

# 水杨酸诱发的 NO 介导了丹参悬浮培养细胞中丹酚酸 B 的生物合成

张婧一, 陈红艳, 张洪培, 朱楠, 董娟娥\*

(西北农林科技大学生命科学学院, 陕西杨凌 712100)

**摘要:** 水杨酸(SA)可诱导丹参悬浮培养细胞中一氧化氮(NO)产生、苯丙氨酸解氨酶(PAL)活化及丹酚酸B(Sal B)的生物合成。为了阐明NO对丹参悬浮培养细胞中Sal B生物合成的影响及作用机理,本实验利用NO供体硝普钠(SNP)、NO合成酶抑制剂L-NNA( $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine)、NO淬灭剂cPITO(carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)以及PAL抑制剂L-AOPP(L-2-aminoxy-3-phenyl acrylic acid)分别处理丹参悬浮培养细胞,并对其胞内NO水平、PAL活性和Sal B积累量进行了检测。结果表明,硝普钠(SNP)处理显著促进了NO产生、PAL活性和Sal B的积累,而L-NNA和cPITO抑制上述过程,说明NO诱发PAL活性提高并参与了SA诱导的Sal B生物合成;L-AOPP显著抑制了PAL活性及Sal B积累,却对NO产生没有显著影响,揭示NO位于PAL的上游。这说明SA诱发的NO产生、PAL活化及Sal B合成之间存在因果关系,即NO通过激活PAL触发Sal B生物合成。

**关键词:** 一氧化氮(NO); 苯丙氨酸解氨酶; 水杨酸; 丹参; 丹酚酸B; 信号转导

中图分类号: Q945.78 文献标识码: A 文章编号: 2095-0837(2015)01-0081-09

## Nitric Oxide Triggered by Salicylic Acid Mediates the Biosynthesis of Salvanolic Acid B in *Salvia miltiorrhiza* Suspension Cell Culture

ZHANG Jing-Yi, CHEN Hong-Yan, ZHANG Hong-Pei, ZHU Nan, DONG Juan-E\*

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

**Abstract:** Salicylic acid (SA) induced nitric oxide (NO) generation, Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activation, and salvanolic acid B (Sal B) biosynthesis. To determine the role of NO in SA-induced Sal B biosynthesis, the effects of NO donor sodium nitroprusside (SNP), NO synthase inhibitor L-NNA ( $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine), NO scavenger carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPITO), and PAL inhibitor L-AOPP (L-2-aminoxy-3-phenyl acrylic acid) on SA-induced NO generation, PAL activation, and Sal B accumulation were studied individually. Pretreatment of the cells with SNP increased SA-induced NO generation, PAL activation and Sal B accumulation, which suggested that NO activated PAL and was involved in SA-induced Sal B biosynthesis. L-AOPP suppressed PAL activity and Sal B accumulation, but did not affect SA-induced NO generation, indicating that NO acted as an upstream signal of PAL. Results indicated that there was a causal relationship between SA-induced NO generation, PAL activation, and Sal B biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* suspension cell culture. Via activation of PAL, NO mediated the SA-induced Sal B biosynthesis.

收稿日期: 2014-06-11, 退修日期: 2014-07-08。

基金项目: 国家自然科学基金(31170274); 西北农林科技大学青年骨干支持计划资助。

作者简介: 张婧一(1983-), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物学(E-mail: Amber--zhang@hotmail.com)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: dzsys@nwafu.edu.cn)。

**Key words:** Nitric oxide (NO); Phenylalanine ammonia-lyase (PAL); Salicylic acid (SA); *Salvia miltiorrhiza*; Salvianolic acid B (Sal B); Signal transduction

20世纪90年代, Delledonne等提出一氧化氮(nitric oxide, NO)作为信号分子参与了拟南芥病原菌诱导的植物获得性免疫产生<sup>[1]</sup>。此后, 关于NO介导植物生长、发育及抗逆等过程的报道日益增多。NO可抑制种子休眠, 促进种子萌发<sup>[2]</sup>, 促进植物根生长<sup>[3]</sup>、延缓开花过程<sup>[4]</sup>及调节植物细胞程序性死亡<sup>[5]</sup>等, 参与了植物从生长到衰亡的全过程。NO也广泛参与植物抗逆反应, 如通过控制气孔开闭抵御干旱胁迫<sup>[6]</sup>, 降低ROS(reactive oxygen species)水平抵御重金属胁迫<sup>[7]</sup>, 作为钙调素3(CaM 3)上游信号抵御高温胁迫<sup>[8]</sup>, 介导酚类物质合成抵御真菌侵染<sup>[9]</sup>, 提高蛋白激酶抑制因子的生物合成抵御伤害胁迫<sup>[10]</sup>, 促进查尔酮合酶(chalcone synthase)基因表达抵御UV-B(ultraviolet-B)胁迫等<sup>[11]</sup>。

