

DOI:10.11913/PSJ.2095-0837.2022.30408

袁俊, 盛莎莎, 刘荣鹏, 王晓云. 镉胁迫对丹参生理特性和代谢特征的影响[J]. 植物科学学报, 2022, 40(3): 408-417

Yuan J, Sheng SS, Liu RP, Wang XY. Effects of cadmium on physiological characteristics and metabolic profiles of *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Plant Science Journal*, 2022, 40(3): 408-417

镉胁迫对丹参生理特性和代谢特征的影响

袁俊¹, 盛莎莎², 刘荣鹏², 王晓云^{2*}

(1. 江西中医药大学护理学院, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

摘要: 采用盆栽实验以及液相色谱-质谱联用技术, 对镉(Cd)胁迫下丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)的生理和代谢特征进行研究。结果显示: Cd胁迫下丹参根中的Cd、脯氨酸和可溶性蛋白含量均显著增加; 丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量显著下降; 还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)含量和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性变化不显著; 过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性显著下降, 但过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性显著增加。同时也发现丹参代谢物含量发生了变化, 共筛选出51个差异标志代谢物(主要是有机酸和氨基酸); L-脯氨酸和L-组氨酸的差异倍数(Fold change, FC)均大于2.5, 是上调较多的氨基酸; 3,4,5-三甲氧基苯甲酸和迷迭香酸FC值均大于5, 是上调较多的有机酸; Cd与差异标志代谢物(尤其是氨基酸和有机酸)呈显著正相关。研究结果说明丹参可积累一定量的Cd, 高浓度的Cd胁迫可引起丹参膜脂过氧化, 限制其抗氧化酶的活性, 影响其代谢过程。丹参主要通过调节氨基酸和有机酸代谢, 上调L-脯氨酸、L-组氨酸、3,4,5-三甲氧基苯甲酸和迷迭香酸抵御Cd胁迫。

关键词: 镉胁迫; 丹参; 生理特性; 代谢特征

中图分类号: Q945

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2022)03-0408-10

Effects of cadmium on physiological characteristics and metabolic profiles of *Salvia miltiorrhiza* Bunge

Yuan Jun¹, Sheng Sha-Sha², Liu Rong-Peng², Wang Xiao-Yun^{2*}

(1. School of Nursing, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. School of Pharmacy, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

Abstract: The effects of cadmium (Cd) on the physiological indices and metabolomics of *Salvia miltiorrhiza* Bunge were investigated by pot experiments. Results showed that Cd stress significantly enhanced Cd, proline, and soluble protein content, decreased malondialdehyde (MDA) content ($P < 0.05$), increased catalase (CAT) activity, and inhibited peroxidase (POD) activity, with GSH content and superoxide dismutase (SOD) activity showing no significant differences between the control and Cd stress group in *S. miltiorrhiza* roots. The metabolite profiles differed between the two groups, with 51 discriminating metabolites (mainly organic acids and amino acids) identified, which were mainly involved in amino acid and organic acid metabolism. The fold-change (FC) values of L-proline and L-histidine were greater than 2.5, and the FC values of 3,4,5-trimethoxybenzoic acid and rosmarinic acid were greater than 5, and they were the most up-regulated. There were significant positive

收稿日期: 2021-11-19, 修回日期: 2022-01-11。

基金项目: 江西中医药大学博士科研启动基金项目(2020BSZR011); 国家重点研发项目(2019YFC1712302)。

This work was supported by grants from the Scientific Research Foundation for Doctors of the Jiangxi University of Chinese Medicine (2020BSZR011) and National Key R&D Program of China (2019YFC1712302).

作者简介: 袁俊(1990-), 女, 博士, 副教授, 研究方向为药用植物资源保护和药用植物生态学(E-mail: yuanjun519@126.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wxy20052002@aliyun.com)。

correlations between Cd and the discriminating metabolites (especially amino acids and organic acids). These results revealed that *S. miltiorrhiza* accumulated a certain amount of Cd, and high levels of Cd stress led to peroxidation of membrane lipids, inhibition of antioxidant enzyme activities, and effects on the metabolomes of *S. miltiorrhiza*. Furthermore, *S. miltiorrhiza* resisted Cd stress mainly by regulating the metabolism of amino acids and organic acids, and up-regulating L-proline, L-histidine, 3,4,5-trimethoxybenzoic acid, and rosmarinic acid.

Key words: Cd stress; *Salvia miltiorrhiza*; Physiological characteristics; Metabolic profiles

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 属唇形科多年生草本植物, 生态适应能力较强, 广泛分布于我国华东、华北、中南、西南和西北的部分地区。在我国有 2000 多年的栽培种植历史^[1]。丹参是一味常用的传统中药材, 以干燥的根及根茎入药, 其主要活性成分是水溶性酚酸 (如原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸等) 和脂溶性丹参酮类物质 (如丹参酮 I、丹参酮 II A、隐丹参酮等), 具有抗炎、抗肿瘤、保护神经、保护心肌等作用, 其强大的保健养生治病功能得到人们的广泛认可^[2, 3]。以丹参为主要原料生产的丹参降脂丸、复方丹参片、丹参滴丸等多种中成药的需求量不断增加, 导致丹参市场需求量增加。随着荒山野地的开垦及药农连年超采, 丹参野生资源已呈现不足, 当前以人工栽培为主。

在工农业生产过程中, 废水、废渣的任意排放, 农药化肥的不合理使用及污水灌溉等行为致使超过环境承载量的污染物进入土壤, 造成了严峻的土壤污染问题^[4, 5]。2008 年国家环境保护部提供的数据显示, 我国受重金属镉 (Cd)、砷、铅等污染的耕地面积已达 2.0×10^7 hm², 约占总耕地面积的 20%^[6]。其中, Cd 是继汞和铅之后对环境危害最大的重金属, 是生物非必需金属元素, 在土壤中存在时间较长, 半衰期可达 15~1000 年^[7]。土壤中的 Cd 被植物吸收后会抑制植物生长, 改变植物代谢过程, 降低植物产量和质量。进入植物的 Cd 可通过食物链进入人体, 损伤人体脏器, 严重威胁人类健康^[8, 9]。因此, 植物 Cd 污染问题已引起研究者的广泛关注。

我国不同产地丹参存在一定的 Cd 污染现象^[10]。目前, 有关丹参的研究大都集中在主要活性成分 (如丹参酮、丹酚酸类化合物) 的合成, 栽培模式的选择及其药理作用等方面^[2, 11, 12]。这些

