

· 中药农业 ·

基于伤害诱导的龙血竭形成过程中信号分子变化规律研究[△]

薛宇¹, 宋美芳², 张越², 张忠廉^{2*}, 张丽娟^{1*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193;

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所 云南分所, 云南 景洪 666100

[摘要] 目的: 测定龙血竭形成过程中, 过氧化氢(H_2O_2)、水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ETH)和一氧化氮(NO)五种信号分子的浓度变化规律, 筛选影响龙血竭形成的主要信号分子, 为进一步深入研究龙血竭形成机制提供依据。**方法:** 以剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis*、柬埔寨龙血树 *Dracaena cambodiana* 为研究对象, 采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定 H_2O_2 、SA、JA、ETH、NO 五种信号分子在龙血竭形成过程中的浓度变化规律。**结果:** 整体来看, 5 种信号分子在龙血树伤害诱导后, H_2O_2 、SA、JA、NO 浓度变化呈先上升后下降的趋势, 而 ETH 浓度变化呈先下降后上升后再下降的趋势。其中 SA 浓度变化最大。此外, 就两种龙血树的响应速度来说, 剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 响应速度较快。**结论:** 5 种信号分子在龙血竭形成过程中均起到不同程度的作用, 且相互作用, 形成一个复杂的信号系统。

[关键词] 龙血竭; 信号分子; 酶联免疫吸附测定; 过氧化氢; 水杨酸

[中图分类号] R28; Q503 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)05-0642-08

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20190211006

Study on Signaling Molecules Concentration Change during Process of Resina Draconis by Injury Induced

XUE Yu¹, SONG Mei-fang², ZHANG Yue², ZHANG Zhong-lian^{2*}, ZHANG Li-juan^{1*}

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Yunnan Branch of Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Jinghong 666100, China

[Abstract] **Objective:** To provide an evidence for the study of the formation of Resina Draconis in the future. **Methods:** *Dracaena cochinchinensis* and *D. cambodiana* were used as test materials, H_2O_2 , SA, JA, ETH and NO concentration change were detected during the formation of Resina Draconis by using ELISA. **Results:** In summary, after the Resina Draconis blood was wound, the concentration of H_2O_2 , SA, JA and NO were firstly increased and then decreased trend, but the ETH concentration was firstly decreased and then increased and later descend trend. Among these signaling molecules, SA concentration changes was the biggest. Moreover, for the response speed of two Resina Draconis tree, *D. cochinchinensis* was faster. **Conclusion:** Five signaling molecules plays a different role and have an interaction in the formation of Resina Draconis, which establish a complex signaling molecules system in the formation of Resina Draconis.

[Keywords] Resina Draconis; signaling molecule; ELISA; H_2O_2 ; SA

前言

龙血竭(Resina Draconis), 作为我国传统名贵中

药之一, 是重要的进口南药, 素有“活血圣药”之称^[1]。1999年, 国家颁布的新药转正标准中(W3-082(Z-016)-99(Z)规定其为百合科植物剑叶龙血树

[△] **[基金项目]** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助项目(2016-I2M-2-003); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2017-I2M-B&R-09)。

^{*} **[通信作者]** 张忠廉, 副研究员, 研究方向: 热带药用植物分子鉴定及次生代谢调控研究; E-mail: zzl0605@163.com.
张丽娟, 教授, 研究方向: 中药鉴定及质量评价研究; E-mail: lijuanzhang63@163.com

Dracaena cochinchinensis (Lour.) S. C. Chen 的含脂木材经提取得到的树脂, 具有活血散瘀、定痛止血、敛疮生肌的功效, 主要用于治疗跌打损伤、瘀血作痛、妇女气血凝滞、外伤出血、脓疮久不收口等症状^[2]。龙血竭具有良好的临床效果, 现广泛应用于膏、丸、丹、散、片及雾剂等中成药产品中, 据统计, 我国含龙血竭成分的药剂达 16 种, 市场年需求量达万吨以上, 市场需求量日益增大, 尤其近几年上升趋势非常明显。然而, 因龙血竭形成机制的特殊性, 其在自然条件下的产量较低, 而且由于龙血竭基原植物剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 为国家二级濒危保护植物(濒危等级: 易危)^[3], 其产量根本无法满足日益扩增的市场需求, 龙血竭药材资源供应链处于割裂状态, 导致多个以龙血竭为原料的中成药面临被迫停产的窘境, 某些产品单一的药企甚至面临破产的境况, 严重影响了龙血竭产业的可持续发展。因此, 通过开展龙血树栽培技术研究以及龙血竭人工诱导结脂技术研究, 对于促进龙血竭产业可持续发展意义重大。