NO还可通过介导其它信号分子、合成酶及蛋白激酶的产生而发挥信号转导作用, 如在病原菌诱导的苍术(*Atractylodes lancea*)植株中, NO作为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的上游信号介导了挥发油的合成<sup>[12]</sup>; 在连翘(*Hypericum perforatum*)的悬浮培养细胞中, NO促进了茉莉酸(jasmonic acid, JA)含量增加<sup>[13]</sup>; 在大戟(*Euphorbia pekinensis*)悬浮培养细胞中, 真菌诱导的NO是内源SA(salicylic acid)合成的上游信号<sup>[14]</sup>; 在烟草叶片中, NO通过激活环磷酸尿苷(cGMP)和环ADP核糖(cADPR)促进了胞内Ca<sup>2+</sup>通道的打开<sup>[15]</sup>。在红豆杉培养细胞<sup>[16]</sup>、银杏培养细胞<sup>[17]</sup>及马铃薯叶片<sup>[18]</sup>中, NO促进了苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)活性升高。从产生机制来看, 生物或非生物诱导因素均可促进植物细胞NO水平的增加, 如脱落酸、茉莉酸甲酯可促进保卫细胞中NO的合成<sup>[19,20]</sup>; 寡半乳糖醛酸(oligogalacturonides, OGs)介导了拟南芥防御应答中NO的产生<sup>[21]</sup>; 多胺诱导的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和NO共同参与了拟南芥种子的萌发<sup>[22]</sup>。

水杨酸(salicylic acid, SA)是一种存在于植物体内的酚酸类物质, 内源SA被认为是一种信号分子。当病原体侵染植物时, 内源SA可以快速积

累到较高水平, 并通过调控细胞内氧化物水平来响应外界胁迫。外源施加的SA可作为诱导子激活相关酶(抗氧化酶、合成代谢酶)及病程基因的表达, 开启Ca<sup>2+</sup>、H<sup>+</sup>通道, 增加植物次生代谢物的合成过程, 在植物抵御盐<sup>[23]</sup>、重金属<sup>[24]</sup>、高温<sup>[25]</sup>、病毒<sup>[26]</sup>、细菌<sup>[27]</sup>等逆境胁迫方面起重要作用。

笔者所在课题组的前期研究表明, SA可以有效诱导丹参悬浮培养细胞中Sal B的积累, 并且苯丙氨酸解氨酶(PAL)参与了该过程<sup>[28]</sup>。然而SA诱导Sal B生物合成的机制尚不清楚, 介导这一过程的信号分子也不明确。本研究以广泛参与植物细胞信号转导途径的NO为研究对象, 利用NO猝灭剂和NO合酶的抑制剂改变SA诱导的丹参悬浮培养细胞内NO的水平, 分析细胞内NO水平对Sal B积累的影响, 明确SA诱导的NO是否参与丹参悬浮培养细胞中Sal B的积累, 为阐明诱导子调控植物次生代谢产物的合成机制提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 丹参悬浮培养细胞系的建立及诱导处理

愈伤组织培养方法同Dong等<sup>[28]</sup>。将新鲜丹参种子(采自陕西天士力植物药业有限公司商洛丹参GAP药源基地)用自来水冲洗2~4 h, 并用纱布去除种子表面的蜡质层后, 再用自来水冲洗3次; 在无菌操作间进行灭菌处理(70%乙醇, 30 s; 0.1%HgCl<sub>2</sub>, 15 min)后, 将种子接种到MS固体培养基上(5.5 g/L琼脂和30 g/L蔗糖), 25℃光照培养(12~16 h/d, 光强2000~3000 lx); 培养60 d后, 将无菌苗叶片剪成0.5 cm×0.5 cm的小块, 接种于MS固体诱导培养基上, 在光照条件下(24±2℃, 12 h)诱导形成愈伤组织。诱导培养基中含有1.0 mg/L NNA(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。诱导出的愈伤组织每20 d继代培养一次。

取转接后培养15 d的丹参愈伤组织, 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(不含琼脂和激素, 含 30 g/L 蔗糖)25℃黑暗悬浮培养(摇床转速为 125 r/min)2 d。然后分别加入双蒸水、0.5 mmol/L L-AOPP(L-2-aminoxy-3-phenyl acrylic acid, PAL 抑制剂)、0.5 mmol/L SNP(NO 供体硝普钠)、2 mmol/L L-NNA(N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine, NO 合成酶抑制剂)或 50 μmol/L cPITO(carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, NO 淬灭剂), 0.5 h 后再加入 SA(22.5 mg/L)进行诱导处理。