研究为深入挖掘丹参响应 Cd 胁迫的机制提供了丰富的理论基础。因此, 本研究以药用模式植物丹参为研究对象, 利用盆栽实验以及液相色谱-质谱联用 (LC-MS) 技术, 分析 Cd 胁迫对丹参生理指标和代谢的影响, 揭示 Cd 胁迫对丹参生理特性的影响及其响应 Cd 胁迫的代谢机制, 以期深入探究丹参响应重金属胁迫的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验设计

本研究所用丹参种苗来自山东平邑县丹参种植基地, 经江西中医药大学王晓宇副教授鉴定为丹参。随机将健康无病害丹参幼苗种于江西中医药大学神农园, 在种植区采集 0~20 cm 土壤, 风干过筛, 测定其基本理化性质。总氮、总磷和总钾含量分别为 0.30、0.28、27.15 g/kg; 有效氮、有效磷和速效钾含量分别为 0.01、0.01、0.08 g/kg; Cd 含量为 0.92 mg/kg, 低于在农业和林业生产中保障植物正常生长的 Cd 临界值 (1.0 mg/kg); pH 值为 4.6; 有机质含量为 1.97 g/kg。

将 CdCl₂ · 2.5H₂O (分析纯) 与超纯水配成水溶液, 与过筛土反复混匀, 配制成 Cd 浓度为 100 mg/kg 的基质后装入花盆 (直径 16 cm, 高 17 cm), 对照组未添加 Cd。每盆培养基质质量约 2 kg。土壤孵育 30 d, 将丹参幼苗 (已种植 30 d) 移栽到相应花盆中, 每盆 1 株苗, 对照组和处理组均 3 个重复, 每个重复 3 株苗。每周浇 1 次超纯水, 生长 30 d 后, 测定土壤、根和叶的 Cd 含量、丹参根生理指标和代谢组。

1.2 指标测定

1.2.1 Cd 含量测定

参照刘畅等^[13]的方法测定样本 Cd 含量。土

壤风干, 丹参根和叶经 65℃烘干后研磨, 土壤和丹参组织样品均过 2 mm 筛。将 0.2 g 样品放入聚四氟罐中, 加入硝酸和过氧化氢 (V/V=3:1) 混合液, 置于电热板上直至彻底消化, 冷却后用 2% 硝酸定容至 50 mL, 使用电感耦合等离子质谱仪 (ICP-MS, Thermo fisher 公司, 美国) 测定样品 Cd 含量。

1.2.2 生理指标测定

采用茚三酮比色法测定脯氨酸含量^[14]。称取待测样品 0.05 g, 加入 5 mL 3% 磺基水杨酸, 于沸水浴中提取 10 min, 提取液过滤后用蒸馏水定容于 25 mL 容量瓶中。吸取 2 mL 提取液至离心管中, 加入 2 mL 冰醋酸和 2 mL 酸性茚三酮, 置于沸水浴中加热 30 min。冷却至室温, 向各管中加入 4 mL 甲苯。在波长 520 nm 下, 使用紫外可见分光光度 (UV-8000, 上海元析) 测定吸光值。

采用考马斯亮蓝 G-250 法测定可溶性蛋白含量^[15]。将 0.05 g 鲜样放入盛有 2 mL 蒸馏水的研钵中, 研磨至匀浆后, 4000 r/min 离心 20 min, 取 0.1 mL 提取液于离心管, 加入 5 mL G-250 试剂, 在波长 595 nm 下测定各管的吸光值, 计算可溶性蛋白含量。

采用试剂盒法测定 MDA 和 GSH 含量及 SOD、CAT、POD 活性^[16]。实验所用试剂盒均购于苏州科铭生物技术有限公司。将 0.1 g 鲜样和 1 mL 提取液 (1:10, V/V) 在水浴中研磨, 于 8000 g 4℃ 下离心 10 min。按照说明书, 在 532 nm 和 600 nm 处测量上清液吸光度计算 MDA 含量, 在 412、560、240、470 nm 处测量上清液吸光度分别计算 GSH 含量及 SOD、CAT、POD 活性。

1.2.3 代谢组分析

代谢组的分析方法参照文献^[17]进行。称取 25 mg 样品, 加入 500 μ L 提取液 (甲醇:水=3:1, 含同位素标记内标混合物); 35 Hz 研磨 4 min, 超声 5 min, 于 -40℃ 静置 1 h。之后将样品 4℃ 离心 15 min。取上清液上机检测, 所有样品另取等量上清液混合成 QC 样品上机检测。使用超高效液相色谱仪 (Vanquish, Thermo fisher 公司, 美国) 联用四极杆-轨道阱混合型 TM 质谱仪 (Q Exactive HF-X, Thermo fisher 公司, 美国), 通过 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m) 液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为水相, 含 5 mmol/L 乙酸铵和

5 mmol/L 乙酸, B 相为乙腈。采用梯度洗脱 (0 ~ 0.7 min, 1% B; 0.7 ~ 9.5 min, 1% ~ 99% B; 9.5 ~ 11.8 min, 99% B; 11.8 ~ 12.0 min, 99% ~ 1% B; 12 ~ 14.8 min, 1% B), 柱温为 35℃, 样品盘温度为 4℃, 进样体积 3 μ L, 进样速度为 0.5 mL/min。

原始代谢组数据经 ProteoWizard 软件转成 mzXML 格式后, 进行峰识别、峰提取、峰对齐和积分等处理, 匹配类型包括二级正向匹配、二级反向匹配、一级匹配等, 匹配时主要使用质核比 (m/z) 和保留时间 (RT) 匹配。二级质谱匹配定性打分值。打分值越接近于 1, 代表匹配结果可信度越高, 一级质谱匹配得出的物质名称。然后与质谱数据库匹配进行物质注释, 算法打分的 Cutoff 值设为 0.3。然后进行原始数据的预处理和过滤, 缺失值处理和归一化处理。正离子模式原始数据经过预处理后 1111 个峰被保留, 负离子模式的原始数据经过预处理后 305 个峰被保留。接下来便对数据进行后续分析。

1.3 数据分析

首先, 运用 *t*-text, 分析对照组和胁迫组土壤和丹参 Cd 含量, 丹参脯氨酸、MDA、可溶性蛋白和 GSH 含量, SOD、CAT 和 POD 活性及代谢物含量的差异。