龙血竭是龙血树植株在受到外界逆境胁迫条件(如物理伤害、化学诱导、真菌侵染)下进行的一种积极应答防御反应, 众多研究表明, 信号分子在植物的防御反应中发挥着至关重要的作用。如过氧化氢(H_2O_2)、水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)、乙烯(ethylene, ETH)、一氧化氮(NO)等。目前, 关于这五种信号分子在植物防御反应中得重要作用得到广泛研究。SA 作为一种小分子酚类物质, 在植物体内普遍存在, 是植物防御反应中的一种重要信号分子^[4]。JA 是一类脂肪酸的衍生物, 普遍存在于高等植物体内, 其生物合成途径及信号传递等研究得到了人们的广泛关注^[5]。ETH 是植物体内少有的气体激素类信号分子, 研究表明, 乙烯作为重要的激素类信号分子在植物的防御反应中起到重要作用^[6]。 H_2O_2 是一种活性氧(reactive oxygen species, ROS), 在生物细胞代谢过程中扮演着重要的角色。研究表明, H_2O_2 能够作为一种上游信号分子在植物防御反应中起至关重要的作用^[7]。NO 是一种气体信号分子, 在植物体的抗病防御反应中也是一种重要的信号物质^[8]。

本研究以国家药材标准规定的龙血竭基原植物剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 为研究对象, 在机械损

伤处理后分析 H_2O_2 、SA、JA、ETH 和 NO 的浓度变化规律, 从而确定影响龙血竭形成的主要信号分子, 为后期的深入研究奠定基础; 此外, 本研究还以龙血树属植物柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 为分析对象, 比较其与剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 在龙血竭形成过程中相关信号分子浓度变化的差异, 为后续的开发研究提供理论基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

选取生长健壮, 无病虫害, 生长环境相同的剑叶龙血树 *D. cochinchinensis*、柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 各 3 棵, 在每棵树的主茎健康部位的同一侧, 用酒精消毒后的砍刀自上而下割取长约 3 cm、宽约 1 cm、深约 1 cm 的伤口各 10 个, 经查阅文献发现, 多种信号分子在植物受到外界伤害胁迫后的 30 h 以内, 浓度变化趋于常态; 此外, 本课题组在前期研究中发现, 两种龙血树在伤害诱导 30 h 内即有龙血竭形成。因此, 本实验分别在割伤后 0、1、2、4、6、8、10、12、24、30 h 在其伤口处进行取样, 以检测在龙血树受到机械损伤后, 五种信号分子的浓度变化规律, 取样后迅速放入液氮中直至冷冻彻底, 超低温冰箱($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)保存备用。

1.2 试剂

试剂盒: H_2O_2 、SA、JA、ETH、NO 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司); PBS 缓冲液($\text{pH}=7.4$)。

1.3 主要仪器

移液器(Finnpipette, 10~1000 μL); 电热恒温培养箱(武汉一恒苏净科学仪器有限公司); 冷冻离心机(TGL16M 台式高速冷冻离心机); 电子天平(国产 AE1204 型号); 酶标仪(Rayto, RT-6100, 450 nm 波长)。

2 试验方法

2.1 供试品的提取

取植物组织样品 0.1 g 在液氮中充分研磨, 试验加入样本体积 9 倍的 PBS 缓冲液(pH 值约为 7.4), 在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻离心机下 $8000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 离心 30 min, 取上清液, 即得粗提液。

2.2 标准曲线制定及浓度检测

2.2.1 H_2O_2 的 ELISA 分析 将含有 H_2O_2 的粗提液在酶标仪上进行测定, 具体操作步骤按照 H_2O_2 检测试剂盒说明书方法, 检测范围为 $0 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.2 NO、SA、JA 及 ETH 的 ELISA 分析 将提取的含有 NO、SA、JA 及 ETH 粗提液分别用植物相应酶联免疫分析试剂盒进行检测。检测范围分别为: $6.25 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (NO)、 $0.25 \sim 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (SA)、 $62.5 \sim 2000 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (JA)、 $7.5 \sim 240 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ (ETH)。操作步骤与 H_2O_2 测定步骤基本一致, 区别在于检测试剂盒中包被的抗体和标准品稀释后的浓度不同。

2.2.3 数据分析 采用 SPSS20.0 统计软件, 结果均采用均数 $\pm$ 标准差表示 ($\bar{x} \pm s$), 组间差异比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为极显著差异。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

根据酶标仪上标准孔内的酶标值, 分别绘制相应信号分子的标准曲线 (图 1), 信号分子浓度与 OD 值的回归方程如表 1 所示, 说明样品在相应浓度范围内均有很好的线性关系。

表 1 各信号分子浓度与 OD 值的线性回归方程

信号分子	回归方程	r	浓度范围
H_2O_2	$Y = 41.59X - 0.3951$	0.9965	$0 \sim 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
NO	$Y = 96.877X - 2.0678$	0.9996	$0 \sim 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
SA	$Y = 4.3785X - 0.3852$	0.9977	$0 \sim 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
JA	$Y = 1174.4X - 89.272$	0.9988	$0 \sim 2000 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$
ETH	$Y = 132.18X - 3.9096$	0.9969	$0 \sim 240 \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$

