

水杨酸诱发的丹参悬浮培养细胞内 H_2O_2 迸发与其培养基碱化的关系

张洪培, 张晓茹, 胡格格, 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(salicylic acid, SA)处理可诱导丹参悬浮培养细胞内 H_2O_2 产生及其培养基碱化。利用 NADPH 氧化酶抑制剂咪唑(imidazole, IMD)、 H_2O_2 淬灭剂二甲基硫脲(dimethylthiourea, DMTU)、质膜 H^+ -ATPase 抑制剂钒酸钠(Na_3VO_4)及激活剂壳孢菌素(fusicoccin, FC)处理丹参悬浮培养细胞, 探讨 SA 诱导的 H_2O_2 迸发与培养基碱化之间的关系。结果表明, H_2O_2 可促发培养基碱化, IMD 和 DMTU 抑制 SA 诱导的培养基碱化, 说明 H_2O_2 参与 SA 诱导的培养基碱化过程; SA 抑制质膜 H^+ -ATPase 活性, Na_3VO_4 引发培养基碱化并使 H_2O_2 迸发时间提前, FC 处理逆转了 SA 诱导的培养基碱化及 H_2O_2 迸发, 说明质膜 H^+ -ATPase 调控培养基 pH 值变化, 培养基碱化促进了 H_2O_2 产生。因此, 丹参悬浮培养细胞内 H_2O_2 水平与其培养基碱化程度之间相互关联、共同作用, 协同响应 SA 的诱导。

关键词: 培养基碱化; H_2O_2 ; 水杨酸; 信号转导; 丹参

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)03-0405-09

Relationship between H_2O_2 Burst and Medium Alkalinization Induced by Salicylic Acid in *Salvia miltiorrhiza* Cell Suspension Cultures

ZHANG Hong-Pei, ZHANG Xiao-Ru, HU Ge-Ge, DONG Juan-E*

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

Abstract: Salicylic acid (SA) treatment can induce significant H_2O_2 burst in *Salvia miltiorrhiza* suspension culture cell and its medium alkalinization. In this study, the correlation between SA-induced H_2O_2 burst and medium alkalinization was investigated through NADPH oxidase inhibitor imidazole (IMD), H_2O_2 quenching agent dimethylthiourea (DMTU), plasma membrane H^+ -ATPase inhibitor Na_3VO_4 and plasma membrane H^+ -ATPase activator fusicoccin (FC). Results showed that (1) H_2O_2 treatment also induced significant medium alkalinization, and IMD and DMTU suppressed the process of SA-induced medium alkalinization, which suggested that H_2O_2 was involved in the process of SA-induced medium alkalinization; (2) SA suppressed the activity of plasma membrane H^+ -ATPase, Na_3VO_4 treatment caused rapid medium alkalinization and led to H_2O_2 burst ahead of time, and FC reversed SA-induced medium alkalinization and H_2O_2 accumulation, which suggested that plasma membrane H^+ -ATPase regulated the change in medium pH value and medium alkalinization promoted the generation of H_2O_2 . Overall, the H_2O_2 level in the *S. miltiorrhiza* suspension culture cell and its

收稿日期: 2014-08-13, 退修日期: 2014-09-18。

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。

作者简介: 张洪培(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事药用植物次生代谢调控方面研究(E-mail: 771844153@qq.com)。

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

medium alkalization level functioned together to respond to induction of salicylic acid.

Key words: Medium alkalization; Hydrogen peroxide; Salicylic acid; Signal transduction; *Salvia miltiorrhiza*

诱导子可引发活性氧 (ROS)^[1]、一氧化氮 (NO)^[2]、氢离子 (H⁺)^[3] 等胞内信号的迸发, 信号分子间的交叉互作在植物防御应答和次生代谢过程中发挥着重要作用^[4], 因此研究信号间的相互作用有助于深入认识植物对逆境的适应调控机制。培养基碱化伴随有胞质酸化, 是植物细胞感受外界刺激的早期反应^[5], 一般认为是由于离子交换、H⁺内流等原因造成的。逆境胁迫如机械刺激^[6]、重金属胁迫^[7]等均可改变 H⁺流向, 引起细胞内外 pH 值变化, 从而调控植物防御应答^[7]和免疫反应^[8]。细胞质酸化可诱导植物细胞 ROS 的迸发^[9]、次生代谢物合成^[10]和防御基因表达^[11]。质膜质子泵 (PM H⁺-ATPase) 是植物细胞膜的主要成分之一, 也是改变细胞内外 pH 值的关键酶, 可利用 ATP 释放的能量将胞内 H⁺释放到膜外, 故 PM H⁺-ATPase 在细胞质酸化过程中起着关键作用。Brault 等^[12]研究表明, ABA 抑制拟南芥细胞质膜 H⁺-ATPase 的活性, 并迅速诱导质膜去极化, 造成了细胞质酸化。

H₂O₂ 是植物细胞内重要的信号分子, 可调节信号转导蛋白, 影响植物防卫反应、细胞凋亡、基因表达等生理生化过程, 其中高热^[13]、干旱^[14]等环境压力可诱导 H₂O₂ 迸发。H₂O₂ 水平与细胞质酸化间存在显著的正相关关系, 即胞质 pH 值变化介导 H₂O₂ 诱导的气孔关闭^[15], 而胞质酸化诱导活性氧的产生^[9]。铁^[16]也可诱导 H₂O₂ 迸发, 从而抑制 H⁺-ATPase 活性, H₂O₂ 则通过抑制 PM H⁺-ATPase 而参与到胞外碱化 (胞质酸化) 过程中。

