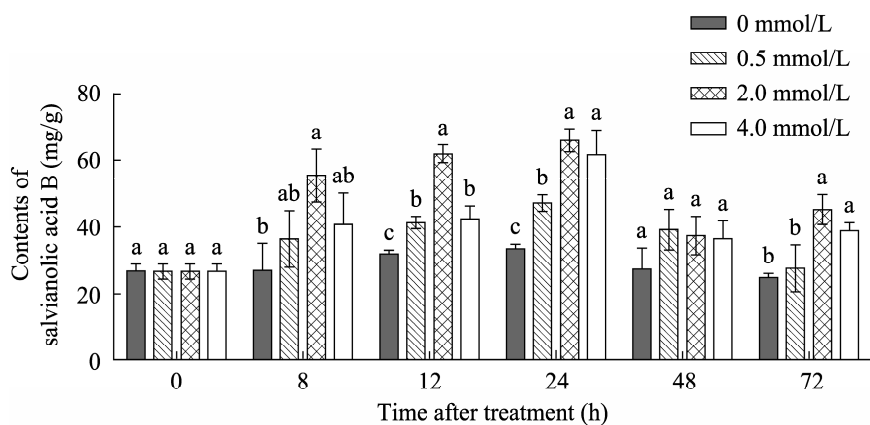


图 1 水杨酸处理对丹参幼苗丹酚酸 B 积累量的影响 (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)

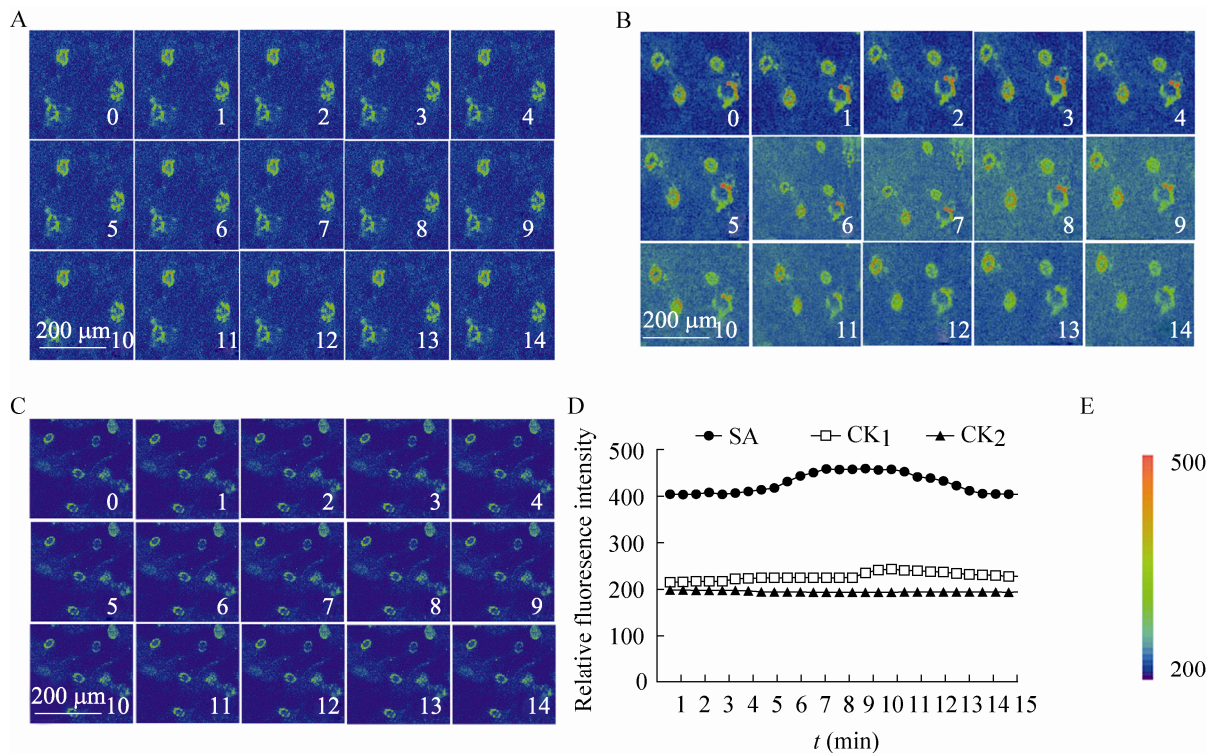
Fig. 1 Effects of SA on the accumulation of Sal B in the leaves of *S. miltiorrhiza*. Different lowercases on the histograms with the different pattern indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ).

