



植物体内草酸钙的生物矿化

李秀丽[†], 张文君[†], 鲁剑巍^{*}, 王荔军^{*}

华中农业大学资源与环境学院, 武汉 430070

[†] 同等贡献

^{*} 联系人, E-mail: lujianwei@mail.hzau.edu.cn; ljwang@mail.hzau.edu.cn

2012-04-12 收稿, 2012-05-31 接受

华中农业大学引进人才启动项目(52204-09008)和国家公益性行业(农业)科研专项(201203013)资助

摘要 草酸钙晶体在特化的植物晶异细胞内的形成是一种基本的、重要的生理代谢过程. 不同植物草酸钙晶体在形态/结构上存在多样性和种间专一性, 它们具有特定的尺寸和形貌, 并且成核后晶体的生长和特化细胞的发育间存在显著的协同作用, 这表明草酸钙的生物合成不是一种简单的化学结晶过程, 而是受遗传和生物大分子的精确调控. 被塑造的矿化相在特定的膜包裹空间内经历了各自不同的生物化学途径, 最终形成热力学稳定相. 草酸钙晶体赋予植物许多不同的功能, 主要包括对高容量钙的调节和植物自我保护作用, 从而间接地反映出植物在不同生境中进化的印迹. 本文介绍了草酸钙晶体在植物体内合成的草酸代谢途径、钙的吸收和累积, 主要讨论晶体生长过程的植物调节机制以及体外模拟生物分子对草酸钙结晶动力学过程的调控等, 以期揭示植物体内草酸钙的生物矿化机制, 并为仿生材料合成和人类病理结石的抑制等提供重要线索.

关键词

植物
草酸钙
晶异细胞
生物矿化

Leeuwenhoek^[1]首次利用光学显微镜观察到植物体内存在草酸钙. 草酸钙晶体在植物中主要是以一水草酸钙($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, COM, 单斜晶系)的形式存在, 二水草酸钙($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, COD, 四方晶系)数量极少且不稳定^[2]. 草酸钙晶体是植物生长发育过程中除了 SiO_2 外形成的最常见的矿物, 几乎在所有高等植物体内都有分布^[3-5], 并存在于不同的组织及器官中^[6-8]. 草酸钙晶体沉积发生在植物特化晶异细胞(crystal idioblasts)的液泡中^[9]. 每个液泡可形成一个或多个晶体. 在后一种情况下, 单个晶体在分隔的膜空间, 通常称之为晶室(腔)(crystal chamber)内形成^[5,10]. 目前对草酸钙晶体的形成机制尚不清楚^[5], 但它们的形成必然与草酸和钙离子在植物体内特定区域大量积累有关. 其中植物体内草酸作为毒素或代谢的最终产物之一^[11], 可通过乙醇酸/乙醛酸(glycolate/glyoxylate)氧化、草酰乙酸盐(oxaloacetate)水解、L-抗坏血酸(L-ascorbic acid)氧化裂解等途径在

植物体中大量生成^[9,12-15]. 草酸钙晶体的形成也需要大量的钙源, 钙离子可通过渗透调节作用被根系木质部吸收利用, 并且钙作为植物细胞内重要的第二信使可调节晶异细胞中钙的大量沉积^[16], 所以了解细胞对钙的调控机制能更好地解释草酸钙晶体的形成机制. 此外, 生物大分子(包括蛋白、多糖、膜脂以及膜结构大分子等)可促进或抑制草酸钙晶体的成核和生长, 从而在草酸钙矿化过程影响晶体构型及生长过程^[5,10,17-21]. 因此借助生物化学、细胞生物学和分子遗传突变等分析方法^[4,5], 逐步揭示了生物分子在草酸钙矿化过程中所起的调控作用^[22,23].