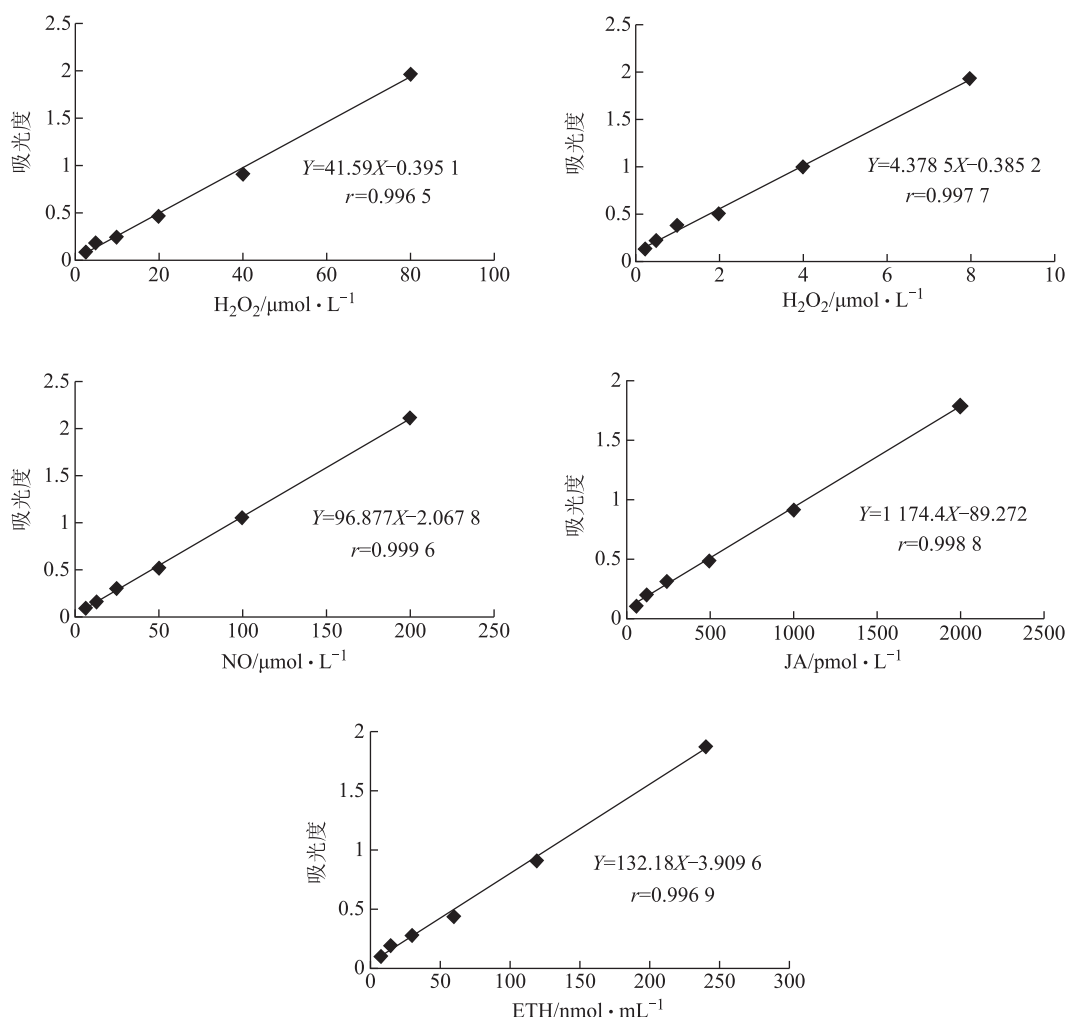


图 1 各信号分子线性回归方程

3.2 信号分子的浓度变化

将酶标仪测得的不同样品的酶标值,代入回归方程计算出不同样品的内源信号分子浓度(表2)。在测定信号分子浓度过程中发现,龙血树不同个体间的信号分子起始浓度差异较大,因此,为避免个体差异对分析结果的影响,我们采用比值 $K(K = C_{\text{实时浓度}}/C_{\text{起始浓度}})$ 进行信号分子浓度变化趋势研究,以观测其在龙血竭形成过程中的变化趋势,结果如图2所示。