较短的时间内诱导丹参幼苗合成较多的丹酚酸 B, 且对幼苗生长没有造成伤害 (数据未显示)。因此, 在后续的试验中均以 2.0 mmol/L 的 SA 作为诱导子。

## 2.2 SA 处理对丹参保卫细胞中 $\text{Ca}^{2+}$ 相对荧光强度的影响

分别以未用 SA 处理的装载/不装载  $\text{Ca}^{2+}$  探针的材料作为对照, 观察 SA 诱导后丹参叶片保卫细胞相对荧光强度的变化。每个处理每次观察 8~10 个保卫细胞的荧光强度, 结果见图 2。

未装载探针的丹参保卫细胞有微弱的自发荧光 (图 2C)。装载  $\text{Ca}^{2+}$  探针低温孵育 2 h 但未施加 SA 的保卫细胞里有明亮的绿色荧光 (图 2A)。从 0~14 min,  $\text{CK}_1$  和  $\text{CK}_2$  的保卫细胞中持续为绿色荧光, 而且强度几乎不变。2.0 mmol/L 的 SA 处理后, 保卫细胞内的荧光显著增强 (图 2B)。SA 处理后的 0~5 min, 保卫细胞内的红色荧光从微弱到红色逐渐增强; 处理后的 6~9 min, 维持较强的红色荧光; 处理后 10 min, 红色荧光开始逐渐变弱, 到 14 min 后几乎消失。



**图 2** SA 处理对丹参叶片保卫细胞中  $\text{Ca}^{2+}$  相对荧光强度的影响 (A:  $\text{CK}_1$  (Fluo-3/AM 处理); B: SA 处理; C:  $\text{CK}_2$  (无染料处理); D: SA、 $\text{CK}_1$  和  $\text{CK}_2$  处理后的荧光强度变化; E: 所采用伪彩的色阶标尺。深紫色代表荧光强度的最小值 200, 红色代表最大值 500。图片 A、B、C 右下角数字表示 SA 的处理时间 (min))

Fig. 2 Effects of SA on the relative fluorescence intensity of  $\text{Ca}^{2+}$  in the guard cell of *S. miltiorrhiza*. (A)  $\text{CK}_1$  (Fluo-3/AM treatment). (B) SA treatment. (C)  $\text{CK}_2$  (No Fluo-3/AM). (D) The detail intensity of SA,  $\text{CK}_1$  and  $\text{CK}_2$ . (E) Color bar. Dark purple is minimum (200) and red is maximum intensity (500). Number given in the lower right of each graph (0–14) is the time after SA treatment (min).

从荧光强度的数据来看 (图 2D),  $\text{CK}_1$  和  $\text{CK}_2$  的相对荧光强度随着时间的延长变化微弱,  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度均保持在 200 左右。SA 处理后的 6~7 min, 丹参保卫细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的荧光强度明显升高 (相对荧光强度为 400 左右); 处理后的 8.68 min,  $\text{Ca}^{2+}$  相对荧光强度达到最大值 (459.36), 随后逐渐下降到 SA 开始处理时的相对荧光强度 (404)。说明在受到外界 SA 刺激后, 丹参保卫细胞内的  $\text{Ca}^{2+}$  会在短时间内迸发, 维持一段 (较短) 时间后恢复。

### 2.3 $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂/钙调素拮抗剂处理对 SA 诱导的 $\text{Ca}^{2+}$ 相对荧光强度的影响

分别施加胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂 Vp、 $\text{LaCl}_3$ 、胞内钙调素拮抗剂 TFP、胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂 LiCl 以及抑制剂组合 Vp+TFP、 $\text{LaCl}_3$ +LiCl 后, 观察 SA 诱导的  $\text{Ca}^{2+}$ 相对荧光强度的变化。抑制剂/拮抗剂均可明显抑制 SA 诱导的  $\text{Ca}^{2+}$ 相对荧光强度 (图 3)。SA 诱导后, 保卫细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 相对荧光强度显著上升, 用胞内、外抑制剂/拮抗剂单独处理或者与 SA 共处理后保卫细胞的相对荧光强度均低于单独用 SA 处理的荧光强度, 说明胞内、外抑制剂/拮抗剂均抑制了 SA 诱发的  $\text{Ca}^{2+}$ 迸发, 丹参细胞内、外的  $\text{Ca}^{2+}$ 均参与了 SA 诱导的钙动员。