### 1.2 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性检测

取 2 g 愈伤组织, 加入 5 mL 提取缓冲液充分研磨后, 以 4 层纱布过滤并于 4℃离心(10 000 r/min)15 min, 上清液即为粗酶提取物。反应液终体积为 3 mL, 包含 0.5 mL 粗酶提取物、0.5 mL L-苯丙氨酸(16 mmol/L)、1.5 mL Tris-HCl 缓冲液(pH 8.9, 50 mmol/L)、0.5 mL NaCl(3.6 mmol/L)。反应液在 37℃温育 60 min 后以 50 μL HCl(6 mol/L)结束反应, 然后将反应液离心(10 000 r/min)10 min, 在 290 nm 下测定上清液吸光度。

### 1.3 NO 含量检测

将 NO 氧化成亚硝酸盐, 再利用 Greiss 试剂(1% 对氨基苯磺酸, 0.1% N-萘基-乙二胺, 5% 磷酸)测定所生成的亚硝酸盐含量, 进而推算出细胞中 NO 浓度。丹参悬浮培养细胞经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 取 1 mL 滤液加入 1 mL Greiss 试剂振荡混匀, 室温下放置 30 min 后在 550 nm 下测定其吸光度, 然后根据吸光度值及 NaNO<sub>2</sub> 标准曲线计算 NO 含量。

### 1.4 丹酚酸 B(Sal B)提取及其积累量检测

收获丹参培养物, 1000 r/min 离心 5 min, 然后将收集的悬浮培养细胞放入 47℃真空干燥箱中干燥至恒重。取约 0.05 g 干燥细胞放入带塞试管中, 用 70:30 (V/V) 的甲醇-水溶液超声波提取 45 min; 将提取液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤后待检备用。Sal B 含量检测采用高效液相色谱法(HPLC), 色谱检测条件为: 色谱柱 shim-pack VP-ODS(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-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℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 SA 对丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量的影响

用 22 mg/L SA 处理丹参悬浮培养细胞后, 按照图 1 所示时间点分别检测 SA 处理后丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量。结果表明, SA 处理 40 min 后 NO 含量开始升高, 处理 4 h 时达到峰值(2.11 μmol/g FW), 其含量约为对照组(H<sub>2</sub>O 处理)的 16.59 倍(图 1: A)。PAL 活性在 SA 处理 4 h 后开始急剧升高, 至处理后 16 h 时达到峰值(694.15 U/g FW), 其活性约为对照组的 5.22 倍(图 1: B)。Sal B 积累量在 SA 处理 8 h 后开始升高, 至处理后 48 h 时达到峰值(1.95 mg/g DW)(图 1: C)。这说明 SA 处理使丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量增加, 且显著高于对照组, 其中 NO 对 SA 诱导的响应最快, 其次是 PAL, 而 Sal B 积累晚于 NO 产生和 PAL 活化。

### 2.2 NO 供体 SNP 对丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量的影响

由图 1 可见, SA 诱导的丹参悬浮培养细胞内 NO 含量增加先于 Sal B 积累量增加, 为了明确 SA 诱导的 NO 含量增加是否与 Sal B 的积累有关, 我们用 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)和 SA 处理丹参悬浮培养细胞, 并分别检测其胞内 NO 水平和 Sal B 积累量(图 2: A), 同时分析了 SNP 对 PAL 活性的影响(图 2: B)。

与对照组(H<sub>2</sub>O 处理)相比, SNP 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 水平和 Sal B 积累量显著提高, 分别为对照组的 3.47 倍和 7.05 倍; 与 SA 诱导组相比, SNP 与 SA 联合处理丹参悬浮培养细胞后, 其胞内 NO 含量(4.44 μmol/g FW)和 Sal B 积累量(0.64 mg/g DW)显著提高(图 2: A)。这说明 SNP 与 SA 均可以促进 NO 的产生及 Sal B 积累, 且 SNP 与 SA 有协同作用。

与对照组(H<sub>2</sub>O 处理)相比, SNP 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 PAL 活性由 103.89 U/g FW 增加至 316.68 U/g FW。与 SA 诱导组(693.03 U/g FW)相比, SNP 与 SA 联合处理丹参悬浮培养细