整体来看,5种信号分子在龙血树伤害诱导后, H_2O_2 、SA、JA、NO浓度变化呈先上升后下降的趋势,而ETH浓度变化呈先下降后上升后再下降的趋势。其中,对于柬埔寨龙血树 *D. cambodiana*,变化幅度由大到小依次为SA($K_{\text{最大值}} = 2.03$) > H_2O_2 ($K_{\text{最大值}} = 1.81$) > JA($K_{\text{最大值}} = 1.52$) > NO($K_{\text{最大值}} = 1.49$) > ETH($K_{\text{最小值}} = 0.67$),而对于剑叶龙血树 *D. cochinchinensis*,变化幅度由大到小依次为SA($K_{\text{最大值}} = 2.12$) > JA($K_{\text{最大值}} = 1.60$) > NO($K_{\text{最大值}} = 1.50$) > H_2O_2 ($K_{\text{最大值}} = 1.33$) > ETH($K_{\text{最小值}} = 0.57$),由此可见,SA在龙血竭的形成过程中起着至关重要的作用。比较不同龙血树各信号分子出现最高峰(或最低峰)的诱导时间,我们发现 H_2O_2 、SA、JA、NO在柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 伤害诱导过程中出现最高峰的时间分别为8、10、10、10 h,而在剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 体内各信号分子出现最高峰的时间分别为6、8、10、8 h,而ETH在柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 与剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 伤害诱导过程中出现最低峰的时间分别为10、8 h。因此,就龙血树受到伤害胁迫后的响应速度来说,柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 较剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 响应速度较慢。比较龙血树发生防御反应后的第30 h 与0 h 各信号分子的浓度,发现柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 中, H_2O_2 在30 h 时的浓度均高于0 h,而剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 体内 H_2O_2 在30 h 时与0 h 浓度基本持平,由于植物发生防御反应后,所导致的后期反应是一个持续性过程,因此,通过以上研究结果可初步认为柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 与剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 在伤害诱导后期的持续性反应有所差异,具体机理仍需进一步研究分析。而从响应时间上来看,5种信号分子中,出现浓度最高值最早的为 H_2O_2 ,因此可以推测龙血树在受到伤害胁迫后,最先产生响应的信号