### 2.4 $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂/钙调素拮抗剂处理对 SA 诱导的丹酚酸 B 生物合成的影响

先用筛选的适宜浓度的胞内、外  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂/钙调素拮抗剂处理丹参幼苗叶片 1 h 后, 再用适宜浓度的 SA 处理, 考察抑制剂/拮抗剂处理后丹参幼苗叶片中丹酚酸 B 的生物合成量, 结果见图 4。SA 诱导丹参幼苗叶片后, 丹酚酸 B 含量从  $(12.81\pm 0.86)$  mg/g 提高到

$(22.78\pm 3.46)$  mg/g, 是对照的 1.78 倍 ( $P < 0.05$ )。抑制剂/拮抗剂与 SA 共同处理组丹酚酸 B 的含量均低于 SA 处理组, 而高于抑制剂/拮抗剂处理组。胞内、外  $\text{Ca}^{2+}$ 通道抑制剂/钙调素拮抗剂及其组合均对丹参叶片中丹酚酸 B 的合成积累产生了显著的抑制作用。

SA+Vp 处理导致丹参叶片中丹酚酸 B 含量降低为 SA 处理组的 29.53%; SA+ $\text{LaCl}_3$  处理后, 丹酚酸 B 含量降低为 SA 处理组的 36.90%; SA+TFP 处理后, 含量降低为 SA 处理组的 34.62%; SA+LiCl 处理后, 含量降低为 SA 处理组的 25.26%; SA 和两种抑制剂/拮抗剂联合处理后, 丹酚酸 B 含量分别降低为 SA 组的 15.91% 和 30.14% ( $P < 0.05$ )。

## 3 讨论

钙是植物体内一种重要的第二信使<sup>[16]</sup>, 主要介导许多刺激因子 (包括诱导子) 所引发的细胞信号转导进程<sup>[17]</sup>。它通过把外源信号转变为胞内信号, 启动一系列胞内生理生化反应, 发挥信号传递和放大的作用。这一信使功能是通过调控细胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 来实现的。在正常情况下,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度一般维持在一定数量级的范围内, 但在外界环境发生变化或有外界刺激时,  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度会立即发生变化。研究发现, 用诱导子处理欧芹细胞后, 2 min 内可出现  $\text{Ca}^{2+}$ 内流增加<sup>[18]</sup>。水杨酸也可引发烟草悬浮细胞培养液  $\text{Ca}^{2+}$ 瞬时增加, 且增加的  $\text{Ca}^{2+}$ 来源于外源钙<sup>[19]</sup>。诱导子促进长春花悬浮细胞内吲哚生物碱的合成与  $\text{Ca}^{2+}$ 的流入有极大的关系<sup>[20]</sup>。胞内钙库  $\text{Ca}^{2+}$ 释放参与了壳聚糖诱导茜草细胞合成蒽醌的信号转导过程<sup>[21]</sup>。番茄保卫细胞遇到外力、ABA 或者是低温时,

胞内和胞外  $\text{Ca}^{2+}$  共同参与  $\text{Ca}^{2+}$  的信号转导<sup>[22]</sup>。用  $\text{Ca}^{2+}$  抑制剂或拮抗剂处理,  $\text{Ca}^{2+}$  浓度就会下降。如水杨酸处理引起植物胞质  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增加, 胞外  $\text{Ca}^{2+}$  螯合剂 EGTA、质膜  $\text{Ca}^{2+}$  通道抑制剂 nifedipine 和  $\text{LaCl}_3$  均可减弱水杨酸的诱导效