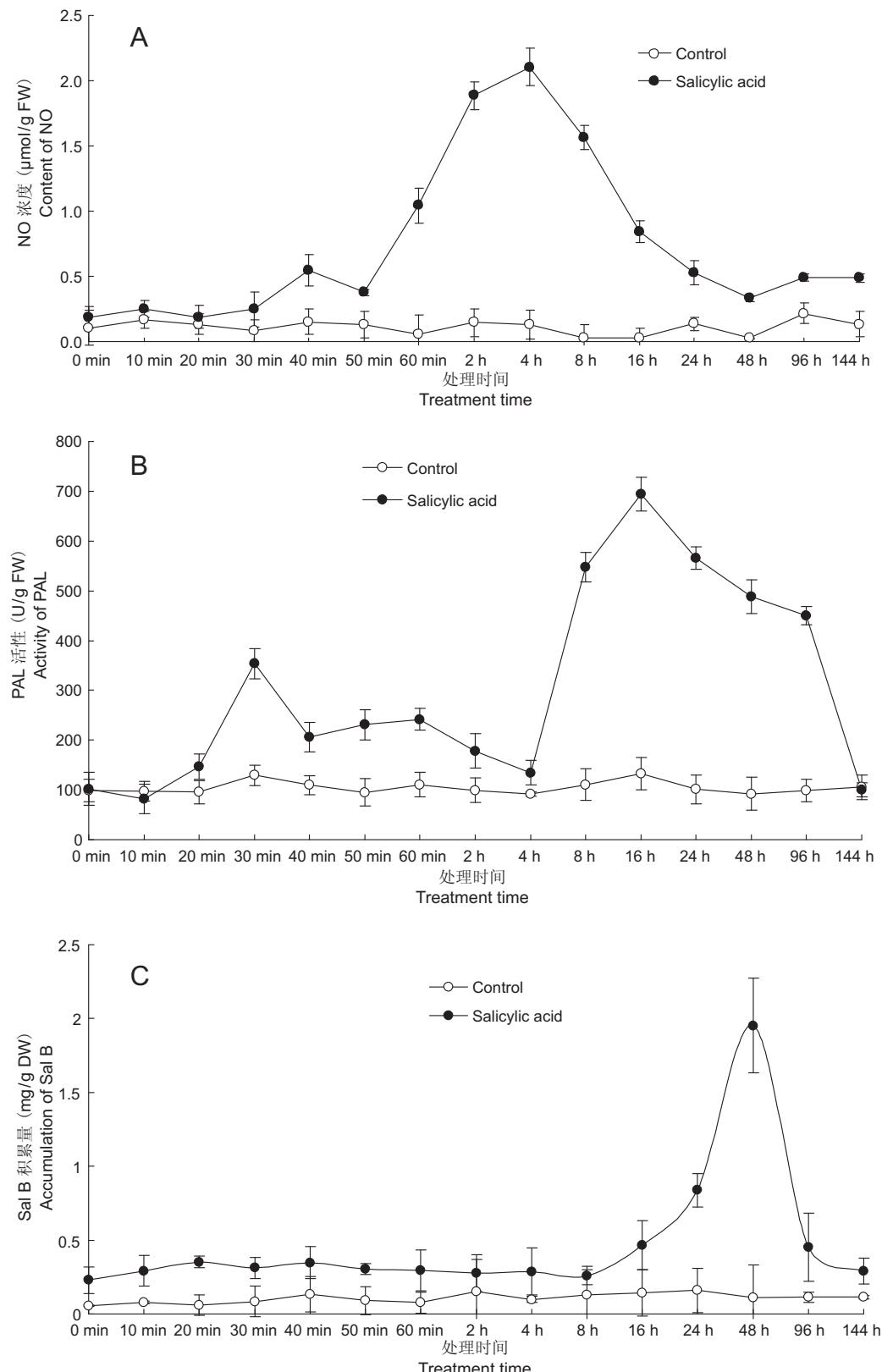
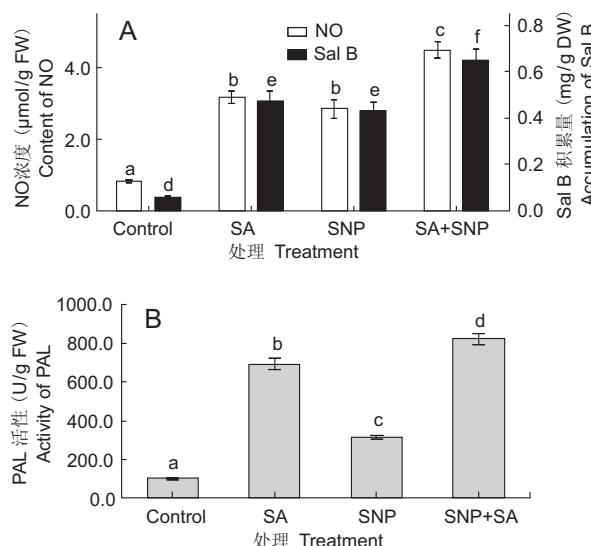


图 1 SA 对丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量的影响

Fig. 1 Effects of salicylic acid on nitric oxide content, phenylalanine ammonia-lyase activity, and salvianolic acid B accumulation in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells



图中不同小写字母表示在  $P < 0.05$  水平上差异显著。下同。  
Different lowercase on histograms with different patterns indicates significant differences at  $P < 0.05$ . SA: Salicylic acid.  
Same below.