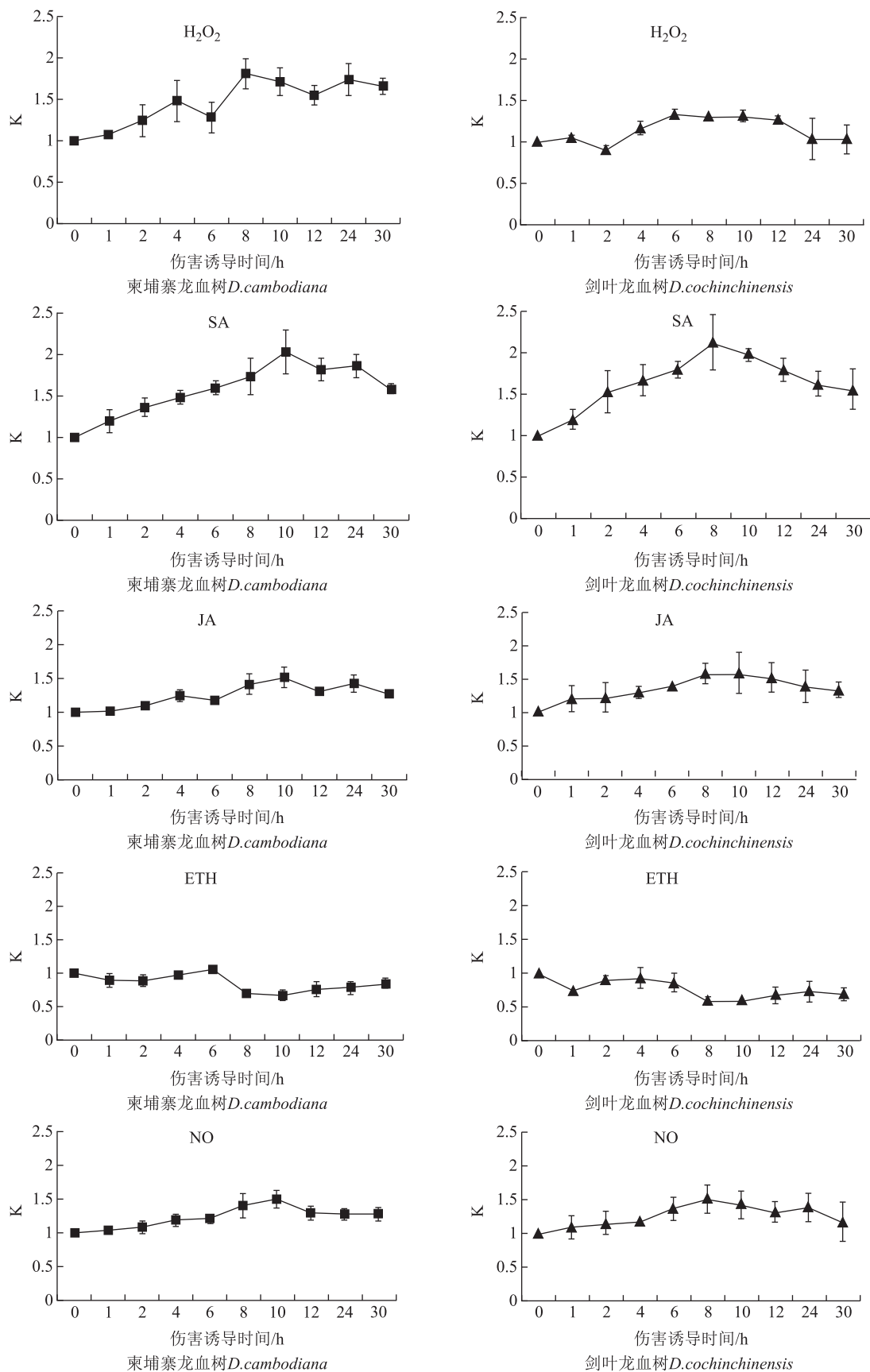
分子为 H_2O_2 。

4 讨论

龙血竭是龙血树受到外界伤害或微生物侵入后,通过一系列的自身防御反应所形成的防御产物^[9],它的形成是一种植物抗逆响应。植物在防御反应过程中存在的一系列生理生化与分子生物学反应都受信号转导网络的影响及调控,从抗病信号的产生、发展以及信号之间的相互作用,到最终诱导防御基因表达,信号分子在这过程中起到了关键作用^[10-12]。

活性氧迸发是植物防御早期的一个重要的反应^[13]。该反应会产生大量的 H_2O_2 。杨卫民等^[14]研究发现活性氧在人参悬浮细胞受到激发子刺激后首先产生 H_2O_2 ;臧忠靖等^[15]研究证明细胞内过量的 H_2O_2 通过NADPH氧化酶与脂氧合酶途径启动茉莉酸的合成,诱导下游基因的表达。本试验研究发现,对龙血树进行伤害诱导后发生的防御反应中,对比五种信号分子响应时间,发现 H_2O_2 响应最快,这可能与ROS在植物防御反应初期迸发产生 H_2O_2 相关。

SA作为信号分子,在植物防御反应中扮演着至关重要的角色。其通过把伤害信号传递到植物内的其他部分,从而使植物全株获得性抗性^[16](Systemic Acquired Resistance, SAR),SAR是植物受到诱导后发生的一种长期防御反应。研究表明,SA是激活SAR的天然信号分子,在植物细胞内,SAR与防御基因表达相关^[17]。Yu等^[18]研究发现,烟草、拟南芥等对SA敏感的植物中具有一种有效的SA信号感知和信号传导机制。当这些植物受到外界的伤害诱导后,植物体内的SA生物合成并积累、激活传导路径,诱导防御基因的表达,从而提高植株的抗病性。Sticher等^[19]发现在SAR产生及SAR基因表达前,植物体内的SA进行积累,积累水平越高,则植物的抗性越强,二者呈正相关。本试验发现,在 H_2O_2 、SA、JA、NO和ETH五种信号分子中,SA在龙血竭的形成过程中具有至关重要的作用。这一研究也表明龙血树在受到伤害诱导后,植物体内具有有效的SA信号传导机制,大大提高了龙血树的抗病能力。这说明SA的信号传导在龙血树防御基因的表达与防御产物的形成中起至关重要的作用。