1 草酸钙晶体的分布、形态和功能

1.1 草酸钙晶体的分布

到目前为止, 已在 500 多种植物体内发现了草酸钙的沉积, 目前在低等的藻类、高等的裸子植物及

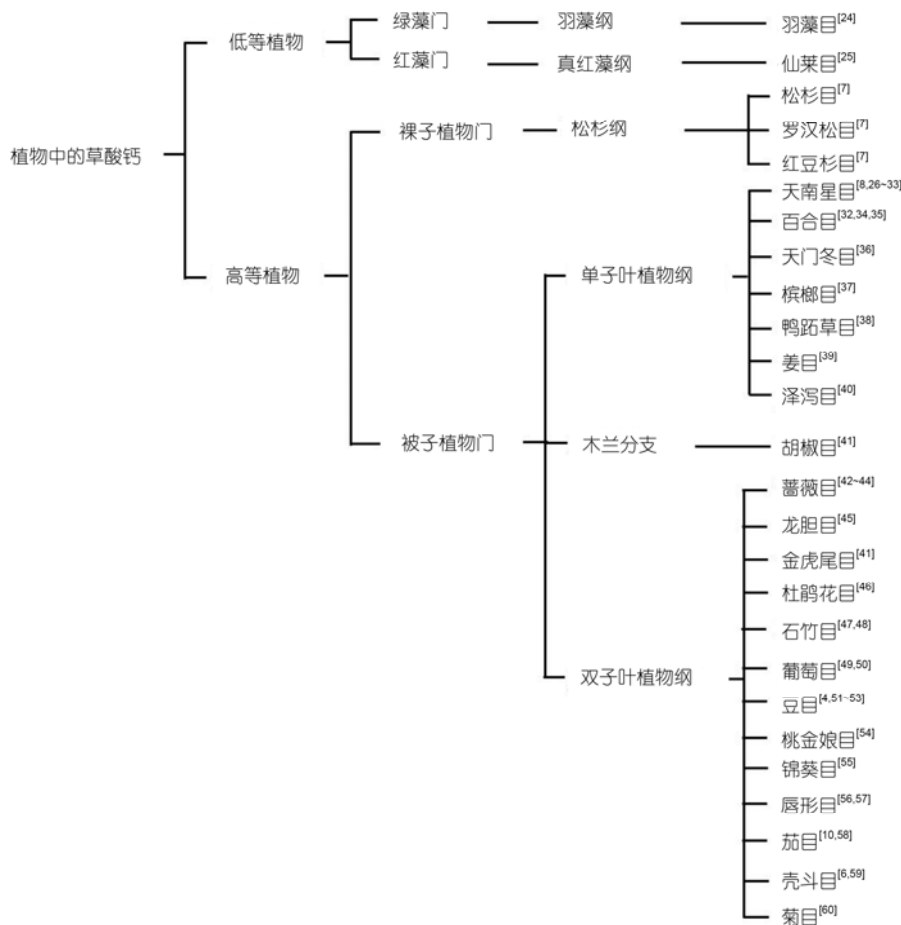


图 1 草酸钙晶体在植物中的分布
依据 APG III 分类法^[61]

被子植物等 26 个植物分类学目中均发现草酸钙晶体的沉积, 其中 90% 的目属于高等植物, 80% 的目属于被子植物, 50% 的目属于双子叶植物^[4,6-8,10,24-60], 说明草酸钙晶体在植物界中分布广泛, 主要存在于维管束植物中(图 1)。草酸钙主要沉积部位分布在叶片、茎、种子、苞片、花药、根等器官中的晶异细胞中^[8,58,62], 另外还可形成在特定的组织或细胞类型中, 如通气组织和石细胞^[9]。草酸钙晶体与淀粉体、叶绿体和其他细胞质组分沿细胞骨架以一定速度移动, 表明草酸钙晶体也存在于细胞质中^[24]。桑葚(*Morus alba*)叶片细胞壁外层的胶质鞘中也存在草酸钙晶体的沉积^[42]。草酸钙在植物体不同群体中的分布情况表明, 草酸钙的形成是一个重要的生物矿化类型。而在同一群体中, 草酸钙在器官、组织和细胞中的分布又趋于一致, 这可能与物种的进化有关^[6,7,9,43,56]。

1.2 植物中草酸钙晶体的形态

草酸钙晶体的形态一般分为 5 种: 简单棱柱形棱晶(prism)、球形晶簇(druse)、单个针状柱晶(styloid)、成束针晶(raphide)和由四面体形晶体聚集成的晶砂(crystal sand)^[8,9,37,41,49,51]。此外, 在木犀科植物叶片中存在细小的针状晶体(acicular crystal)和不同于晶簇的球晶(sphaerite)^[56]。细胞壁中发现的晶体形态主要为棱晶(图 2(a), (b)), 而细胞内发现的晶体形态多样(图 2(c)~(h))。除了形状上的区别, 晶体尺寸也千差万别。并且晶体间的相互作用可导致这些基本形态的进一步变化^[50]。由于晶体形态存在多样性(不同种)和专一性(同种), 因此它们可作为植物分类学的依据之一^[9,10,26,43]。