### 图 2 SNP 对丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、Sal B 积累量及 PAL 活性的影响

Fig. 2 Effects of sodium nitroprusside on nitric oxide content, phenylalanine ammonia-lyase activity, and salvinolic acid B accumulation in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells

胞后其胞内 PAL 活性显著提高至 820.19 U/g FW (图 2: B)。这说明 SNP 和 SA 可协同促进 PAL 活化。

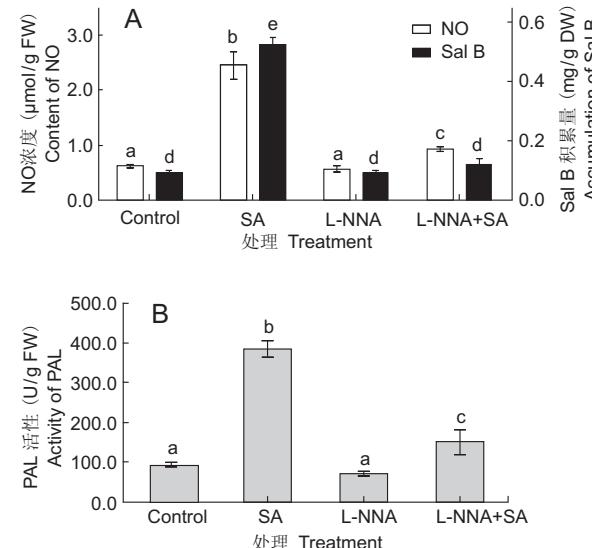
### 2.3 NOS 抑制剂 L-NNA 对丹参悬浮培养细胞中 SA 诱导的 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量的影响

L-NNA ( $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine) 是 NO 合酶 (NOS) 的抑制剂, 能够有效抑制 NOS 活性从而抑制 NO 产生。图 2 中用 NO 的供体 SNP 处理丹参悬浮培养细胞提高了胞内 Sal B 的积累量, 暗示 NO 与 Sal B 的积累有关。为了进一步说明 SA 诱发的 NO 产生能促进 Sal B 的积累, 我们用 2 mmol/L L-NNA 抑制 NOS 活性并检测丹参悬浮培养细胞中 Sal B 积累量的变化(图 3: A), 同时分析 SNP 对 PAL 活性的影响(图 3: B)。

与对照组( $H_2O$  处理)相比, L-NNA 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 水平和 Sal B 积累量无显著变化。与 SA 诱导组相比, L-NNA 与 SA 联合处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 含量显著降低(仅为 SA 诱导组的 35.21%), Sal B 的积累量也

显著降低为 SA 诱导组的 24.53% (图 3: A)。这说明 L-NNA 处理显著抑制了 SA 诱发的 NO 产生, 从而抑制了 Sal B 积累量的增加。

与对照组( $H_2O$  处理)相比, L-NNA 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 PAL 活性略有降低; 与 SA 诱导组相比, PAL 活性也显著降低, 仅为 SA 诱导组的 40.80% (图 3: B)。这说明 L-NNA 可以有效抑制 SA 诱导的 PAL 活性提高。



### 图 3 L-NNA 对丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、Sal B 积累量及 PAL 活性的影响

Fig. 3 Effects of L-NNA ( $N^{\omega}$ -nitro-L-arginine) on nitric oxide content, phenylalanine ammonia-lyase activity, and salvinolic acid B accumulation in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells

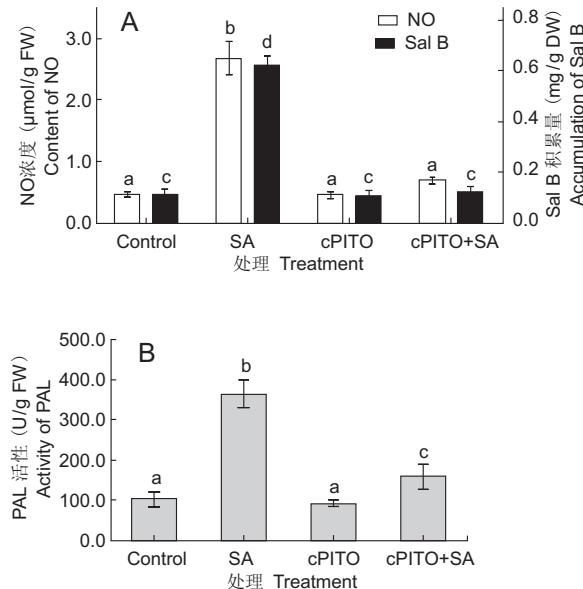
### 2.4 NO 淹灭剂对 SA 诱导的丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量的影响

cPITO 是 NO 淹灭剂, 它能够有效清除细胞内的 NO。为了明确 SA 诱导产生的 NO 对 PAL 活性和 Sal B 生物合成的影响, 我们用 SA 和 50  $\mu$ mol/L cPITO 处理丹参悬浮培养细胞并检测其胞内 NO 水平、PAL 活性及 Sal B 积累量的变化。