注: $K = C_{\text{定时浓度}} / C_{\text{起始浓度}}$ 。

图2 龙血竭形成过程中各信号分子浓度变化趋势图

表2 柬埔寨龙血树和剑叶龙血树信号分子浓度

样品	处理时间/h	H ₂ O ₂ /nmol·g ⁻¹	SA/μg·g ⁻¹	JA/pmol·g ⁻¹	ETH/nmol·g ⁻¹	NO/nmol·g ⁻¹
柬埔寨龙血树 <i>D. cambodiana</i>	CK	104.69 ± 9.76	7.43 ± 1.95	4.62 ± 0.35	666.48 ± 48.29	342.50 ± 18.04
	1	112.50 ± 5.04	9.11 ± 3.07	4.64 ± 0.24	587.31 ± 24.78 *	355.85 ± 35.38
	2	128.79 ± 8.37 *	10.00 ± 2.36 *	5.04 ± 0.30	587.46 ± 58.73 *	368.44 ± 19.64
	4	153.26 ± 12.81 *	10.91 ± 2.43 *	5.74 ± 0.06 *	642.10 ± 42.10	402.46 ± 16.89 *
	6	132.95 ± 7.26 *	11.78 ± 2.84 *	5.40 ± 0.18 *	697.98 ± 19.42	412.69 ± 13.31 *
	8	188.15 ± 2.90 *	12.87 ± 3.78 *	6.52 ± 0.57 *	460.56 ± 30.55 *	477.59 ± 40.46 *
	10	178.07 ± 1.85 *	14.54 ± 2.34 *	6.96 ± 0.36 *	443.23 ± 31.37 *	511.50 ± 22.24 *
	12	161.54 ± 4.48 *	13.24 ± 2.79 *	6.06 ± 0.46 *	502.13 ± 46.54 *	442.81 ± 27.03 *
	24	180.34 ± 3.99 *	13.60 ± 3.07 *	6.53 ± 0.35 *	512.11 ± 33.48 *	434.84 ± 7.47 *
	30	174.31 ± 16.17 *	11.75 ± 3.08 *	5.86 ± 0.41 *	555.74 ± 10.98 *	434.62 ± 18.56 *
剑叶龙血树 <i>D. cochinchinensis</i>	CK	157.52 ± 28.11	7.99 ± 1.29	4.23 ± 0.40	680.97 ± 62.64	397.99 ± 106.57
	1	165.72 ± 29.90	9.56 ± 1.71	5.04 ± 0.33	490.72 ± 16.00 *	419.47 ± 87.03
	2	143.49 ± 31.44	11.90 ± 0.15	5.11 ± 0.65 *	596.45 ± 36.01	447.22 ± 102.53
	4	184.65 ± 35.55 *	13.09 ± 0.86 *	5.52 ± 0.38 *	621.58 ± 42.66	462.93 ± 117.37 *
	6	209.98 ± 44.70 *	14.25 ± 1.57 *	5.85 ± 0.53 *	574.81 ± 42.19 *	527.99 ± 100.46
	8	205.24 ± 39.56 *	16.57 ± 1.00 *	6.70 ± 0.72 *	384.12 ± 18.09 *	577.53 ± 78.70
	10	206.06 ± 32.57 *	15.70 ± 2.05 *	6.64 ± 0.64 *	405.18 ± 38.73 *	543.16 ± 72.05 *
	12	198.87 ± 30.21 *	14.14 ± 1.47 *	6.40 ± 0.34 *	449.04 ± 37.90 *	506.88 ± 81.45 *
	24	155.86 ± 16.00 *	12.82 ± 1.23 *	5.79 ± 0.47 *	484.48 ± 63.75 *	532.42 ± 93.99 *
	30	156.97 ± 2.79 *	12.15 ± 0.76 *	5.63 ± 0.62 *	459.79 ± 32.96 *	433.74 ± 1.73 *

注：与未受伤的龙血竭体内的各信号分子浓度作比较，* $P < 0.05$ 。

通过对本试验的结果进行分析发现，两种龙血树受到伤害胁迫后的响应速度不同，柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 较剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 响应速度稍慢，表明柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 对伤害信号敏感度较剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 弱，伤害诱导条件下产生防御反应的信号传导时间较长，这可能是由于两种龙血树的组织结构差异不同造成的。我们观察发现，柬埔寨龙血树 *D. cambodiana* 与剑叶龙血树 *D. cochinchinensis* 植株相比较，虽其茎部较细，外表皮常破损，但其内部的木质结构致密，木质部较发达，因此推测其防御能力较强，故而对外界伤害胁迫的响应速度较慢。当然，以上仅为推测，具体机理还需进一步的研究验证。

研究表明，植物防御反应中的抗病信号传导是一个极其复杂的网络系统，H₂O₂、SA、JA、NO 和 ETH 等信号分子在介导植物防御基因表达的过程中，并不是单独作用，它们之间相互协调，相互制约，形成了有效且复杂的应答系统^[20]。Xu 等^[21]通过对银杏细胞的研究发现，SA 与 JA 协同促进银杏细胞中银杏黄酮苷的积累；Leon 等^[22]研究发现，H₂O₂

能够促进烟草中 SA 的生物合成；梅兴国等^[23]研究证明，SA 对 H₂O₂ 的合成同样具有促进作用，红豆杉细胞内加入不同浓度 SA 后，发现其细胞内 H₂O₂ 的浓度上升程度不同；同时还有研究显示，在激发子的诱导作用下，欧芹悬浮细胞经 SA 的预处理后，其体内的 H₂O₂ 积累水平提高^[24]。NO 作为信号分子，其生理效应与 H₂O₂ 相似，参与调控植物细胞气孔运动及细胞程序式死亡^[25]，同时在植物的防御反应中，NO 还可通过影响超氧化物歧化酶(SOD)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)与过氧化氢酶(CAT)的活性来调节植物内 H₂O₂ 的含量^[26]，二者在一定程度上的存在协同与交叉作用^[27-28]，此外，NO 与 SA 也互相影响，Durner J 等^[29]人发现经过 NO 处理后的烟草叶片，SA 浓度明显增加，说明 NO 能促进 SA 含量积累水平；NO 还能通过依赖 SA 信号途径传导激活自身信号传导增强植物的抗病能力。本研究显示龙血树经伤害胁迫后，其体内信号分子 H₂O₂、SA、JA、NO 浓度呈上升趋势，我们推测各信号分子间存在多种促进协同等作用，H₂O₂ 在防御反应早期产生反应，促进了龙血树体内 SA 含量水平的提