应<sup>[23]</sup>,  $\text{LiCl}$ 、Vp、nifedipine 和 TEA 等会减少生长素诱导的小麦叶片原生质体中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度<sup>[24]</sup>。本实验中, SA 诱导促使丹参保卫细胞  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度增强 (钙浓度升高),  $\text{Ca}^{2+}$  迸发持续 2~3 min,  $\text{Ca}^{2+}$  抑制剂/拮抗剂抑制了水杨酸诱导

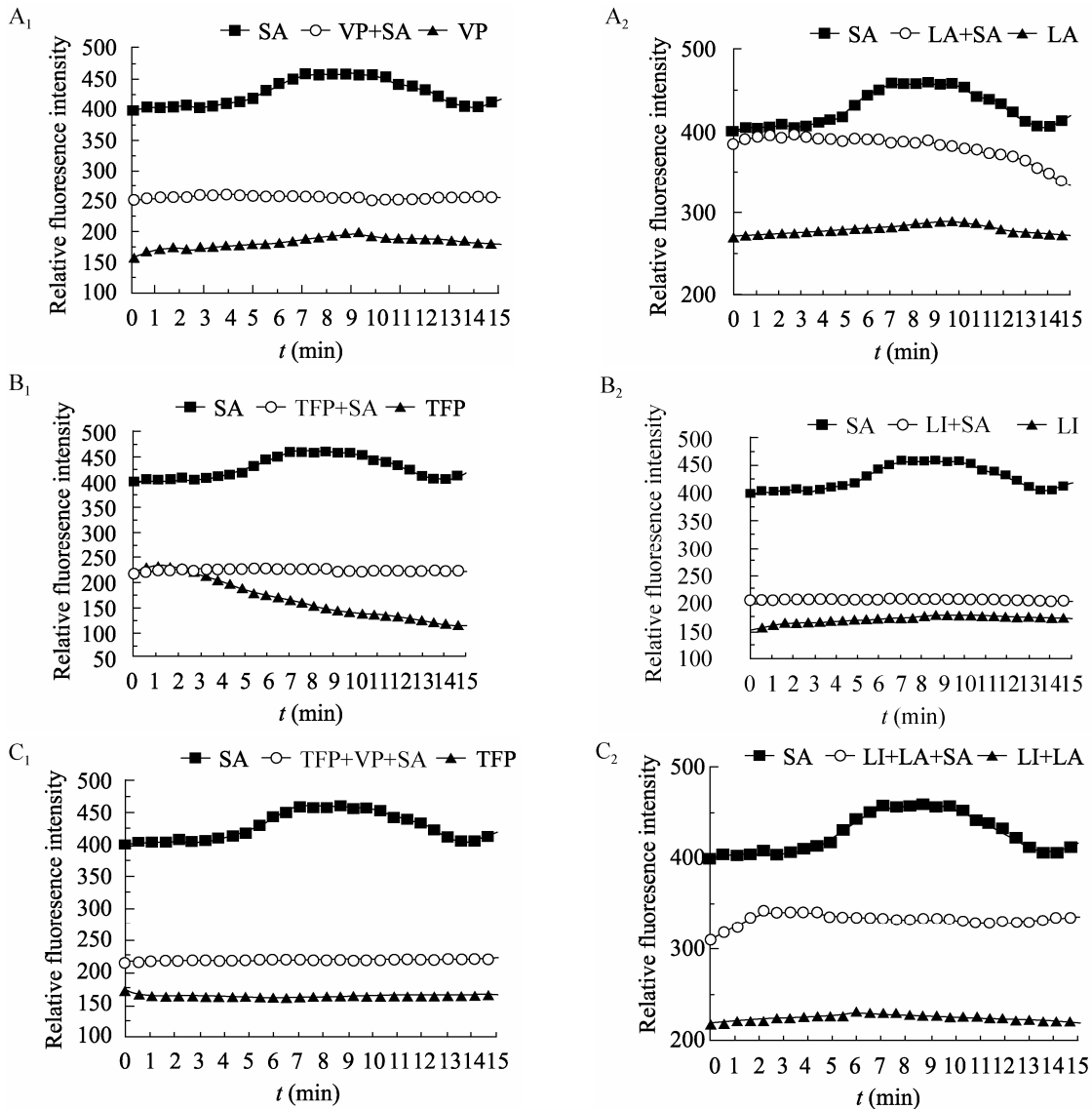


图 3  $\text{Ca}^{2+}$  通道抑制剂/钙调素拮抗剂处理对水杨酸诱导的  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度的影响 (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>: 胞外  $\text{Ca}^{2+}$  通道抑制剂处理; B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>: 胞内通道抑制剂/钙调素拮抗剂处理; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>: 胞外抑制剂与胞内抑制剂/钙调素拮抗剂联合处理)  
Fig. 3 Changes of relative fluorescence intensity of  $\text{Ca}^{2+}$  in *S. miltiorrhiza* guard cell in response to calcium channel inhibitors/calmodulin antagonist. (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>) Extracellular calcium channel inhibitors Vp and  $\text{LaCl}_3$  treatment. (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>) Intracellular calmodulin antagonist