其次, 运用无监督的主成分分析 (Principal component analysis, PCA), 观察对照组和 Cd 处理组样本的离散情况。运用有监督的偏最小二乘判别分析 (Partial least squares discrimination analysis, PLS-DA), 分析土壤添加 Cd 对丹参根代谢物的影响。为防止 PLS-DA 模型过拟合, 采用交叉验证残差的方差检验 (CV-ANOVA test) 及 200 倍排列检验对其进行检验。CV-ANOVA test 中 $P < 0.05$ 或排列检验中的 $R^2 > 0.7$ 和 $Q^2 > 0.4$, 表明 PLS-DA 模型可靠。基于 PLS-DA 模型获得变量投影重要性值 (VIP)。根据 VIP, P 值及代谢物的差异倍数 (Fold change, FC) 筛选出对照组和胁迫组的差异标志代谢物。筛选标准为 $VIP > 1$ 、 $P < 0.01$ 且 $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.05$ 。运用在线软件 MetaboAnalyst 4.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/faces/ModuleView.xhtml>) 对鉴定出的差异标志代谢物进行代谢通路权重分析。最后, 对差异标志代谢物和丹参根 Cd 含量之间进行 Pearson

相关性分析。

PCA、PLS-DA 和 PLS-DA 模型检验均使用软件 SIMCA-P 14.1 进行分析；*t* 检验和 Pearson 相关性分析使用软件 IBM SPSS Statistics 20.0 进行分析；使用 OriginPro 8.0 和 Excel 2007 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 Cd 胁迫下土壤和丹参积累 Cd 的分析

本研究发现，与对照相比，Cd 胁迫组土壤及丹参根和叶的 Cd 含量极显著增加 ($P < 0.001$)。其中 Cd 含量在土壤中增加了 956 倍，在丹参根和叶中分别增加了 332 倍和 310 倍。对照组土壤及丹参根和叶中只检测到极微量的 Cd(表 1)。

2.2 Cd 胁迫下丹参生理指标的变化

Cd 胁迫下丹参根脯氨酸和可溶性蛋白均显著增加 ($P < 0.05$)；MDA 含量显著下降；GSH 和 SOD 活性没有显著变化，但 CAT 活性显著增加；POD 活性显著下降(表 2)。

2.3 Cd 胁迫对丹参代谢组的影响

本研究共鉴定出 305 个代谢物，其中 193 个上调，112 个下调(图 1：A，附表 1¹⁾)。通过 PCA 分析发现样本基本处于 95%置信区间内，样本点分离清晰，对照组和胁迫组样本可清晰地区分

开(图 1：B)。两组样本 PLS-DA 模型的 7 次循环交互验证分析结果显示该模型可靠，可将对照组和胁迫组样本清晰地分开(图 2)。

根据 PLS-DA 获得 VIP 值，结合 *t* 检验 *P* 值和代谢物的 FC 值($VIP > 1$ ， $P < 0.01$ 且 $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.05$)，共筛选出 51 个差异标志代谢物(图 3)。这些差异标志代谢物主要是有机酸和氨基酸类物质。其中，氨基酸全部上调，L-脯氨酸和 L-组氨酸上调较多，其 FC 值均大于 2.5；大部分有机酸上调，3,4,5-三甲氧基苯甲酸和迷迭香酸上调较多，其 FC 值均大于 5(图 3，附表 1¹⁾)。

基于差异标志代谢物的通路拓扑结构分析和通路富集分析结果，筛选出潜在的目标代谢通路，即代谢通路影响值(Pathway impact, Pi)大于 0.1 的代谢通路^[17, 18]。通过分析发现差异标志代谢物主要富集在氨基酸代谢(苯丙氨酸代谢、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢；精氨酸和脯氨酸代谢；苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成；丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢和酪氨酸代谢)、泛酸和辅酶 A 生物合成、谷胱甘肽代谢和乙醛酸和二羧酸代谢(图 4，附表 2²⁾)。通过皮尔逊相关性分析，发现丹参根 Cd 含量与氨基酸和大部分有机酸呈显著正相关 ($P < 0.01$)(附表 3³⁾)。

表 1 镉胁迫下土壤和丹参的 Cd 含量
Table 1 Changes in Cd content in soil and *Salvia miltiorrhiza* roots and leaves under Cd stress

组别 Group	土壤 Cd / mg/kg Soil	根 Cd / mg/kg Roots	叶 Cd / mg/kg Leaves
对照组 CK	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
胁迫组 TT	47.85 ± 1.39 ***	16.66 ± 0.47 ***	15.53 ± 0.36 ***

注：所有数据为平均数 ± 标准误($n = 3$)；***, $P < 0.001$ 。下同。
Note: All data are presented as mean ± SE ($n = 3$). Same below.

表 2 镉胁迫下丹参根的生理指标
Table 2 Changes in physiological indices in *Salvia miltiorrhiza* roots under Cd stress

组别 Group	脯氨酸 / μg/g Proline	丙二醛 / nmol/g MDA	可溶性蛋白 / mg/g Soluble protein	GSH / μmol/g	抗氧化酶 Antioxidant enzyme		
					SOD / U/g	CAT / nmol · min ⁻¹ · g ⁻¹	POD / U/g
对照组 CK	530.56 ± 16.18	16.80 ± 1.58	8.83 ± 0.14	0.18 ± 0.02	639.52 ± 32.61	51.90 ± 0.93	2450.90 ± 103.78
胁迫组 TT	709.09 ± 16.96 **	11.45 ± 0.758 *	9.82 ± 0.11 **	0.11 ± 0.02	660.09 ± 12.30	106.26 ± 6.66 **	1457.43 ± 52.80 **

Notes: *, $P < 0.05$; **, $0.001 < P < 0.01$.