与对照组( $H_2O$  处理)相比, cPITO 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 水平及 Sal B 积累量均无显著变化。与 SA 诱导组相比, cPITO 与 SA 联合处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 含量显著降低(仅为 SA 诱导组的 26.22%), Sal B 的积累量也显著降低, 仅为 SA 诱导组的 18.75% (图 4: A)。这说明 cPITO 处理显著抑制了 SA 诱导的丹参悬浮

培养细胞中 NO 产生, 从而抑制 Sal B 积累量的增加。

与对照组 ( $H_2O$  处理) 相比, cPITO 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 PAL 活性略有降低; 与 SA 诱导组相比, cPITO 与 SA 联合处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 PAL 活性由 381.29 U/g FW 降低至 161.75 U/g FW, 下降幅度达 57.58% (图 4: B)。这说明 cPITO 可以抑制 SA 诱导的丹参悬浮培养细胞中 PAL 活性提高。



cPITO: carboxy-2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide.

图 4 cPITO 对丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、Sal B 积累量及 PAL 活性的影响

Fig. 4 Effects of cPITO on nitric oxide content, phenyla-lanine ammonia-lyase activity, and salvianolic acid B accumulation in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells

## 2.5 PAL 抑制剂 L-AOPP 对 SA 诱导的丹参悬浮培养细胞中 NO 含量、PAL 活性及 Sal B 积累量的影响

为了进一步明确 PAL 活性变化与 Sal B 积累量之间的关系, 我们用 0.5 mmol/L L-AOPP (L-2-aminoxy-3-phenyl acrylic acid, PAL 专一性抑制剂) 处理丹参悬浮培养细胞并检测其胞内 PAL 活性和 Sal B 积累量。结果表明, 与对照组 ( $H_2O$  处理) 相比, L-AOPP 处理丹参悬浮培养细胞后对其胞内 PAL 活性及 Sal B 积累量均有显著抑制作用。与 SA 诱导组相比, L-AOPP 与 SA 联合处理

丹参悬浮培养细胞后其胞内 PAL 活性由 693.03 U/g FW 降低至 100.87 U/g FW, 即下降了 85.45%; Sal B 积累量也由 0.50 mg/g DW 降至 0.09 mg/g DW, 即下降了 82.00% (图 5: A)。这说明 L-AOPP 可以有效抑制 SA 诱导的丹参悬浮培养细胞中 PAL 活化, 从而使 Sal B 积累量减少。

当丹参悬浮培养细胞内产生的 NO 水平下降时, PAL 活性和 Sal B 的积累量也显著降低, 但 PAL 活化是否影响丹参悬浮培养细胞内 NO 水平尚不清楚。用 L-AOPP 处理丹参悬浮培养细胞后并检测其胞内 NO 水平发现, 与对照组 ( $H_2O$  处理) 相比, L-AOPP 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 水平无显著变化; 与 SA 诱导组相比, L-AOPP 和 SA 联合处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 含量也无显著变化 (图 5: B)。这说明 PAL 活性变化不影响 SA 诱发的丹参悬浮培养细胞中 NO 产生。

## 3 讨论

植物抵御逆境胁迫往往伴随次生代谢物的积

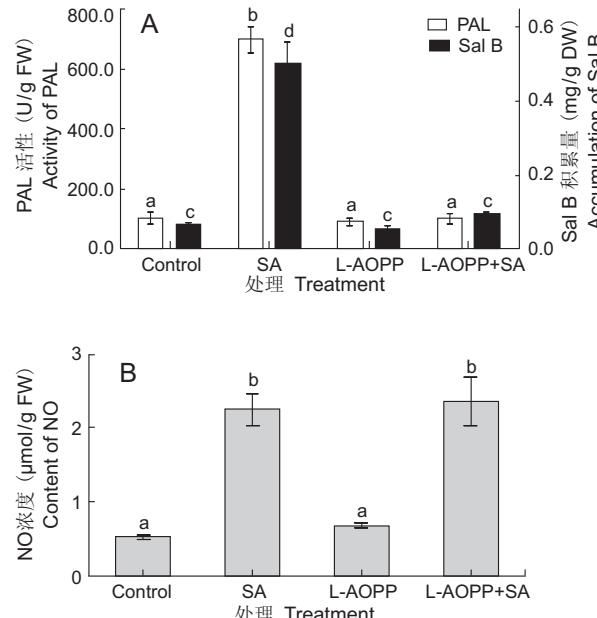


图 5 L-AOPP 对丹参悬浮培养细胞中 PAL 活性、Sal B 积累量及 NO 含量的影响

Fig. 5 Effects of L-AOPP on nitric oxide content, phenyla-lanine ammonia-lyase activity, and salvianolic acid B accumulation in *Salvia miltiorrhiza* suspension cells