升,二者具有协同作用,诱导了JA与NO信号途径的传导,增强了龙血树的抗逆反应。而ETH胁迫反应下浓度呈下降趋势,这与Leslie CA^[30]等研究发现SA能够抑制ETH的合成结果一致,也就是说胁迫反应后乙烯含量的降低可能与SA信号传导对其的抑制作用相关,并且柬埔寨龙血树*D. cambodiana*与剑叶龙血树*D. cochinchinensis*中,ETH在30 h时的浓度均低于0 h,推测这可能与龙血树发生防御反应后体内SA的浓度大量增加抑制了ETH浓度的升高。

总之,对剑叶龙血树*D. cochinchinensis*与柬埔寨龙血树*D. cambodiana*进行伤害诱导后激发的一系列信号传导途径不是单独存在的,而是多种信号分子通过特异性的传导途径组成的极其复杂的网络转导结构,他们之间通过协同、促进、拮抗、抑制等互作形成最有效的胁迫应答转导机制,其中可能是一个或几个关键的信号分子起主导作用,最终共同促进了龙血竭的形成。由于龙血竭自然条件下的形成较为缓慢,导致龙血竭药材资源的供应与市场上对其日益扩增的需求产生了巨大的矛盾。综上所述,我们通过分析其在受到伤害胁迫后,体内各信号分子浓度变化规律及差异性,发现SA和H₂O₂是影响龙血竭形成的主要信号分子,为后期对龙血竭作为防御产物形成的深入研究奠定基础。然而各信号分子在龙血竭形成过程中的相互作用及其对后期龙血竭形成的具体作用机制尚不明确,还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典:上册[M]. 上海:上海人民出版社,1986:926.
- [2] 国家药典委员会. 国家药品标准-新药转正标准中药:第22册[M]. 北京:中国医药科技出版社,1999:651.
- [3] 傅立国. 中国植物红皮书-稀有濒危植物:第一册[M]. 北京:科学出版社,1991:392-393.
- [4] KLESSIG D F, DURNER J, NOAD R, et al. Nitric Oxide and salicylic acid signaling in plant defense[J]. Proc Natl. 2000,97(16):8849-8855.
- [5] WILMOWICZ E, FRANKOWSKI K, SIDLOWSKA M, et al. Jasmonate biosynthesis the latest discoveries[J]. Postepy Biochem 2012,58(1):26-33.
- [6] MERSMANN S, BOURDAIS G, RIETH S, et al. Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity[J]. Plant Physiol, 2010,154(1):391-400.
- [7] 李师翁,薛林贵,冯虎元,等. 植物中的H₂O₂信号及其功能. 中国生物化学与分子生物学报. 2007,23(10):804-810.
- [8] 赵晓刚,徐张红,何奕昆,等. NO在植物中的调控作用[J]. 植物学通报,2004,(1):44-51.
- [9] 赵婷,杨玲玲. 血竭诱导及形成机制的研究进展[J]. 中草药. 2010,41(4):5-8.
- [10] ZIPFEL C, ROBATZEK S. Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni vidi[J]. Plant Physiol. 2010,154(2):551-554.
- [11] YOSHIOKA H, MASE K, YOSHIOKA M, et al. Regulatory mechanisms of nitric oxide and reactive oxygen species generation and their role in plant immunity[J]. Nitric Oxide, 2011,25(2):216-221.
- [12] DANG J, JONES J D. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature, 2001,411(6849):826-833.
- [13] ASAI S, MASE K, YOSHIOKA H. Role of nitric oxide and reactive oxide species in disease resistance to necrotrophic pathogens[J]. Plant Signal Behav. 2010,5(7):872-874.
- [14] 杨卫民,杜京旗,赵君,等. ABA, H₂O₂和NO在植物细胞凋亡中的作用. 南方农业, 2014,8(9):120-133.
- [15] 臧忠靖,岳才军,冯振月. 诱导植物次生代谢产物生成胞内信号分子的作用机制及其互作[J]. 吉林农业, 2010,30(5):23-24.
- [16] 高琪听,胡新喜,王欢妍,等. 水杨酸诱导植物抗病性机制的研究进展[J]. 中国马铃薯, 2014,28(4):238-242.
- [17] 寓宽平. 水杨酸及受体与植物细胞的信号传递. 湖北农业大学, 1995,65(2):64-66.
- [18] YU D Q, LIU Y, FAN B et al. Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato[J]. Plant Physiol, 1997,94(110):343-349.
- [19] STICHER L, MAUCH-MANI B, et al. Systemic acquired resistance[J]. Annu Rev Phytopathol, 1997, 56(35):235-270.
- [20] 徐茂军. NO对植物细胞次生代谢产物合成的促进作用及其信号转导机制研究[D]. 浙江:浙江大学, 2005.
- [21] XU M J, DONG J F, WANG H, et al. Complementary action of jasmonic acid on salicylic acid in mediating fungal elicitor-induced flavonol glycoside accumulation of Ginkgo biloba cells[J]. Plant Cell Environ, 2009,32(8):960-967.
- [22] LEON J, LAWTON M A, RASLDN I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco[J]. Plant Physiol, 1995,96(108):1673-1678.
- [23] 梅兴国,张舟宁. 水杨酸对红豆杉细胞的诱导作用. 生物技术, 2000,10(6):18-20.