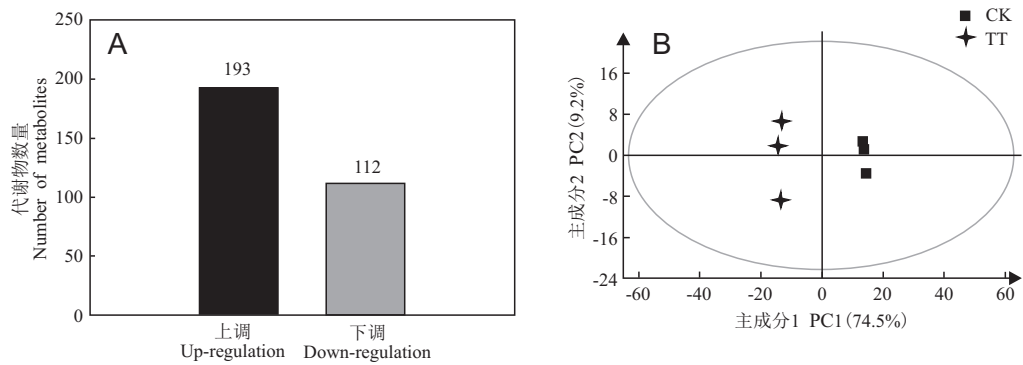
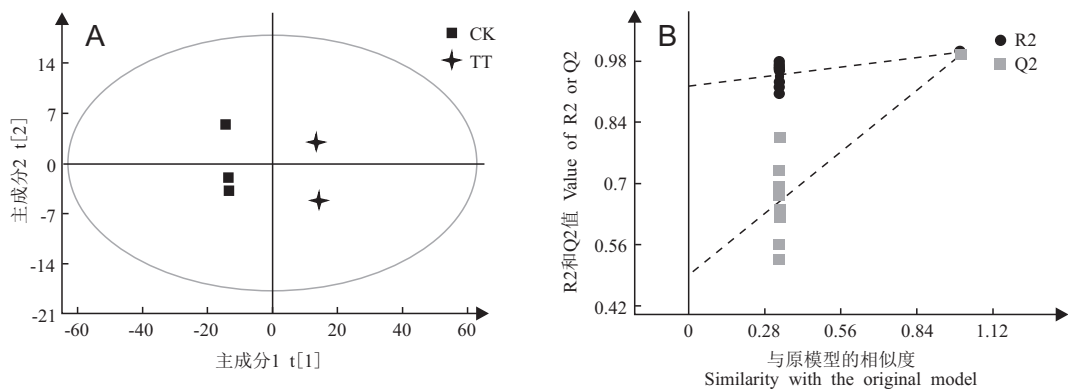


图 1 对照组和胁迫组代谢物变化 (A) 和 PCA 得分图 (B)
Fig. 1 Changes in identified metabolites (A) and PCA score for metabolomic data (B) of *Salvia miltiorrhiza* roots in control and Cd stress groups



R2 表示模型对变量解释度；Q2 表示模型的预测能力。
R2 and Q2 represent explanatory degree of model to variables and prediction ability of model, respectively.

图 2 对照组和胁迫组丹参 PLS-DA 得分图 (A) 和 PLS-DA 模型验证 (B)
Fig. 2 PLS-DA score (A) and permutation test results of PLS-DA models (B) for metabolomic data of *Salvia miltiorrhiza* roots in control and Cd stress groups

3 讨论

3.1 Cd 胁迫严重影响了丹参生理特性

Cd 是对环境危害较大的重金属，可干扰植物正常的生理状态，影响植物生长。Cd 具有强烈的生物蓄积性，高度的生物有效性和强烈的生物毒性，易从土壤迁移到植物^[7, 18]。当生长基质 Cd 含量增加，植物体内 Cd 积累量相应增加。因此，在本研究中，胁迫组丹参组织 Cd 含量极显著高于对照组。这与张鑫等^[19]的研究结果一致，即当栽培基质 Cd 含量增加时，丹参会增加对 Cd 的吸收。此外，植物受 Cd 胁迫程度与植物体内 Cd 积累量密切相关，不同植物耐 Cd 胁迫能力差异较大^[20-23]。本研究中，土壤残留 Cd 量约是丹参组织 Cd 增加量的 3 倍，这在一定程度上说明本研究所设置的 Cd 处理水平 (100 mg/kg) 超出了丹参对 Cd

的富集能力，会对丹参造成伤害。本研究中，胁迫组 POD 活性显著低于对照组也说明了这点 (表 2)。

Cd 进入植物体内后，可通过电子传递链，诱导植物产生大量活性氧自由基 (包括 H_2O_2 、 $O_2^{\cdot-}$ 和 OH^{\cdot})^[24]。当活性氧自由基在植物体内积累到一定程度便会对植物产生毒害作用，破坏细胞超微结构、增加膜脂过氧化程度、提高可溶性蛋白含量等^[20, 25, 26]。在逆境条件下，脯氨酸是植物积累的一种有机渗透调节物质，可溶性蛋白可表征植物抗逆性强弱^[27, 28]。本研究中，100 mg/kg Cd 胁迫 30 d 后，丹参根脯氨酸和可溶性蛋白含量显著增加，说明 Cd 胁迫加剧了丹参根的膜脂过氧化。张鑫等^[19]使用 50 mg/kg Cd 胁迫丹参 30 d 后及王川等^[29]利用 100 mg/kg Cu 胁迫丹参 30 d 后，得出相同结论。但作为植物膜脂过氧化程度的重要指标之一的 MDA 含量显著下降。杨叶萍等^[23]运用高浓