TFP treatment/Intracellular calcium channel inhibitors  $\text{LiCl}$ . (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>) Extracellular calcium channel inhibitors + intracellular calcium channel inhibitors/intracellular calmodulin antagonist treatment.

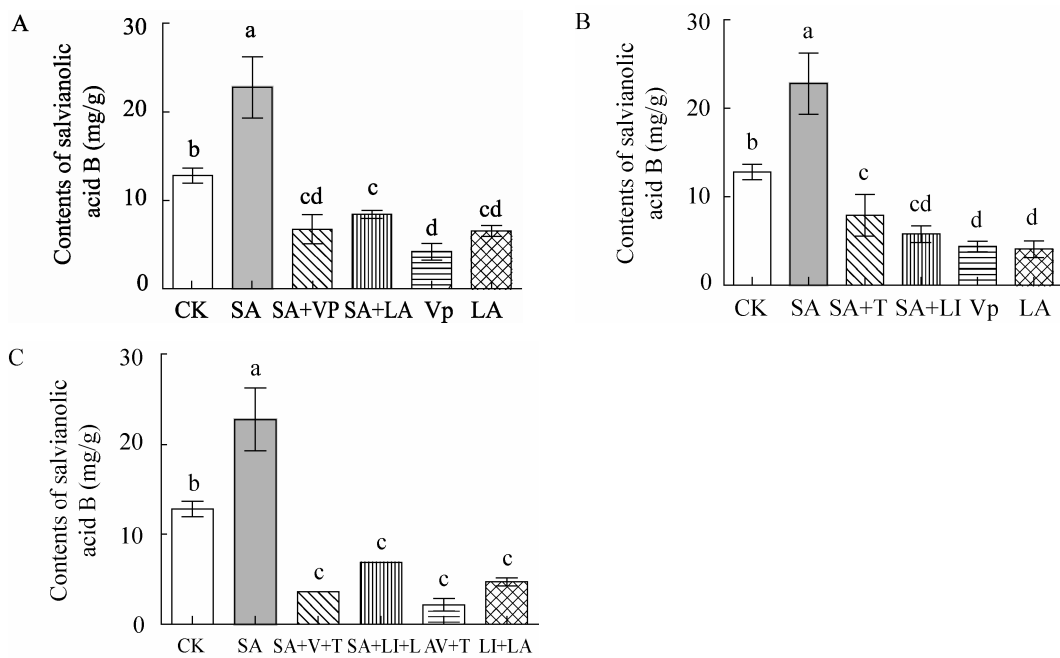


图 4  $\text{Ca}^{2+}$ 抑制剂/钙调素拮抗剂处理对 SA 诱导丹酚酸 B 生物合成的影响 (A: 胞外  $\text{Ca}^{2+}$ 抑制剂的作用; B: 胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 抑制剂/钙调素拮抗剂的作用; C: 胞外、胞内联合作用) (图中不同的字母表示在 5% 水平差异显著)

Fig. 4 Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  channel inhibitors and intracellular calmodulin antagonist on the accumulation of Sal B in *S. miltiorrhiza*. (A) Effects of extracellular calcium channel inhibitors. (B) Effects of intracellular calcium channel inhibitors/intracellular calmodulin antagonist. (C) Effects of extracellular calcium channel inhibitors + intracellular calcium channel inhibitors/intracellular calmodulin antagonist. Different lowercases on the histographs with the different pattern indicate the significant differences ( $P < 0.05$ ).