(下转第672页)

哈巴俄苷和甘草酸铵为指标的薄层色谱鉴别方法专属性强,准确度高,以绿原酸和哈巴俄苷为指标的HPLC含量测定方法具有较好的精密度、重复性和稳定性,操作简便,标准可行,为有效控制该配伍方的质量提供准确、可靠的检测方法,也为配伍方作为新药的质量标准制定提供参考。

参考文献

- [1] 李冀. 方剂学[M]. 北京:中国中医药出版社,2017:81.
- [2] 高慧,孟云辉,李永新,等. 四妙勇安汤异病同治的临床研究概况[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(22):2504-2506.
- [3] 谢连娣,陈立新,吴圣贤,等. 四妙勇安汤治疗冠心病的临床和基础研究概述[J]. 环球中医药,2012,5(8):629-633.
- [4] 郑亮,王梦月,陈钟,等. 四妙勇安汤研究进展[J/OL]. 中成药[2018-11-18]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20180830.1409.004.html>.
- [5] 聂波,徐冰,陈立新,等. 四妙勇安汤活性部位灌胃给药的急性毒性试验研究[J]. 河北中医,2017,39(1):100-103.
- [6] 刘蓓,陈立新,郭鹏,等. 四妙勇安汤活性部位对ApoE基因敲除小鼠动脉粥样硬化的药效学研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(4):450-451.
- [7] 朱海燕,聂波,徐冰,等. 四妙勇安汤配伍方抑制巨噬细胞NF- κ B活化和MMP-9分泌的初步研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(1):52-54.
- [8] 陈立新,吴圣贤,聂波. 对炎症因子表达具有抑制作用的药物组合物:ZL201210096533.5[P]. 2015-06-10.
- [9] 赵小艳,朱广伟. 传统中药的定性和定量分析浅议[J]. 中国民间疗法,2013,21(5):68-69.
- [10] 刘爱香. 中药及中成药薄层色谱鉴别检验中的问题分析[J]. 光明中医,2018,33(22):3437-3439.
- [11] 许世伟,姜雪敏,王云龙. 高效液相色谱法在中药质量检测中的应用[J]. 北方药学,2013,10(6):13.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:86-87,117.
- [13] 刘鹏,张恩惠,张薇,等. 四妙勇安汤水煎液化学成分研究[J]. 中草药,2018,49(14):3232-3239.
- [14] 迟森森,王卫华,刘斌. 四妙勇安汤水提物大鼠吸收入血成分研究[J]. 北京中医药大学学报,2016,39(11):933-940.
- [15] 徐英辉,申茹,刘彦彦. 绿原酸对佐剂性关节炎模型大鼠抗炎作用及机制研究[J]. 药学研究,2014,33(9):505-507.
- [16] 崔忠生,邸科前,马焕云. 哈巴俄苷及哈巴俄苷对同型半胱氨酸损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 山东医药,2009,49(49):52-53.
- [17] 王韶,孟静岩. 四妙勇安汤的药物成分及抗动脉粥样硬化作用机制概述[J]. 中医学,2018,7(1):7-12.
- [18] 屠鹏飞,黄璐琦,陈万生,等. 《中华人民共和国药典》(2020年版)中药材和中药饮片质量标准增修订工作思路[J]. 中国现代中药,2018,20(12):1459-1464.

(收稿日期:2019-01-28 编辑:王笑辉)

(上接第648页)

- [24] KAUSS H, JEBlick W. Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H_2O_2 [J]. Plant Physiology, 1995, 96(108):1171-1178.
- [25] NEILL S J, DESIKAN R, CLARKE A et al. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells[J]. Plant Physiol, 2002, 128(1):13-16.
- [26] CLARK D, DERNER J, NAVARRE D A et al. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase[J]. Mol Plant Microbe In, 2000, 13(12):1380-1384.
- [27] CAMP W V, MONTAGU M V. H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance[J]. Trends in Plant Science. 1998, 3(9):330-334.
- [28] DELLEDONNE M, XAI Y J, DIXON R A, et al. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance[J]. Nature. 1998, 394(6693):585-588.
- [29] DURNER J, WENFEHENNE D, Klessig D F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP ribose[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(17):10328-10333.
- [30] LESLIE C A, ROMANI R J. Salicylic acid: A new inhibitor of ethylene biosynthesis[J]. Plant Cell Rep. 1986, 5(2):144-146.

(收稿日期:2019-02-11 编辑:姚霞)