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 为唇形科鼠尾草属植物, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效^[17]。水杨酸 (salicylic acid, SA) 既可作为外源诱导子刺激丹参细胞酚酸类次生代谢产物的合成^[18], 又可作为胞内信号分子调控胞内氧化水平及次生代谢物合成, 从而抵御逆境胁迫^[19]。SA 诱发的 H₂O₂ 可作为重要的信使分子参与次生代谢过程^[20], 但对于 SA 如何引发丹参细胞培养基碱化以及 SA 诱发的 H₂O₂ 与培养基碱化

之间的关系等一系列信号转导或互作过程尚不清晰。为此, 本研究以丹参悬浮培养细胞为材料, 利用 H₂O₂ 淬灭剂 (二甲基硫脲, DMTU)、H₂O₂ 合成酶抑制剂 (咪唑, IMD) 改变 SA 诱导的胞内 H₂O₂ 水平, 并使用 PM H⁺-ATPase 激活剂 (壳梭孢菌素, FC) 及抑制剂 (钒酸钠, Na₃VO₄) 控制质子流向从而改变细胞内外 pH 值, 考察 H₂O₂ 对培养基 pH 值变化以及培养基 pH 值变化对胞内 H₂O₂ 水平的影响, 以期探讨 SA 诱导的 H₂O₂ 与胞外碱化的关系, 为明确诱导子调控植物抗逆过程的信号转导途径提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源及培养

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 种子来源于陕西天士力植物药业有限公司丹参 GAP 基地。悬浮培养细胞系的建立参照行冰玉等^[21]的方法。

1.2 水杨酸诱导及药理学试剂处理方法

取 30 mL 培养 6 d 的丹参悬浮细胞 (即细胞生长最旺盛时), 将经过 0.22 μm 微孔滤膜过滤后的各药理学试剂分别添加至培养液中, 悬浮培养 30 min 后再分别向培养液中加入 SA (Sigma 公司), 其处理浓度分别为 11、22、44 mg/L。空白对照组添加等体积的蒸馏水, 阴性对照组仅添加药理学试剂。各药理学试剂的处理浓度分别为: 1、10、50 mmol/L H₂O₂ (分析纯, 天津天力化学试剂有限公司), 50 μmol/L 二甲基硫脲 (DMTU, Sigma 公司), 400 μmol/L 咪唑 (IMD, Sanland Chemical 公司), 25、50、100 μmol/L 钒酸钠 (Na₃VO₄, Sigma 公司), 0.1、0.5、1.0 μmol/L 壳梭孢菌素 (FC, Sigma 公司), 每个处理设 3 次重复。

1.3 培养基 pH 值变化量的测定

用赛多利斯 PB-21 pH 计 (玻璃铂透膜电极) 在各试剂处理后的 0 ~ 20 min 内每隔 2 min 测定一次培养基的 pH 值。测定时使用磁力搅拌器匀速持续摇动培养基, 使悬浮细胞均匀分布, 避免培养物黏在玻璃电极上。初次测定值记录为初始值, pH

变化值为每次的测定值与初始值之差。

1.4 H_2O_2 含量的测定

采用改进的硫酸钛法^[22]测定 H_2O_2 含量:称取约 1 g 的丹参悬浮培养细胞,加入 4 mL 4℃预冷的丙酮,于冰浴下迅速研磨成匀浆,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min;取 1 mL 上清液并加入 0.1 mL 5%硫酸钛混匀,再加入 0.2 mL 浓氨水混匀,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min;弃上清液并用 4 mL 2 mol/L 浓硫酸溶解沉淀,然后在 415 nm 波长处测定吸光度。根据 H_2O_2 含量标准曲线计算不同浓度 SA 处理丹参培养细胞中 H_2O_2 含量:

$$H_2O_2 \text{ 含量}(\mu\text{mol} \cdot L^{-1} \cdot g^{-1} \text{ FW}) = \frac{C \times V_t}{FW \times V_i}$$

式中, C 为标准曲线上对应的样品中 H_2O_2 含量; V_t 为样品提取液总体积 (mL); V_i 为测定用样品提取液体积 (mL); FW 为丹参悬浮培养细胞鲜重 (g)。

1.5 质膜 H^+ -ATPase 活性测定

1.5.1 质膜提取与纯化

取丹参悬浮培养细胞 8 g,按照 1:2 (W/V) 的比例加入匀浆液 (含 0.5 mmol/L 蔗糖、15 mmol/L Tris-HCl pH 7.8、1 mmol/L EDTA、5 mmol/L Vit.C、1 mmol/L PMSF、3 mmol/L DTT、0.6% PV P) 研磨,匀浆液 10 000 r/min 离心 40 min;取上清液 45 000 r/min 离心 60 min;收集沉淀并用悬浮液 [含 0.3 mol/L 蔗糖、5 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 7.8)、1 mmol/L KCl、0.1 mmol/L EDTA、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L DTT] 悬浮,即得粗提质膜;再将粗提质膜加入两相系统 (含 0.014% KCl、8.7% 蔗糖、6.3% PEG 3350、6.3% Dextran T-500、磷酸缓冲液 pH 7.8) 中混匀,1000 r/min 离心 5 min 分相;将上相液转移至新配置的下相液中混匀后分相,重复 3 次;收集上相液,45 000 r/min 离心 60 min,所得沉淀即为纯化的质膜微囊。

1.5.2 H^+ -ATPase 活性检测

取 0.5 mL 酶反应液,加入 40 μ L 质膜,37℃ 水浴反应 20 min;用 10% TCA 终止反应后,加入 3 mL 定磷试剂 (3 mol/L H_2SO_4 :水:2.5%钼酸铵:10% Vit.C = 1:2:1:1),45℃ 水浴反应