的  $\text{Ca}^{2+}$  迸发。说明抑制剂/拮抗剂可以通过控制  $\text{Ca}^{2+}$  通道或者是钙调蛋白抑制胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的增加。这与系统素引发的番茄叶肉细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  动员<sup>[25]</sup>和水杨酸诱导蚕豆气孔运动<sup>[23]</sup>的研究结果一致。

水杨酸作为诱导子被广泛应用于多种药用植物以提高次生代谢物的合成积累量。如水杨酸显著提高了东莨菪中托品生物碱含量<sup>[26]</sup>、红豆杉中紫杉烷和紫杉醇含量<sup>[27-28]</sup>、肉苁蓉中苯乙醇苷合成量<sup>[29]</sup>、丹参细胞培养物中丹酚酸 B 含量<sup>[7]</sup>。本研究利用水杨酸处理丹参幼苗后发现, 3 种浓度的水杨酸均可促进丹酚酸 B 的积

累, 而且丹酚酸 B 积累量在处理 24 h 达到峰值。这与外源茉莉酸甲酯诱导后丹参毛状根中酚酸类化合物的研究结果类似<sup>[30]</sup>。然而本实验室前期对水杨酸诱导丹参培养细胞中迷迭香酸积累的结果表明, 水杨酸处理后迷迭香酸合成的峰值出现在诱导后的 8 h<sup>[15]</sup>, 说明丹参叶片和悬浮培养细胞对水杨酸诱导子的响应有较大的差异, 培养细胞对水杨酸的响应明显快于叶片。

用  $\text{Ca}^{2+}$  抑制剂/钙调素拮抗剂处理会使植物次生代谢物的含量下降。如在长春花悬浮培养细胞合成吲哚生物碱时添加异搏定明显降低了



培养细胞中吲哚生物碱的含量<sup>[31]</sup>。LaCl<sub>3</sub> 是质膜 Ca<sup>2+</sup>通道的一种无机类抑制剂,能通过阻止 Ca<sup>2+</sup>的跨膜流动而使其不能发挥信使作用,从而有效抑制诱导子诱导的植物细胞或组织的防御反应<sup>[31]</sup>。钙调素拮抗剂 TFP 在有 Ca<sup>2+</sup>参与的情况下能抑制 CaM 依赖的调节功能,导致靶酶不能被激活,次生代谢物质无法形成<sup>[32]</sup>。LiCl 作为 IP<sub>3</sub> 受体的抑制剂,通过抑制 IP<sub>3</sub> 门控的 Ca<sup>2+</sup>通道来阻止钙库中 Ca<sup>2+</sup>的释放<sup>[33]</sup>。这些抑制剂/拮抗剂均可阻断胞质中 Ca<sup>2+</sup>浓度的升高,并对植物次生代谢物质的积累产生影响。本研究利用 Ca<sup>2+</sup>抑制剂/钙调素拮抗剂处理后均使丹酚酸 B 的合成积累量显著低于对照组和 SA 诱导组,抑制率可高达 70%~80%。表明抑制剂/拮抗剂不仅抑制了水杨酸的诱导效应,也抑制了正常幼苗合成丹酚酸 B。说明水杨酸诱发的胞内、胞外 Ca<sup>2+</sup>均参与了丹参幼苗合成丹酚酸 B 的信号转导。推测诱导子、Ca<sup>2+</sup>和次生代谢物质之间存在如下关系:水杨酸诱导植物细胞质膜或者液泡膜上的 Ca<sup>2+</sup>通道打开,胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度升高, Ca<sup>2+</sup>作为第二信使通过信号级联放大,促使细胞核编码相关蛋白表达,从而合成次生代谢物质。这一推测还需要进一步的研究验证。

## 4 结论

水杨酸可以诱导丹参幼苗叶片 Ca<sup>2+</sup>迸发和丹酚酸 B 合成积累量增加,胞外 Ca<sup>2+</sup>通道抑制剂异搏定、LaCl<sub>3</sub>,胞内钙调素拮抗剂 TFP、Ca<sup>2+</sup>通道抑制剂 LiCl 均可抑制水杨酸诱导的丹参 Ca<sup>2+</sup>荧光增强和丹酚酸 B 生物合成积累量增加,说明水杨酸诱导的 Ca<sup>2+</sup>迸发对丹参细胞中的丹酚酸 B 生物合成起重要的调节作用。调节丹酚