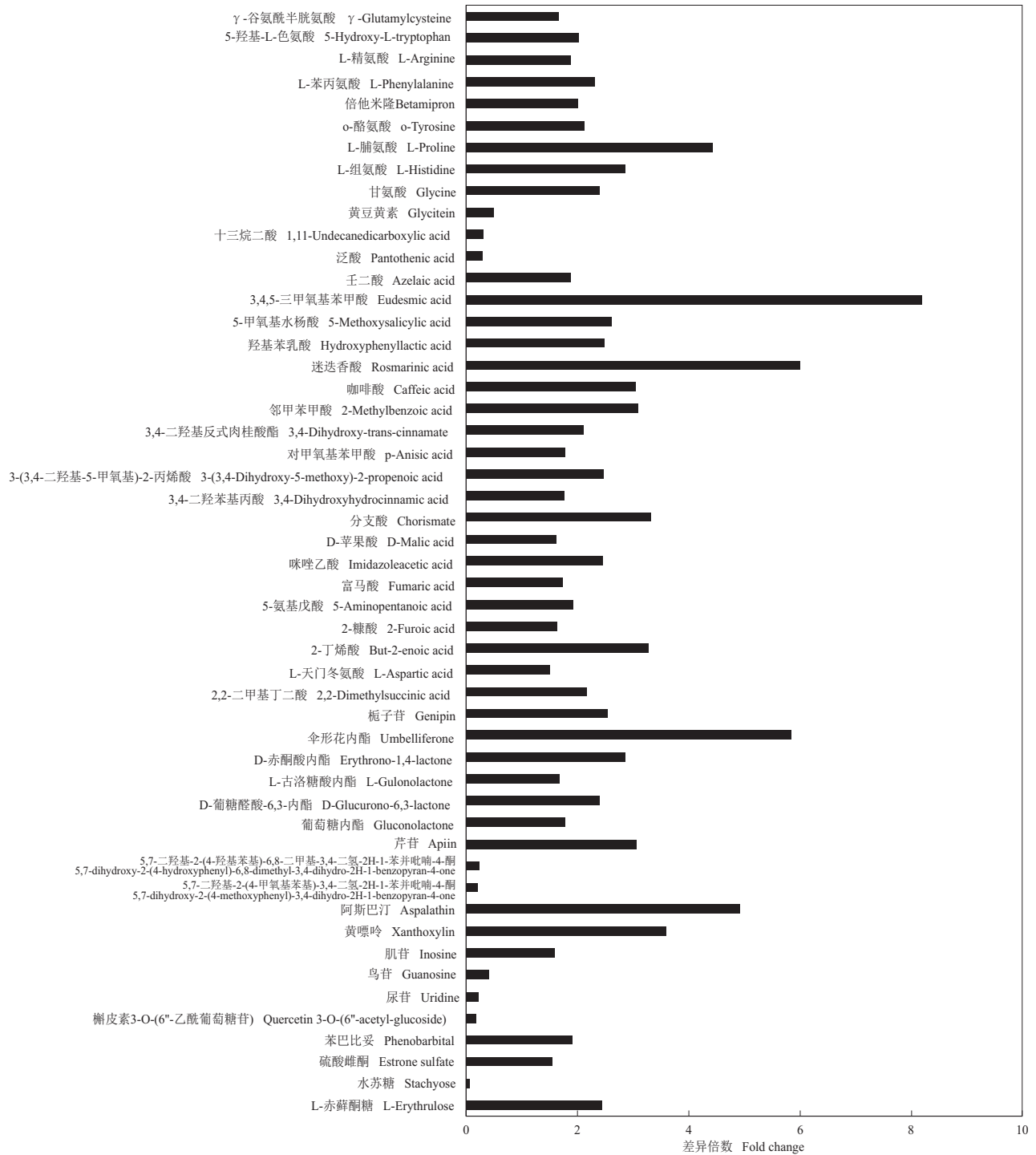


图 3 对照组和胁迫组丹参根间的差异标志代谢物

Fig. 3 Variation in discriminating metabolites of *Salvia miltiorrhiza* roots between control and Cd stress groups

度 Cd (≥ 60 mg/L) 胁迫苳麻 (*Boehme-ria nivea* L.) 49 d 后, 其根 MDA 含量也显著下降。这可能是由植物组织保护酶等的调节作用暂时修复其生理功能引起的^[30]。

高浓度 Cd 胁迫降低了丹参抗氧化酶活性。通

过抗氧化酶(SOD、CAT 和 POD)清除由重金属胁迫产生的活性氧自由基是植物应对重金属胁迫的保护机制之一^[31, 32]。本研究中, 与对照相比, 胁迫组丹参 GSH 含量和 SOD 活性并没有显著变化, CAT 活性显著增加, 但 POD 活性显著下降。这是

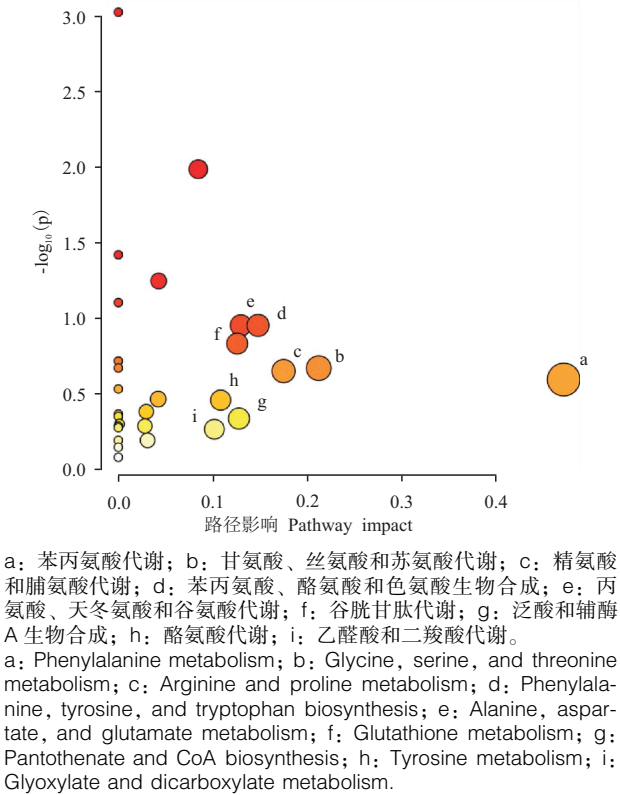


图 4 对照组和胁迫组丹参根差异标志代谢物的代谢通路权重分析

Fig. 4 Weight analysis of metabolic pathways (MetPA) of discriminating metabolites in *Salvia miltiorrhiza* roots between control and Cd stress groups

因为低浓度重金属胁迫可增强植物抗氧化酶活性，SOD 催化 $O_2^{\cdot -}$ 转化为 H_2O_2 和 O_2 ，POD 则催化可对细胞膜造成氧化损伤的 H_2O_2 生成无毒害的 H_2O 和 O_2 ，避免自由基对植物造成氧化伤害，但高浓度重金属胁迫可抑制抗氧化酶活性，引起活性氧自由基在植物体内的积累，对植物产生损害^[33, 34]。谢勇等^[35]通过研究发现与本研究类似的现象，即与对照组相比，高浓度重金属胁迫组的木榄 (*Bruguiera gymnorhiza* L.) 和角果木 (*Ceriops tagal* Perr.) POD 活性和 SOD 活性均没有显著变化。但高浓度 Cd (10 μ mol/L) 均对三七 (*Panax notoginseng* Burk.) 根 SOD、POD 和 CAT 活性产生抑制作用^[36]；高浓度 Cd (15 mmol/L) 均对黄芪 (*Astragalus membranaceus* Bge.) 根 SOD、POD 和 CAT 活性产生促进作用。这是因为重金属胁迫下，植物抗氧化还原酶系中各种酶的活性变化规律与重金属的作用剂量、作用时间和植物种类有关^[37]。