25 min,冷却 10 min 后于 660 nm 波长处测定吸光度。以反应前立即加终止液作空白对照,并根据无机磷标准曲线计算无机磷含量。

1.6 数据处理

采用 Microsoft Excel 2003 对数据进行整理后作图,使用统计分析软件 DPS 7.05 进行数据分析。本文图中所示数值为 3 次重复的平均值 ($\bar{X} + SE$),不同字母表示在 5% 水平上具显著差异 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 SA 处理对丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值变化和 H_2O_2 含量的影响

2.1.1 SA 处理对丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值变化的影响

向丹参悬浮培养细胞培养基中加入不同浓度 SA 后,其 pH 值的变化趋势显示 (图 1),在本实验 SA 设置浓度范围内,SA 处理使培养基 pH 值迅速增加,直至 10 min 后增幅变缓;22 mg/L SA 处理使培养基 pH 值的升高量显著高于其他 2 个 SA 浓度处理 ($P < 0.05$),且为空白对照的 5 倍。说明 SA 可显著诱导丹参细胞培养基碱化,培养基 pH 值变化量与 SA 的处理浓度有关。

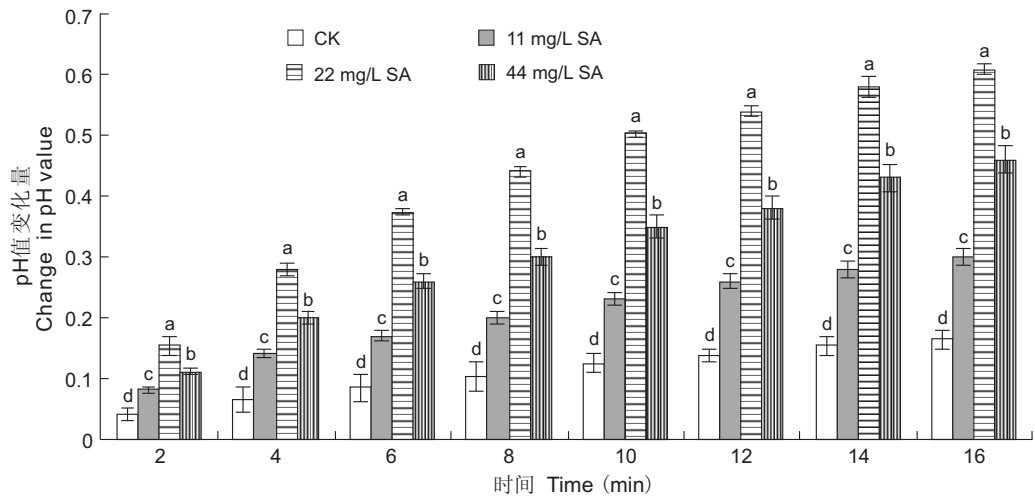
2.1.2 SA 处理对丹参悬浮培养细胞 H_2O_2 含量的影响

向丹参悬浮培养细胞中加入不同浓度 SA 后,其 H_2O_2 含量的变化趋势显示 (图 2),SA 引发了 H_2O_2 在处理 20 min 和 2 h 时的 2 次迸发;22 mg/L SA 诱导丹参悬浮培养细胞产生的 H_2O_2 显著高于其他 2 个 SA 浓度处理,并在处理 2 h 时达到最大迸发量 (是处理 20 min 时的 1.5 倍)。说明 SA 处理可诱导丹参悬浮培养细胞 H_2O_2 迸发,且 22 mg/L SA 处理可引发 H_2O_2 达到最大迸发量,这与引起培养基碱化最显著的 SA 处理浓度一致,因此本研究后续实验均采用 22 mg/L SA 处理。

2.2 H_2O_2 对 SA 诱发的培养基碱化的影响

2.2.1 H_2O_2 处理对培养基 pH 值的影响

为了明确 H_2O_2 处理对培养基 pH 值的影响,我们向丹参悬浮培养细胞中添加不同浓度的 H_2O_2 。结果表明 (图 3),添加外源 H_2O_2 可使培养基 pH



不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著。下同。
Different lowercases indicate significant differences at the $P < 0.05$ level. Same below.

图 1 水杨酸对丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值的影响

Fig. 1 Effect of salicylic acid on the pH value of *Salvia miltiorrhiza* cell culture media

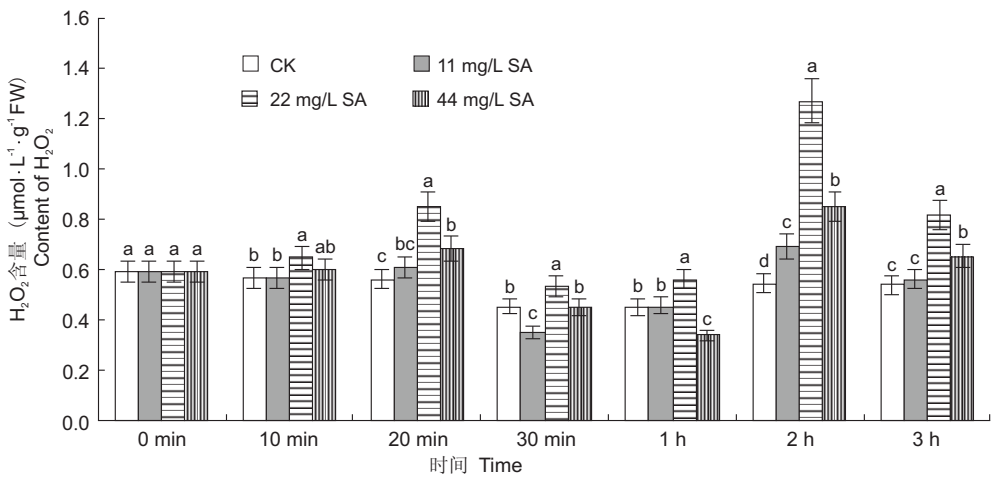


图 2 水杨酸对丹参悬浮培养细胞 H_2O_2 含量的影响

Fig. 2 Effect of salicylic acid on the content of H_2O_2 in *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures

值升高；10 mmol/L H_2O_2 处理使培养基 pH 值显著升高，且处理 10 min 时 pH 值升高量为对照的 2.58 倍。说明外源 H_2O_2 可引发培养基 pH 值升高。

2.2.2 过氧化氢淬灭剂 (DMTU) 处理对 SA 诱发的培养基碱化的影响

DMTU 可以有效淬灭胞内 H_2O_2 [23]，为探讨 SA 诱发胞内产生的 H_2O_2 对培养基 pH 值变化的影响，向丹参悬浮培养细胞中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ DMTU。结果表明(图 4)，DMTU 处理未使培养基 pH 值发生明显改变；DMTU 与 SA 联合处理时，

DMTU 则显著抑制了 SA 诱导的培养基碱化，且处理 10 min 时使 SA 诱发的 pH 值升高量下降 50%。说明 DMTU 可通过清除胞内产生的 H_2O_2 而削弱 SA 诱导培养基碱化的程度。

2.2.3 NADPH 氧化酶抑制剂 (IMD) 处理对 SA 诱发的培养基碱化的影响

NADPH 氧化酶是胞内产生 H_2O_2 的主要酶类，IMD 是抑制 NADPH 氧化酶的专一性抑制剂，为探讨 SA 诱发胞内产生的 H_2O_2 对培养基 pH 值变化的影响，向处理的丹参悬浮培养细胞中加入 400 $\mu\text{mol/L}$ IMD 与 22 mg/L SA。结果显示(图 4)，IMD 几乎

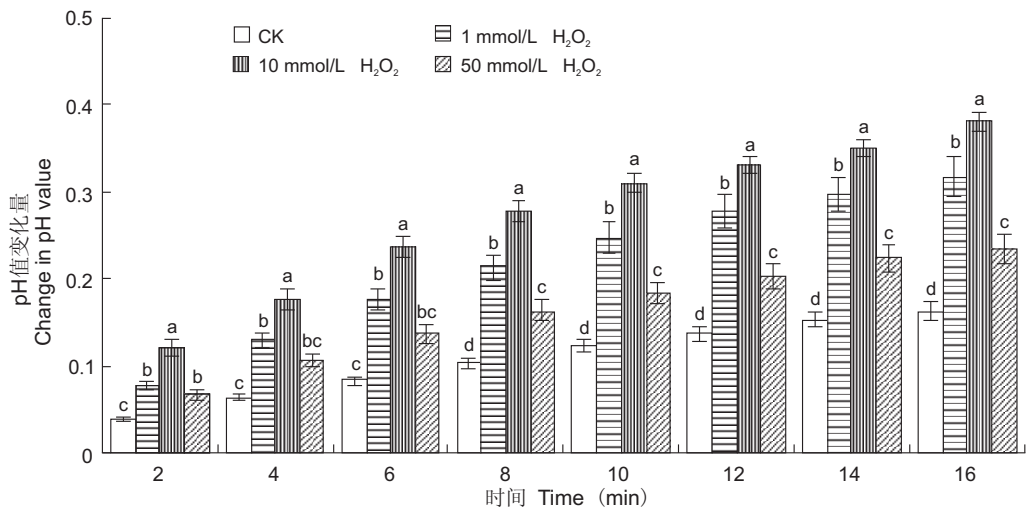


图3 H₂O₂对丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值的影响
Fig. 3 Effect of H₂O₂ on the pH value of *Salvia miltiorrhiza* cell culture media

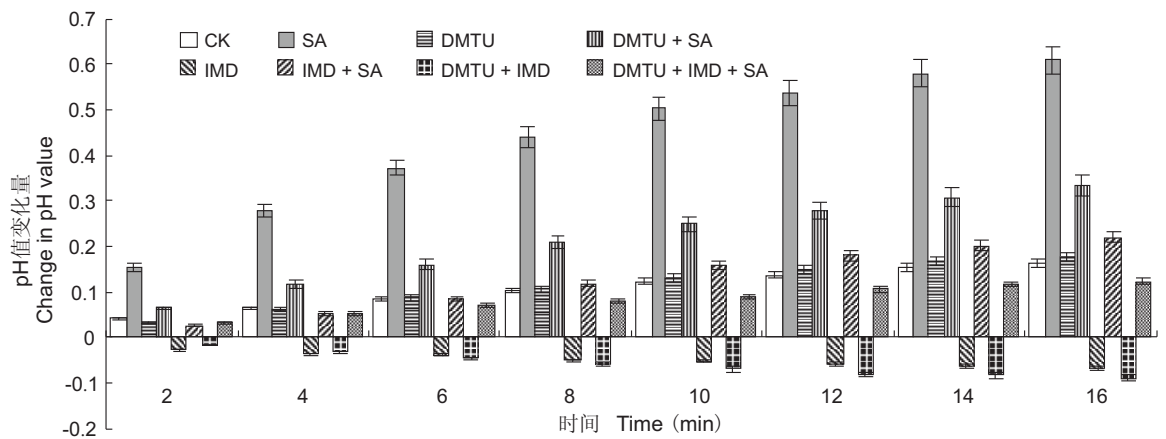


图4 DMTU、IMD、DMTU/IMD 处理对 SA 诱导的丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值的影响
Fig. 4 Effect of dimethylthiourea, imidazole and DMTU/IMD treatments on the pH value of *Salvia miltiorrhiza* cell culture media induced by salicylic acid