酸 B 生物合成的钙信号既包括胞外 Ca<sup>2+</sup>的内流,也包括胞内钙库中 Ca<sup>2+</sup>的释放。

## REFERENCES

- [1] Wang FM, Li L, Liu XP, et al. Extraction of salvanolic acid B from danshen (*Salvia miltiorrhiza* Bge.) and determination by HPLC method. Res Pract Chin Med, 2004, 18(1): 62-64 (in Chinese).  
王凤美, 李磊, 柳先平, 等. 丹参药材中丹酚酸 B 的提取及其 HPLC 法测定. 现代中药研究与实践, 2004, 18(1): 62-64.
- [2] Kwak W, Han C, Kim H, et al. Process of extracting and purifying biologically effective ingredients from combined medicinal plants and their extract composition: US, 5910307. 1999-06-08.
- [3] Chen HY, Liu LC, Dong JE, et al. Hydrogen peroxide involves in the signal transduction of salicylic acid-induced salvanolic 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.
- [4] Cui BM, Liang ZS, Liu Y, et al. Effects of ABA and its biosynthetic inhibitor fluridone on accumulation of phenolic acids and activity of PAL and TAT in hairy root of *Salvia miltiorrhiza*. China J Chin Mater Med, 2012, 37(6): 754-759 (in Chinese).  
崔北米, 梁宗锁, 刘岩, 等. ABA 及其生物合成抑制剂对丹参毛状根酚酸类成分和关键酶的影响. 中国中药杂志, 2012, 37(6): 754-759.
- [5] Bulgakov V, Tchernoded G, Mischenko N, et al. Effect of salicylic acid, methyl jasmonate, ethephon and cantharidin on anthraquinone

- production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with the *rolB* and *rolC* genes. *J Biotechnol*, 2002, 97(3): 213–221.
- [6] Pitta–Alvarez S, Spollansky TC, Giuliotti AM. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb Technol*, 2000, 26(2): 252–258.
- [7] Dong JE, 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): 99–104.
- [8] Zhao J, Zhu WH, Hu Q, et al. Improved alkaloid production in *Catharanthus roseus* suspension cell cultures by various chemicals. *Biotechnol Lett*, 2000, 22(15): 1221–1226.
- [9] Poovaiah B, Reddy A, Feldman DL. Calcium and signal transduction in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 1993, 12(3): 185–211.
- [10] Stäb MR, Ebel J. Effects of Ca<sup>2+</sup> on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 257(2): 416–423.
- [11] Schneider–Müller S, Kurosaki F, Nishi A. Role of salicylic acid and intracellular Ca<sup>2+</sup> in the induction of chitinase activity in carrot suspension culture. *Physiol Mol Plant P*, 1994, 45(2): 101–109.
- [12] Mori IC, Iida H, Tsuji FI, et al. Salicylic acid induces a cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation in yeast. *BBB*, 1998, 62(5): 986–989.
- [13] Leon J, Rojo E, Titarenko E, et al. Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca<sup>2+</sup> calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *MGG*, 1998, 258(4): 412–419.
- [14] Liu LC, Dong JE, Zhang JY, et al. Effect of calcium on synthesis of rosmarinic acid and related enzymes in the suspension culture of *Salvia miltiorrhiza*. *Chin J Biotech*, 2012, 28(11): 1359–1369 (in Chinese).
- 刘连成, 董娟娥, 张婧一, 等. Ca<sup>2+</sup>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.
- [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 (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.
- [16] Sarwat M, Ahmad P, Nabi G, et al. Ca<sup>2+</sup> signals: The versatile decoders of environmental cues. *Crit Rev Biotechnol*, 2013, 33(1): 97–109.
- [17] Gan Q, Jia B, Liu X, et al. Studies on calcium release and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> level produced by the elicitor induced plant cell by fluorescence probing. *J Fluoresc*, 2012, 22(2): 573–581.
- [18] Hahlbrock K, Scheel D, Logemann E, et al. Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(10): 4150–4157.
- [19] Kawano T, Sahashi N, Takahashi K, et al. Salicylic acid induces extracellular superoxide generation followed by an increase in cytosolic calcium ion in tobacco suspension culture: the earliest events in salicylic acid signal transduction. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(7): 721–730.
- [20] Zhao J, Hu Q, Guo YQ, et al. Elicitor-induced indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* cell cultures is related to Ca<sup>2+</sup> influx and the oxidative burst. *Plant Sci*, 2001, 161(3): 423–431.
- [21] Vasconsuelo A, Morelli S, Picotto G, et al. Intracellular calcium mobilization: a key step for