累。作为广泛参与植物逆境应答的信号分子, NO 调控植物细胞次生代谢途径的信号转导。Modolo 等用 NO 处理大豆种子, 发现外源 NO 可以提高大豆种子发芽点黄酮和异黄酮类物质的含量<sup>[29]</sup>。人参(*Panax ginseng*)根培养细胞中, SA 诱发的 NO 诱发与人参皂甙积累量呈正相关<sup>[30]</sup>。以桔青霉(*Penicillium citrinum*)细胞壁制备的真菌诱导子可以诱发长春花(*Catharanthus roseus*)培养细胞中 NO 诱发, 而 NO 专一性淬灭剂 cPITO 不仅可以抑制 NO 诱发, 还能够阻断真菌诱导子对胞内长春花碱生物合成的促进作用, 表明 NO 合成积累是桔青霉细胞壁诱导子诱发长春花碱生物合成的必要条件<sup>[13]</sup>。此外, 在内生菌诱导的大戟(*Euphorbia pekinensis*)悬浮培养细胞中, NO 介导了异大戟素的生物合成<sup>[14]</sup>。在真菌诱导的苍术(*Atractylodes lancea*)植株中, NO 参与调控挥发油的合成积累<sup>[12]</sup>。本研究结果也表明, SA 诱导丹参悬浮培养细胞后其胞内 NO 含量、Sal B 积累量均显著提高; NO 抑制剂 L-NNA 或 NO 淬灭剂 cPITO 处理显著抑制了 SA 诱发的丹参悬浮培养细胞中 Sal B 积累量提高, NO 供体 SNP 处理则显著提高了 Sal B 积累量。说明 SA 诱发的 NO 产生是丹参悬浮培养细胞中 Sal B 生物合成信号转导途径中所必需的信号分子。

PAL 是苯丙烷代谢途径的限速酶, 它参与了黄酮类、生物碱类及萜类等次生代谢物的合成。Dong 等研究表明, PAL 是 SA 诱导的丹参悬浮培养细胞中 Sal B 生物合成途径中的关键酶<sup>[28]</sup>, 但在 Sal B 合成途径中 PAL 如何被激活却不清楚。UV-B 诱导的银杏(*Ginkgo biloba*)培养细胞中, NO 是 PAL 的上游信号, 它通过调控 PAL 活性介导了类黄酮类物质的合成<sup>[17]</sup>。在红豆杉(*Taxus chinensis*)培养细胞紫杉醇的合成积累中, NO 通过促进茉莉酸甲酯合成提高了 PAL 活性<sup>[16]</sup>。在马铃薯叶片中, NO 通过提高伤害部位 PAL 表达参与了马铃薯叶片对伤害胁迫的响应<sup>[18]</sup>。本实验中 SA 诱发的 NO 含量达到峰值的时间为处理后 4 h, 早于 PAL 活性达到峰值的时间(处理后 16 h); 同时, SNP 处理显著提高了丹参悬浮培养细胞中 PAL 活性, NO 抑制剂 L-NNA 及 NO 淬灭剂 cPITO

有效抑制了该合成酶的活性, 但 PAL 抑制剂处理并未对丹参悬浮培养细胞内 NO 水平产生显著影响。这说明 SA 诱发的 NO 位于 PAL 上游, 且 NO 通过调控 PAL 活性参与调控 Sal B 的生物合成。

植物体内次生代谢物质的合成是受细胞内部相关信号分子调控的一系列复杂的生化反应过程, SA 作为外源诱导子本身并不能直接参与细胞内的次生代谢过程, 因此在植物细胞内必然存在着相应的信号转导机制来感受并传递该诱导信号。本研究表明, SA 诱发的 NO 是丹参悬浮培养细胞中 Sal B 生物合成信号转导途径中所必需的信号分子; NO 位于 PAL 上游, 并通过调控 PAL 活性参与 Sal B 的生物合成。本实验虽然明确了 NO 作为信号分子调控丹参悬浮培养细胞中 Sal B 生物合成, 但其信号途径的组成(如 NO 受体)及与其它信号转导途径之间的关系尚不清楚; 当 NO 等信号分子完成信号转导过程后, 该信号如何被清除等还有待进一步深入研究。

## 参考文献:

- [1] Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance[J]. *Nature*, 1998, 6693(394): 585-588.
- [2] Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT. Nitric oxide synthesis and signalling in plants[J]. *Plant Cell Environ*, 2008, 31(5): 622-631.
- [3] Flores T, Todd CD, Tovar-Mendez A, Dhanoa PK, Correa-Aragunde N, Hoyos ME, Brownfield DM, Mullen RT, Lamattina L, Polacco JC. Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147(4): 1936-1946.
- [4] Crawford NM. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants[J]. *Exp Bot*, 2006, 57(3): 471-478.
- [5] Wendehenne D, Durner J, Klessig DF. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(4): 449-455.
- [6] Leshem Y, Haramaty E, Iluz D, Malik Z, Sofer Y, Roitman L, Leshem Y. Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity[J]. *Plant Physiol and Bioch*, 1997, 35(7):