完全抑制了 SA 诱发的培养基碱化，说明 IMD 通过抑制 NADPH 氧化酶产生 H₂O₂ 而抑制了 SA 诱导的培养基碱化。

2.2.4 DMTU 与 IMD 联合处理对 SA 诱发的培养基碱化的影响

由图 4 可见，二甲基硫脲 (DMTU) 与咪唑 (IMD) 联合处理使丹参悬浮培养细胞培养基出现轻微酸化，且酸化程度随着处理时间的延长而增加；DMTU + IMD 处理使 SA 诱导的培养基 pH 值变化量显著低于 SA 处理，即 DMTU 和 IMD 联合处理完全抑制了 SA 诱导的培养基碱化。当 SA

诱导产生的 H₂O₂ 被抑制或被清除时，培养基碱化则被抑制，说明 H₂O₂ 参与了 SA 诱导的培养基碱化过程。

2.3 SA 处理对质膜 H⁺-ATPase 活性的影响

SA 处理后丹参悬浮培养细胞质膜 H⁺-ATPase 活性的变化表明 (图 5)，质膜 H⁺-ATPase 活性随处理时间的延长呈先降低后增加的趋势，并在处理 2 h 时降至最低 (0.264 μmol Pi · min⁻¹ · mg⁻¹ Pr)。说明 22 mg/L SA 可抑制质膜 H⁺-ATPase 活性，且通过抑制质膜 H⁺-ATPase 减少 H⁺ 外流，从而引发培养基碱化。

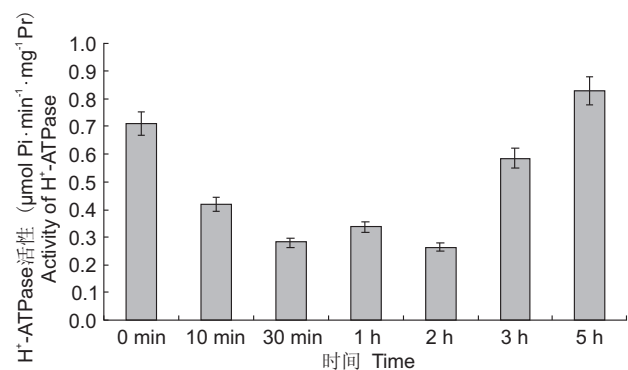


图 5 SA 处理对丹参悬浮培养细胞质膜 H⁺-ATPase 活性的影响
Fig. 5 Effect of salicylic acid on PM H⁺-ATPase activities of *Salvia miltiorrhiza* cell cultures

2.4 质膜 H⁺-ATPase 活性对 SA 诱导的培养基碱化的影响

2.4.1 质膜 H⁺-ATPase 抑制剂 (Na₃VO₄) 处理对培养基 pH 值的影响

Na₃VO₄是质膜 H⁺-ATPase 的抑制剂，为了明确质膜 H⁺-ATPase 活性对培养基 pH 值的影响，向丹参悬浮培养细胞中添加不同浓度的 Na₃VO₄。结果表明(图 6)，Na₃VO₄处理使培养基快速碱化，

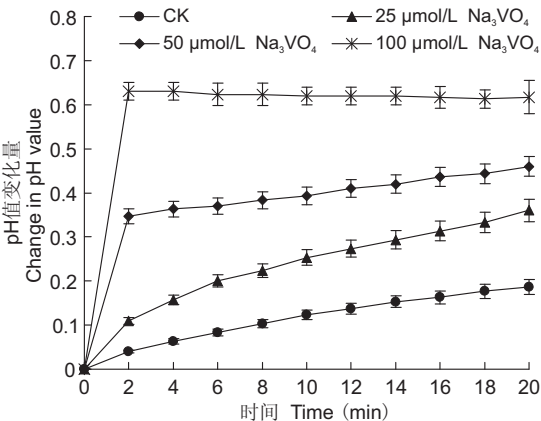


图 6 Na₃VO₄对丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值的影响
Fig. 6 Effect of Na₃VO₄ on the pH value of *Salvia miltiorrhiza* cell culture media

且随着处理浓度的升高，培养基碱化程度越强、碱化速度也越快。说明质膜 H⁺-ATPase 活性被抑制是引起培养基碱化的主要原因。

2.4.2 质膜 H⁺-ATPase 激活剂 (FC) 处理对 SA 诱导的培养基碱化的影响

为了验证质膜 H⁺-ATPase 活性影响 SA 诱导

的培养基碱化，使用质膜 H⁺-ATPase 激活剂壳梭孢菌素(FC)预先激活质膜 H⁺-ATPase 后发现(图 7: A)，FC 处理可迅速引发培养基酸化，且 FC 浓度越高，培养基酸化程度越大。FC 预处理后再外源施加 SA，则培养基酸化受到抑制，FC + SA 处理使丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值的升高量低于 SA 处理(图 7: B)。说明激活质膜质子泵可逆转 SA 诱发的培养基碱化过程。

为了明确培养基 pH 值降低是否对研究结果有影响，我们用 0.1 mol/L HCl 将丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值调至 4.2，再外源施加 SA 诱导。结果显示(图 7: B)，HCl + SA 处理使培养基 pH 值的升高量与 SA 处理间无显著差异，表明单一的培养基 pH 值降低不影响 SA 诱导的培养基碱化过程；而 FC + SA 处理使培养基 pH 值的升高量显著降低，即 FC 能抑制 SA 诱发的培养基碱化作用，说明激活态的质膜质子泵可抑制 SA 诱发的培养基碱化过程。