3.2 丹参主要通过调节氨基酸和有机酸代谢应对 Cd 胁迫

Cd 可影响丹参代谢过程。过多的重金属被植物吸收后，会严重影响植物体正常的生理功能 (如光合作用、呼吸作用及水和营养物的摄取)，引起植物代谢过程的变化^[38–40]。因此，本研究中，根据代谢组数据的 PCA 和 PLS-DA 分析，胁迫组和对照组丹参根样本可显著区分开；与对照组相比，胁迫组丹参根存在 193 个上调代谢物和 112 个下调代谢物，从中可筛选出 51 个差异标志代谢物。这是因为 Cd 胁迫可影响植物代谢过程中关键酶基因的表达，影响代谢过程中关键酶的合成，进而影响代谢过程^[41, 42]。已有研究表明，非生物胁迫 (如干旱、盐、脱落酸、重金属) 可影响丹参基因 (如 *SmGGPPS*、*SmNAC1* 等) 表达，也可影响关键酶的合成，进而影响其物质代谢过程^[19, 29, 43–45]。

丹参主要调节氨基酸和有机酸代谢响应高浓度 Cd 胁迫。本研究中，Cd 胁迫促使丹参根合成更多的氨基酸和有机酸，其响应 Cd 胁迫的代谢途径主要是氨基酸代谢和有机酸代谢，根 Cd 与差异标志代谢物呈显著正相关。已有研究表明，高浓度 Cd (3.0 mg/L) 胁迫抑制水稻 (*Oryza sativa* L.) 分泌氨基酸 (谷氨酸、丝氨酸、天门冬氨酸等) 和有机酸 (草酸和苹果酸等)^[46]。麦瓶草 (*Silene cucubalus* L.) 在 Cd 胁迫下，谷氨酸等氨基酸含量呈下降趋势，但有机酸 (如苹果酸和醋酸盐) 呈上升趋势^[47]。这与本研究发生变化的氨基酸和有机酸种类不同。可能是由于研究使用的检测方法不同导致，也与不同物种对 Cd 的积累能力及抗 Cd 胁迫能力不同有关^[20]。

丹参主要上调 L-脯氨酸、L-组氨酸及 3,4,5-三甲氧基苯甲酸、迷迭香酸应对高浓度镉胁迫。在本研究中，胁迫组丹参根 L-脯氨酸和 L-组氨酸含量均为对照组的 2.5 倍以上，而 3,4,5-三甲氧基苯甲酸和迷迭香酸含量均为对照组的 5 倍以上。研究表明，脯氨酸和组氨酸既具有渗透调节能力，又具有重金属螯合能力，在植物应对重金属胁迫中发挥重要作用^[28, 48]。迷迭香酸和 3,4,5-三甲氧基苯甲酸分别是酚酸类物质和酚酸类物质衍生物，可清除生物体内羟基自由基，具有抗氧化功能^[49, 50]。

胡雪萍^[51]通过气相色谱-质谱联用仪分析发现，

500 $\mu\text{mol/L}$ Cd 胁迫下, 水稻叶片的脯氨酸含量增加, 但并没有检测到 3,4,5-三甲氧基苯甲酸和迷迭香酸。谭飘飘^[52] 基于 LC-MS 分析发现, 80 $\mu\text{mol/L}$ Cd 胁迫 7 d 后, 芥菜 (*Brassica juncea* L.) 根组氨酸增加, 但并没有检测到脯氨酸及 3,4,5-三甲氧基苯甲酸和迷迭香酸的变化。这与本研究结果不一致, 可能是由于这些研究与本研究所用 Cd 胁迫浓度、植物种类及分析方法不同所造成。本研究采用茚三酮比色法测定两组丹参根脯氨酸含量, 发现胁迫组脯氨酸含量仅是对照组的 1.3 倍。本研究中脯氨酸 FC 值的差异可能由测量方式不同引起。

4 结论

Cd 是植物非必需元素, 进入植物体内会影响其生理特性和代谢特征。100 mg/kg Cd 胁迫可显著升高丹参组织(根和叶)Cd 含量及根脯氨酸和可溶性蛋白含量, 降低根 MDA 含量和 POD 活性, 增加根 CAT 活性, 但对照组和胁迫组丹参根 GSH 含量和 SOD 活性没有显著差异, 说明丹参可积累一定量的 Cd。本研究采用的胁迫浓度(100 mg/kg)引起了丹参根膜质过氧化, 降低其抗氧化酶活性。此外, 通过筛选发现对照组和胁迫组丹参根的差异标志代谢物有 51 种, 主要是氨基酸和有机酸, 其中 L-脯氨酸和 L-组氨酸是上调较多的氨基酸; 3,4,5-三甲氧基苯甲酸和迷迭香酸是上调较多的有机酸。这些差异标志代谢物说明 Cd 胁迫影响了丹参根的代谢, 丹参主要通过调节氨基酸和有机酸代谢, 上调 L-脯氨酸、L-组氨酸及 3,4,5-三甲氧基苯甲酸、迷迭香酸应对 Cd 胁迫。

参考文献:

- [1] 刘瑞振. 野生丹参种质资源遗传与形态多样性初步研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2017: 1-10.
- [2] Chen B, Huang C, Zhang Y, Tang X, Li S, *et al.* *Salvia bowleyana* Dunn root is a novel source of salvianolic acid B and displays antitumor effects against gastric cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(1): 817-827.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 76.
- [4] Vareda JP, Valente AJM, Durães L. Assessment of heavy metal pollution from anthropogenic activities and remediation strategies: a review[J]. *J Environ Manage*, 2019, 246: 101-118.
- [5] Qin G, Niu Z, Yu J, Li Z, Ma J, Xiang P. Soil heavy metal pollution and food safety in China: effects, sources and removing technology[J]. *Chemosphere*, 2021, 267: 129205.
- [6] 环境保护部, 国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报[R/OL]. (2014-04-17) [2022-05-16]. http://www.zhb.gov.cn/gkml/hbb/qt/201404/t20140417_270670.htm.
- [7] Friberg LT, Elinder GG, Kjellstrom T, Nordberg GF. Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal[M]. Boca Raton: CRC Press, 2019: 240-390.
- [8] Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The effects of cadmium toxicity[J]. *Int J Env Res Pub He*, 2020, 17(11): 3782.
- [9] Shahid M, Dumat C, Khalid S, Niazi NK, Antunes PMC. Cadmium bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system[J]. *Rev Environ Contam T*, 2017, 241: 73-137.
- [10] 赵连华, 杨银慧, 胡一晨, 杨世海, 金红宇, 等. 我国中药材中重金属污染现状分析及对策研究[J]. *中草药*, 2014, 45(9): 1199-1206.
Zhao LH, Yang YH, Hu YC, Yang SH, Jin HY, *et al.* Current situation analysis and countermeasures on contamination of heavy metal in traditional Chinese medicinal materials in China[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(9): 1199-1206.
- [11] Fu R, Shi M, Deng C, Zhang Y, Zhang X, *et al.* Improved phenolic acid content and bioactivities of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by genetic manipulation of RAS and CYP98A14[J]. *Food Chem*, 2020, 331(7): 127365.
- [12] Xia P, Hu W, Liang T, Yang D, Liang Z. An attempt to establish an *Agrobacterium*-mediated transient expression system in medicinal plants[J]. *Protoplasma* 2020, 257(6): 1497-1505.
- [13] 刘畅, 徐应明, 黄青青, 陶雪莹, 王林, 等. 不同冬小麦品种镉富集转运及离子组特征差异[J]. *环境科学*, 2021, 43(3): 1597-1605.
Liu C, Xu YM, Huang QQ, Tao XY, Wang L, *et al.* Variations in cadmium accumulation and transport and ionic traits among different winter wheat varieties[J]. *Environmental Science*, 2021, 43(3): 1597-1605.
- [14] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006: 196-204.
- [15] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 164-165.
- [16] 赵莉, 周炎, 汪海燕, 史宏志, 赵世民, 等. 干旱处理下不同烤烟品系的生理差异研究[J]. *核农学报*, 2019, 33(3): 607-615.
Zhao L, Zhou Y, Wang HY, Shi HZ, Zhao SM, *et al.* Research on the differential physiological responses in different flue-cured tobacco lines under drought stress[J].

- Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(3): 607–615.
- [17] Wei X, Cao P, Wang G, Han J. Microbial inoculant and garbage enzyme reduced cadmium (Cd) uptake in *Salvia miltiorrhiza* (Bge.) under Cd stress[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2020, 192(3): 110311.
- [18] Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, Haswell-Elkins M, Reilly PEB, *et al.* A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population[J]. *Toxicol Lett*, 2003, 137(1–2): 65–83.
- [19] 张鑫, 李昆伟, 陈康健, 梁健, 崔浪军. 镉胁迫对丹参生长及有效成分积累的影响研究[J]. *植物科学学报*, 2013, 31(6): 583–589.
- Zhang X, Li KW, Chen KJ, Liang J, Cui LJ. Effects of cadmium stress on seedlings growth and active ingredients in *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Plant Science Journal*, 2013, 31(6): 583–589.
- [20] 尚玉坤, 刘思凯, 陈杨晗, 刘颢, 唐学博, 等. 镉胁迫对东营野生大豆幼苗抗氧化系统及可溶性蛋白的影响[J]. *四川农业大学学报*, 2019, 37(1): 15–21.
- Shang YK, Liu SK, Chen YH, Liu L, Tang XB, *et al.* Effects of antioxidant system and soluble protein in Dongying wild soybean seedling under cadmium stress[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2019, 37(1): 15–21.
- [21] 韦朝阳, 陈同斌. 重金属超富集植物及植物修复技术研究进展[J]. *生态学报*, 2001, 21(7): 1196–1203.
- Wei ZY, Chen TB. Hyperaccumulators and phytoremediation of heavy metal contaminated soil: a review of studies in China and abroad[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, 21(7): 1196–1203.
- [22] Hegedüs A, Erdei S, Janda T, Tóth E, Horváth G, Dudits D. Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldehyde/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress[J]. *Plant Sci*, 2004, 166(5): 1329–1333.
- [23] 杨叶萍, 简敏菲, 余厚平, 龚秋林, 陈勇玲. 镉胁迫对苧麻 (*Boehmeria nivea*) 根系及叶片抗氧化系统的影响[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(4): 184–193.
- Yang YP, Jiang MF, Yu HP, Gong QL, Chen YL. Influence on the antioxidant system in roots and leaves of *Boehmeria nivea* under different cadmium stress[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(4): 184–193.
- [24] 张然然, 张鹏, 都韶婷. 镉毒害下植物氧化胁迫发生及其信号调控机制的研究进展[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(3): 981–992.
- Zhang RR, Zhang P, Dou ST. Oxidative stress-related signals and their regulation under Cd stress: a review[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(3): 981–992.
- [25] Wang HR, Che YH, Huang D, Ao H. Hydrogen sulfide mediate alleviation of cadmium toxicity in *Phlox paniculata* L. and establishment of a comprehensive evaluation model for corresponding strategy[J]. *Int J Phytoremediat*, 2020, 22(10): 1085–1095.
- [26] 朱润华, 贺忠群, 王海霞, 白胜, 阳圣莹, 蒋浩宏. 镉胁迫处理对水培苦苣幼苗生理响应及叶片超微结构的影响[J]. *西南农业学报*, 2021, 34(6): 1302–1308.
- Zhu RH, He ZQ, Wang HX, Bai S, Yang SY, Jiang HH. Effects of cadmium stress on physiological response and leaf ultrastructure of hydroponic *Cichorium endivia* L. seedling[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 34(6): 1302–1308.
- [27] 赵胡, 唐俊, 郑文教. 重金属 Cu^{2+} 胁迫对红树植物秋茄幼苗生长及某些生理特性的影响[J]. *海洋科学*, 2016, 40(4): 65–72.
- Zhao H, Tang J, Zheng WJ. Growth and physiological characteristics of *Kandelia obovata* seedlings under Cu^{2+} stress[J]. *Marine Sciences*, 2016, 40(4): 65–72.
- [28] Furlan AL, Bianucci E, Giordano W, Castro S, Becker DF. Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants[J]. *Plant Physiol Bioch*, 2020, 151: 566–578.
- [29] 王川, 李昆伟, 魏宇昆, 崔浪军, 李发荣. Cu^{2+} 胁迫对丹参生长及有效成分积累的影响[J]. *植物研究*, 2012, 32(1): 124–128.
- Wang C, Li KW, Wei YK, Cui LJ, Li RF. Effects of copper stress on seedlings growth and active ingredients of *Salvia miltiorrhiza*[J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2012, 32(1): 124–128.
- [30] Rafael C, Joaquín M, Julio S. Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(39): 16475–16480.
- [31] Srivastava S, Tripathi RD, Dwivedi UN. Synthesis of phytochelatins and modulation of antioxidants in response to cadmium stress in *Cuscuta reflexa*-an angiospermic parasite[J]. *J Plant Physiol*, 2004, 161(6): 665–674.
- [32] Sozoniuk M, Nowak M, Dudziak K, Bulak P, Kowalczyk K. Antioxidative system response of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) seedlings to Cd exposure[J]. *Physiol Mol Biol Pla*, 2019, 25(6): 1377–1384.
- [33] Yan H, Filardo F, Hu XT, Zhao XM, Fu DH. Cadmium stress alters the redox reaction and hormone balance in oilseed rape (*Brassica napus* L.) leaves[J]. *Environ Sci Pollut R*, 2016, 23(4): 3758–3769.
- [34] 赛闹汪青, 张牡丹, 马小俊, 冉瑞兰, 贾凌云, 冯汉青. 镉胁迫对黄芪幼苗的生理学影响及凹凸棒粘土对镉胁迫缓解作用的研究[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(15): 3115–3126.
- Sainao WQ, Zhang MD, Ma XJ, Ran RL, Jia LY, Feng