- 573–579.
- [7] Kopyra M, Stachoń-Wilk M, Gwóźdż EA. Effects of exogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension [J]. *Acta Physiol Plant*, 2006, 28(6): 525–536.
- [8] Xuan Y, Zhou S, Wang L, Cheng Y, Zhao L. Nitric oxide functions as a signal and acts upstream of AtCaM3 in thermotolerance in *Arabidopsis* seedlings [J]. *Plant Physiol*, 2010, 153(4): 1895–1906.
- [9] Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M. Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions [J]. *Cell Microbiol*, 2004, 6(9): 795–803.
- [10] Garcés H, Durzan D, Pedroso MC. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Ann Bot*, 2001, 87(5): 567–574.
- [11] A-H-Mackerness S, John CF, Jordan B, Thomas B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide [J]. *Febs Lett*, 2001, 489(2): 237–242.
- [12] Wang Y, Dai CC, Zhao YW, Peng Y. Fungal endophyte-induced volatile oil accumulation in *Atractylodes lancea* plantlets is mediated by nitric oxide, salicylic acid and hydrogen peroxide [J]. *Process Biochem*, 2011, 46(3): 730–735.
- [13] Xu MJ, Dong JF. Elicitor-induced nitric oxide burst is essential for triggering catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2005, 67(1): 40–44.
- [14] Gao FK, Ren CG, Dai CC. Signaling effects of nitric oxide, salicylic acid, and reactive oxygen species on isoeuphekinensin accumulation in *Euphorbia pekinensis* suspension cells induced by an endophytic fungal elicitor [J]. *J Plant Growth Regul*, 2012, 31(4): 490–497.
- [15] Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose [J]. *Pol Acad Sci*, 1998, 95(17): 10328–10333.
- [16] 徐茂军, 董菊芳, 朱睦元. NO 参与真菌诱导子对红豆杉悬浮细胞中 PAL 活化和紫杉醇生物合成的促进作用 [J]. 科学通报, 2004, 49(7): 667–672.
- [17] Hao G, Du X, Zhao F, Shi R, Wang J. Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba* callus [J]. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2009, 97(2): 175–185.
- [18] París R, Lamattina L, Casalougué CA. Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45(1): 80–86.
- [19] Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells [J]. *J Exp Bot*, 2004, 395(55): 205–212.
- [20] Wang JW, Wu JY. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(6): 923–930.
- [21] Rasul S, Dubreuil-Maurizi C, Lamotte O, Koen E, Poinsot B, Alcaraz G, Wendehenne D, Jeandroz S. Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to *botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Enviro*, 2012, 35(8): 1483–1499.
- [22] Tun NN, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh EIS, Scherer GF. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. *Plant Cell Physiol*, 2006, 47(3): 346–354.
- [23] Noreen S, Ashraf M. Alleviation of adverse effects of salt stress on sunflower (*Helianthus annuus* L.) by exogenous application of salicylic acid: growth and photosynthesis [J]. *Pak J Bot*, 2008, 40(4): 1657–1663.
- [24] Popova LP, Maslenkova LT, Ivanova A, Stoinova Z. Role of Salicylic Acid in Alleviating Heavy Metal Stress, Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change [M]. Berlin: Springer, 2012: 447–466.
- [25] Airaki M, Leterrier M, Mateos RM, Valderrama R, Chaki M, Barroso JB, Del Rio LA, Palma JM, Corpas FJ. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature

- stress[J]. *Plant Cell Enviro*, 2012, 35(2): 281–295.
- [26] Kundu S, Chakraborty D, Pal A. Salic acid ameliorates susceptible vigna mungo cultivar to mung-bean yellow mosaic india virus infection[J]. *Sci cult*, 2012, 21(3): 231–236.
- [27] Doornbos RF, Geraats BP, Kuramae EE, Van Loon L, Bakker PA. Effects of jasmonic acid, ethylene, and salicylic acid signaling on the rhizosphere bacterial community of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Plant Microbe In*, 2011, 24(4): 395–407.
- [28] Dong JE, Wan GW, Liang ZS. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidant enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture[J]. *J Biotechnol*, 2010, 148(2–3): 99–104.
- [29] Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130(3): 1288–1297.
- [30] Tewari RK, Paek KY. Salicylic acid-induced nitric oxide and ROS generation stimulate ginsenoside accumulation in *Panax ginseng* roots[J]. *J Plant Growth Regul*, 2011, 30(4): 396–404.

(责任编辑: 刘艳玲)