2.5 质膜 H⁺-ATPase 活性改变引发的培养基 pH 值变化对 SA 诱导产生 H₂O₂ 的影响

2.5.1 Na₃VO₄处理对丹参悬浮培养细胞内 H₂O₂ 含量的影响

Na₃VO₄可以通过抑制质膜 H⁺-ATPase 活性引起培养基碱化(图 6)。用 50 μmol/L Na₃VO₄处理丹参悬浮培养细胞后其培养基碱化对细胞内 H₂O₂ 含量的影响(图 8)表明，Na₃VO₄处理 10 min 时丹参悬浮培养细胞内 H₂O₂ 含量迅速升高，分别比对照组和 SA 诱导组高 25.5% 和 16.2%。说明 Na₃VO₄处理引起的培养基碱化可诱导 H₂O₂ 迸发，且培养基碱化引发的 H₂O₂ 迸发时间早于 SA 处理，但在实验设定时间内只有一次 H₂O₂ 迸发，说明单纯的培养基碱化引发的 H₂O₂ 迸发弱于 SA 处理。

2.5.2 FC 处理对 SA 诱导的 H₂O₂ 含量的影响

FC 处理可促进 H⁺释放从而抑制 SA 诱发的培养基碱化(图 7)。用 1 μmol/L FC 处理丹参悬浮培养细胞后其胞内 H₂O₂ 含量变化(图 9)表明，胞内 H₂O₂ 含量显著低于对照。FC 预处理后再用 SA 诱导，分别引发 H₂O₂ 在 20 min 和 2 h 时的 2 次迸发，但迸发量显著低于 SA 诱导组。说明当质膜 H⁺-ATPase 被激活且培养基碱化作用被抑制后，SA 诱发的 2 次 H₂O₂ 迸发均被抑制。

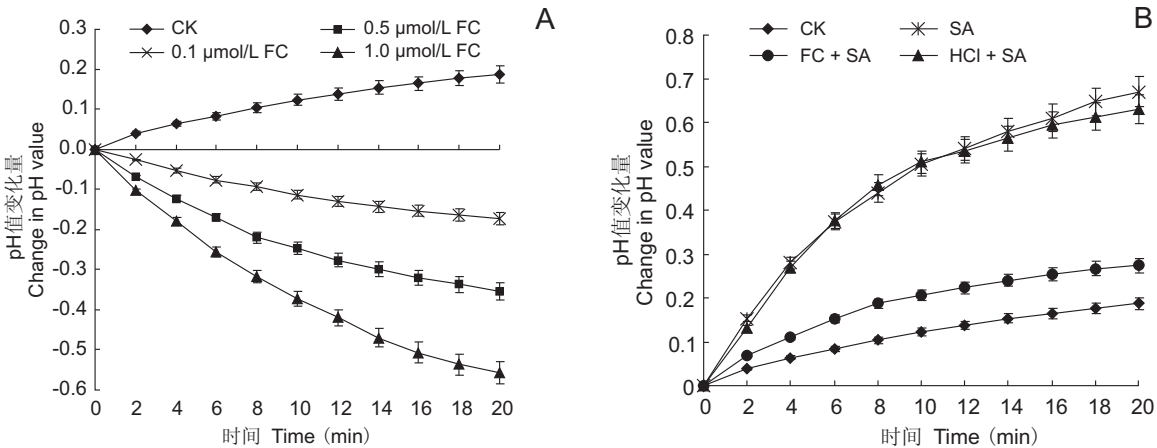


图 7 壳梭孢菌素 (FC) 对丹参悬浮培养细胞培养基 pH 值的影响
Fig. 7 Effect of fusicoccin on the pH value of *Salvia miltiorrhiza* cell culture media

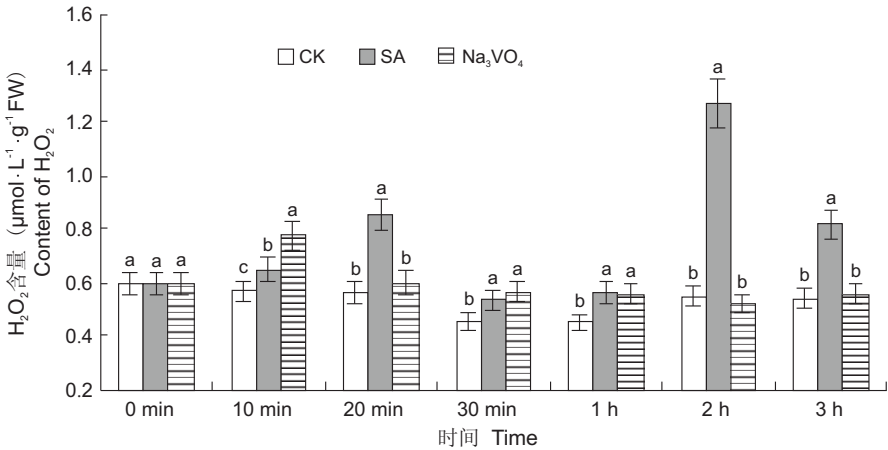


图 8 Na₃VO₄对丹参悬浮培养细胞内 H₂O₂ 含量的影响
Fig. 8 Effect of Na₃VO₄ on the content of H₂O₂ in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures

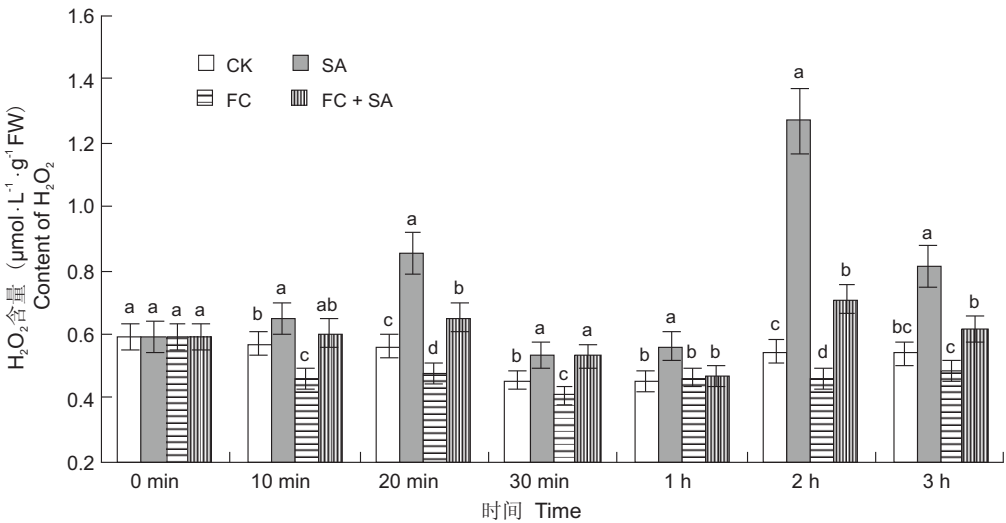


图 9 FC 对 SA 诱导的丹参悬浮培养细胞内 H₂O₂ 含量的影响
Fig. 9 Effect of fusicoccin on the content of H₂O₂ in *Salvia miltiorrhiza* cells after induction by salicylic acid

3 讨论

培养基碱化伴随有细胞质酸化,是诱导子引发的早期信号之一^[5]。细胞质酸化被视为响应外界刺激的重要步骤,可诱导活性氧的迸发和次生代谢物质合成^[9]。植物遭受胁迫后可诱导胞质酸化及胞内活性氧积累,这两种不同的胞内信号协同作用^[24]。本研究结果表明,SA可诱导丹参悬浮培养细胞内H₂O₂迸发、培养基碱化(细胞质酸化);诱导H₂O₂迸发与培养基碱化的SA最佳浓度(22 mg/L SA)一致,并与行冰玉等诱导丹参酚酸类次生代谢物生物合成的SA最佳浓度一致^[21]。此外,陈红艳等研究表明,H₂O₂影响丹参培养细胞丹酚酸(Sal B)的合成^[20],故可以推测培养基碱化可能也与丹参悬浮培养细胞的次生代谢过程有关。

质膜电位的瞬时变化构成植物感受胞外刺激的早期反应,质膜H⁺-ATPase对维持细胞内外pH值起着重要作用,其抑制态促进质子内流、培养基碱化、防御基因表达^[25],激活态则抑制寡聚糖和系统素引起的抗性反应发生,使质子外流、培养基酸化^[26]。本实验中SA处理抑制了质膜H⁺-ATPase活性,说明SA可能通过抑制质膜H⁺-ATPase活性促使H⁺内流从而引发培养基碱化;SA与钒酸钠(Na₃VO₄)处理均可引发丹参培养基的快速碱化,壳梭孢菌素(FC)处理导致培养基快速酸化,并抑制SA诱导的胞外介质碱化过程,说明质膜H⁺-ATPase参与SA对细胞内外pH值的调控,SA对质膜H⁺-ATPase的抑制作用是引发培养基碱化的原因之一。

细胞响应外界胁迫有着复杂的信号传递网络,信号间存在交叉互作^[4]。H₂O₂大量迸发可抑制质膜H⁺-ATPase活性,影响细胞内外pH值^[6],脱落酸则主要通过H₂O₂诱导质膜H⁺-ATPase去磷酸化来实现胞质酸化;同时,质膜质子泵抑制造成的培养基碱化可诱导细胞活性氧迸发^[9],说明H₂O₂与胞质酸化在植物响应外界胁迫的信号转导中存在相互作用。本研究发现,外源H₂O₂可引发丹参悬浮培养细胞培养基碱化,但程度低于22 mg/L SA处理,用H₂O₂的淬灭剂DMTU及主要合成酶抑制剂IMD处理丹参悬浮培养细胞后均抑制了SA诱导

的培养基碱化,说明H₂O₂参与SA诱导的培养基碱化过程,但并非是唯一参与的信号分子;质膜H⁺-ATPase激活剂抑制SA诱导的H₂O₂的2次迸发,且使H₂O₂迸发时间提前,说明通过抑制质膜H⁺-ATPase造成的培养基碱化促进了H₂O₂的迸发,但迸发量低于SA处理,说明培养基碱化只是SA诱导H₂O₂迸发的因素之一。SA通过质膜H⁺-ATPase诱导的培养基碱化促进H₂O₂迸发,进而促进胞外碱化进程。H₂O₂与培养基碱化协同作用,将SA诱导产生的信号级联放大,诱发防御应答反应,从而影响细胞的生长发育及次生代谢以抵御逆境胁迫。然而,仅通过以上研究不能证明伴随培养基碱化发生的细胞质酸化程度,也很难解释清楚H₂O₂与细胞质酸化间的关系,还需要通过进一步实验(如利用激光共聚焦显微镜观察细胞质pH值的变化情况)提供更直接的证据。

4 结论

水杨酸可诱导丹参悬浮培养细胞H₂O₂迸发及其培养基碱化。水杨酸诱发的H₂O₂参与培养基碱化的诱导过程;水杨酸抑制质膜质子泵活性,质膜质子泵参与培养基碱化过程;水杨酸诱发的培养基碱化促进H₂O₂迸发。因此,丹参悬浮培养细胞内H₂O₂迸发与其培养基碱化之间相互关联、协同作用,共同响应水杨酸的诱导。