- chitosan-induced anthraquinone production in *Rubia tinctorum* L. *Plant Sci*, 2005, 169(4): 712–720.
- [22] Wood NT, Allan AC, Haley A, et al. The characterization of differential calcium signalling in tobacco guard cells. *Plant J*, 2001, 24(3): 335–344.
- [23] Liu X, Meng FX, Zhang SQ, et al.  $\text{Ca}^{2+}$  is involved in the signal transduction during stomatal movement in *Vicia faba* L. induced by salicylic acid. *J Plant Physiol B*, 2003, 29(1): 59–64 (in Chinese).  
刘新, 孟繁霞, 张蜀秋, 等.  $\text{Ca}^{2+}$ 参与水杨酸诱导蚕豆气孔运动时的信号转导. *植物生理与分子生物学学报*, 2003, 29(1): 59–64.
- [24] Shishova M, Lindberg S. Auxin induces an increase of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts. *J Plant Physiol*, 2004, 161(8): 937–945.
- [25] Moyon C, Jones J, Knight M, et al. Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells:  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environ*, 2002, 21(11): 1101–1111.
- [26] Kang SM, Jung HY, Kang YM, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on the production of tropane alkaloids and the expression of PMT and  $\text{H}_6\text{H}$  in adventitious root cultures of *Scopolia parrviflora*. *Plant Sci*, 2004, 166(3): 745–751.
- [27] Li WY, Gao W, Zhao J, et al. Induction studies of methyl jasmonate and salicylic acid on taxane production in suspension cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Biochem Eng J*, 2004, 19(3): 259–265.
- [28] Miao ZQ, Wei ZJ, Yuan YJ. Study on the effects of salicylic acid on taxol biosynthesis. *Chin J Biotech*, 2000, 16(4): 509–513 (in Chinese).  
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.
- [29] Xu LS, Xue XF, Fu CX, et al. Effects of methyl jasmonate and salicylic acid on phenylethanoid glycosides synthesis in suspension cultures of *Cistanche deserticola*. *Chin J Biotech*, 2005, 21(3): 402–406 (in Chinese).  
徐亮胜, 薛晓锋, 付春祥, 等. 茉莉酸甲酯与水杨酸对肉苁蓉悬浮细胞中苯乙醇甙合成的影响. *生物工程学报*, 2005, 21(3): 402–406.
- [30] Li WY, Gao W, Zhao J, et al. Research of mechanism of secondary metabolites of phenolic acids in hairy root induced by jasmonate. *China J Chin Mater Med*, 2012, 37(1): 13–16 (in Chinese).  
李文渊, 高伟, 赵静, 等. 基于茉莉酸甲酯诱导的丹参毛状根酚酸类成分次生代谢机制研究. *中国中药杂志*, 2012, 37(1): 13–16.
- [31] Moreno-Valenzuela OA, Minero-Garcia Y, Chan W, et al. Increase in the indole alkaloid production and its excretion into the culture medium by calcium antagonists in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(16): 1345–1349.
- [32] Yang GZ. Study of calmodulin antagonist in plant. *J Dali Med Coll*, 1998, 7(1): 46–52 (in Chinese).  
杨桂芝. 植物中钙调蛋白拮抗剂的研究. *大理医学院学报*, 1998, 7(1): 46–52.
- [33] Manzoor H, Chiltz A, Madani S, et al. Calcium signatures and signaling in cytosol and organelles of tobacco cells induced by plant defense elicitors. *Cell Calcium*, 2012, 51(6): 434–444.

(本文责编 郝丽芳)