- HQ. Physiological effects of cadmium stress on *Astragalus membranaceus* seedlings and alleviative effects of attapulgite clay on cadmium stress [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2018, 43(15): 3115–3126.
- [35] 谢勇, 王友绍. 重金属胁迫下四种红树植物幼苗生理响应特征[J]. *热带海洋学报*, 2021.
- Xie Y, Wang YS. Physiological response characteristics of four mangrove plants seedlings under heavy metal stress [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2021.
- [36] 李子唯. 三七对重金属镉的富集效应及其生理机制研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2017: 31–36.
- [37] 卢倩云, 曹宇琴, 陈友明, 晏琼. 镉胁迫下油菜毛状根的生理响应及铁钾含量[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(6): 1382–1389.
- Lu QY, Cao YM, Chen YM, Yan Q. The physiological response and iron and potassium contents in the hairy roots of *Brassica rape* L. under cadmium stress [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(6): 1382–1389.
- [38] Sharma SS, Dietz KJ. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance [J]. *Trends Plant Sci*, 2009, 14(1): 50.
- [39] Kim YH, Khan AL, Kim DH, Lee SY, Kim KM, *et al*. Silicon mitigates heavy metal stress by regulating P-type heavy metal ATPases, *Oryza sativa* low silicon genes, and endogenous phytohormones [J]. *BMC Plant Biol*, 2014, 14(1): 13.
- [40] 赵园园. 硒对镉胁迫下油菜生长及根部镉响应的调控[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019: 17–31.
- [41] 何其浩, 周韬, 孙吉康, 王平, 白垒, 刘志明. 镉胁迫对栎树幼苗不同组织部位转录组差异研究[J]. *环境科学学报*, 2021, 42(3): 1–15.
- He QH, Zhou T, Sun JK, Wang P, Bai L, Liu ZM. Effect of cadmium stress on transcriptome differences in roots and leaves of *Koeleria paniculata* seedlings [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 42(3): 1–15.
- [42] 范卫芳. 镉胁迫下绢毛委陵菜转录组分析及PsMYB2 转录因子功能初步研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021: 11–19.
- [43] Liu YC, Ma W, Niu JF, Li B, Zhou W, *et al*. Systematic analysis of SmWD40s, and responding of SmWD40-170 to drought stress by regulation of ABA- and H₂O₂-induced stomatal movement in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 153: 131–140.
- [44] Wei T, Deng K, Gao Y, Liu Y, Yang M, *et al*. *Arabidopsis* DREB1B in transgenic *Salvia miltiorrhiza* increased tolerance to drought stress without stunting growth [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 104: 17–28.
- [45] Ali F, Qanmber G, Wei Z, Yu D, Li Y, *et al*. Genome-wide characterization and expression analysis of geranylgeranyl diphosphate synthase genes in cotton (*Gossypium* spp.) in plant development and abiotic stresses [J]. *BMC Plant Biol*, 2020, 21: 561.
- [46] 唐杰, 徐浩洋, 王昌全, 王玉云, 李冰, 曹淋海. 镉胁迫对3个水稻品种(系)根系生长及有机酸和氨基酸分泌的影响[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2016, 42(2): 118–124.
- Tang J, Xu HY, Wang CQ, Wang YY, Li B, Cao LH. Effect of cadmium stress on root growth and organic acids and amino acid secretion of three rice varieties [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2016, 42(2): 118–124.
- [47] Bailey NJ, Owen M, Holmes E, Nicholson JK, Zenk MH. Metabolomic analysis of the consequences of cadmium exposure in *Silene cucubalus* cell cultures via ¹H NMR spectroscopy and chemometrics [J]. *Phytochemistry*, 2003, 62(6): 851–858.
- [48] 梁昕昕, 辛亚平, 贾雪, 闫兴富, 魏玉清, 赵会君. 宁夏枸杞幼苗叶片中抗氧化酶及游离氨基酸对镉胁迫的响应[J]. *生态毒理学报*, 2021, 16(6): 222–233.
- Liang XX, Xin YP, Jia X, Yan XF, Wei YQ, Zhao HJ. Response of antioxidative enzymes activities and amino acids concentrations in leaf tissues of *Lycium barbarum* L. seedlings under cadmium stress [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, 16(6): 222–233.
- [49] Manquión-Cerda K, Escudey M, Zúñiga G, Arancibia-Miranda N, Molina M, Cruces E. Effect of cadmium on phenolic compounds, antioxidant enzyme activity and oxidative stress in blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plantlets grown in vitro [J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 2016, 133: 316–326.
- [50] Baranauskaite J, Sadauskiene I, Liekis A, Kasauskas A, Lazauskas R, *et al*. Natural compounds rosmarinic acid and carvacrol counteract aluminium-induced oxidative stress [J]. *Molecules*, 2020, 25(8): 1807.
- [51] 胡雪萍. 水稻响应镉胁迫代谢组学研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2019: 19–24.
- [52] 谭飘飘. 芥菜对镉胁迫的生理代谢响应及外源脯氨酸的调控作用研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2021: 35–65.

(责任编辑: 周 媛)