参考文献:

- [1] 王弋博,冯虎元,曲颖,程佳强,王勋陵,安黎哲. 活性氧在UV-B诱导的玉米幼苗叶片乙烯产生中的作用[J]. 植物生态学报, 2007, 31(5): 946-951.
- [2] Bessonbard A, Pugin A, Wendehenne D. New insights into nitric oxide signaling in plants[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2008, 5(9): 21-39.
- [3] Rengel Z. Confocal pH Topography in Plant Cells: Shifts of Proton Distribution Involved in Plant Signalling[M]// Handbook of Plant Growth: pH as A Major Variable in Plant Growth. New York: CRC Press, 2001: 55-86.
- [4] Zhao J, Lawrence C, Davis RV. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites[J]. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(4): 283-333.

- [5] Ojalvo I, Rokem JS, Navon G. ^{31}P NMR study of elicitor treated *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures[J]. *J Plant Physiol*, 1987, 85(3): 716–719.
- [6] 高海波, 沈应柏, 黄秦军. 机械刺激触发沙冬青细胞产生依赖 Ca^{2+} 的 H^+ 内流[J]. 林业科学, 2012, 48(11): 36–41.
- [7] Benouaret R, Goujon E, Goupil P. Grape marc extract causes early perception events, defence reactions and hypersensitive response in cultured tobacco cells[J]. *Plant Physiol Bioch*, 2014, 77(4): 84–89.
- [8] Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Gotz F, Glawischign E, Lee J, Felix G, Nurnberger T. Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis* [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(2): 32338–32348.
- [9] Sakano K. Metabolic regulation of pH in plant cells: role of cytoplasmic pH in defense reaction and secondary metabolism [J]. *Int Rev Cytol*, 2001, 20(6): 41–44.
- [10] 刘连成, 王聪, 董娟娥, 苏慧, 卓泽群, 薛雅馨. Ca^{2+} 在水杨酸诱发的丹参培养细胞培养基碱化过程中的作用[J]. 生物工程学报, 2013, 29(7): 986–997.
- [11] 刘菲, 魏芳芳, 王蕾, 刘辉, 梁元存, 刘爱新. 核黄素对烟草悬浮细胞活性氧和防卫反应的激活作用[J]. 中国农业科学, 2009, 42(12): 4175–4181.
- [12] Braut M, Amiar Z, Pennarun AM. Plasma membrane depolarization induced by abseisic acid in *Arabidopsis* suspension cells involves reduction of proton pumping in addition to anion channel activation, which ale both Ca^{2+} dependent[J]. *J Plant Physiol*, 2004, 135(1): 231–243.
- [13] Hao HP, Jiang CD, Shi L, Tang YD, Yao J, Li ZQ. Effects of root temperature on thermostability of photosynthetic apparatus in *Prunus mira* seedlings [J]. *Chin J Plant Ecol*, 2009, 33(5): 984–992.
- [14] 庞杰, 郝丽珍, 张凤兰, 赵鹏, 杨忠仁. 沙芥叶片活性氧和抗坏血酸对干旱胁迫的响应[J]. 植物生理学报, 2013, 49(1): 57–62.
- [15] Xiao Z, Dong FC, Gao JF, Song CP. Hydrogen peroxide-induced changes in intracellular pH of guard cells precede stomatal closure [J]. *Cell Res*, 2001, 11(1): 37–43.
- [16] Meijer HJ, Terriet B, Vanhimbergen JA. KCl activates phospholipase D at two different concentration ranges: distinguishing between hyperosmotic stress and membrane depolarization[J]. *Plant J*, 2002, 31(1): 51–59.
- [17] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 70–71.
- [18] 焦蒙丽, 曹蓉蓉, 陈红艳, 郝文芳, 董娟娥. 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[J]. 生物工程学报, 2012, 28(3): 320–328.
- [19] Chen MJ, Zhang CZ, Zi Q, Qiu DW, Liu WX, Zeng HM. A novel elicitor identified from *Magnaporthe oryzae* triggers[J]. *Plant Cell Rep*, 2014, 24(7): 166–174.
- [20] 陈红艳, 刘连成, 董娟娥, 夏广东. H_2O_2 参与水杨酸诱导丹参培养细胞中丹酚酸 B 合成的信号转导[J]. 生物工程学报, 2012, 28(7): 834–846.
- [21] 行冰玉, 党小琳, 张婧一, 汪波, 陈子逸, 董娟娥. 茉莉酸甲酯对丹参培养细胞中迷迭香酸生物合成及相关酶活性的影响[J]. 植物生理学报, 2013, 49(12): 1326–1332.
- [22] Li SW, Xue LG, Xu SJ. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings[J]. *Environ Exp Bot*, 2009, 65(1): 63–71.
- [23] 贺学勤, 张聪超. DMTU 对瓶插月季花瓣中抗氧化酶和蔗糖代谢酶活性的影响[J]. 作物杂志, 2013, 13(2): 91–95.
- [24] Okada M, Matsumura M, Ito Y. High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor [J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(5): 505–512.
- [25] Juan CC, Aurélien B, Pierre C, Patrick F, Pierre VC. Chitosan oligosaccharides modulate the supramolecular conformation and the biological activity of oligogalacturonides in *Arabidopsis* [J]. *Glycobiology*, 2010, 20(6): 775–786.
- [26] Andreas S, Claudia O. Modulation of plasma membrane H^+ -ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(2): 263–272.

(责任编辑: 刘艳玲)