1.3 草酸钙晶体的功能

植物体内草酸钙晶体这种特殊矿化结构的形成

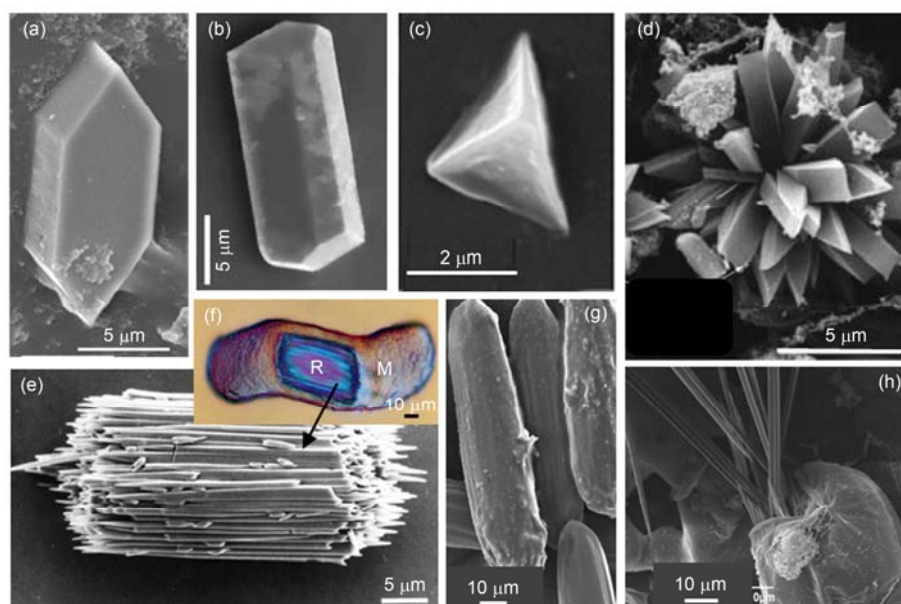


图2 植物体内草酸钙晶体的形态

(a) 香蕉(*Musa cavendishii*)叶柄中分离出的棱晶(作者未发表数据); (b) 大豆种皮中分离到的棱晶^[51]; (c) 蕃茄(*Lycopersicon esculentum*)叶片中分离的假四面体(pseudotetrahedral)棱晶^[10]; (d) 椒草(*Peperomia*)叶片栅栏组织中的晶簇^[41]; (e) 美洲葡萄(*Vitis labrusca*)叶片中分离出的针晶束^[49]; (f) 光学显微镜下的晶异细胞内的针晶束(R)和与针晶束相连的有机基质(M)^[49]; (g) 香蕉(*Musa cavendishii*)叶片中分离出的晶异细胞(细胞内包含针晶束)(作者未发表数据); (h) 晶异细胞内露出的针晶束(作者未发表数据)。

与生物遗传相关,并存在重要的生理功能。研究表明,草酸钙晶体可以调节细胞内过高的 Ca^{2+} 的浓度,并减少草酸对细胞的危害;平衡调节其他离子,如 Na^+ 和 K^{+} ^[5,27,63];自我保护以防御昆虫的捕食^[7](这一功能与晶体的大小、数量、形态及分布有关)^[28,52,55]。特别需要指出的是,有些植物中带有沟槽的草酸钙针晶体具有毒性^[9]。当动物碰到这些毒刺时,在外界压力作用下,包覆晶体的细胞膜破裂,具有尖端的针状晶体可刺穿动物表皮(图2(h)),从而使毒素通过沟槽流入动物体内^[34,52]。其他功能还包括反射光、组织支持和解毒作用等^[9,44,64]。

2 植物体内草酸钙晶体的形成

植物体内草酸钙晶体是内源合成的草酸和外源吸收的钙离子共同反应的产物,这一过程并不是简单的化学沉淀过程,而是受严格的遗传调控^[9]。

2.1 草酸的生物合成

草酸是广泛存在于植物中的最简单的二元酸^[9,65,66]。尽管草酸是一种惰性的代谢产物,但在植物体中却存在许多重要功能,其中包括抵抗重金属

毒害^[67]和病原菌侵害^[68~70]。草酸在植物体内的合成可通过以下途径:乙醇酸途径、异柠檬酸途径、草酰乙酸途径和 *L*-抗坏血酸途径^[1,71],但哪条路径与草酸钙晶体的形成关系最为密切?目前研究表明,草酰乙酸途径的可能性很小,因为此途径只在少数物种中发现,而异柠檬酸途径也没有确切证据^[9]。可能性最大的是乙醇酸和抗坏血酸途径,乙醇酸途径主要由乙醇酸氧化或乙醇酸氧化酶形成乙醛酸而合成^[72]。乙醇酸氧化酶在植物组织中相当丰富^[15,73]。而最近的结果表明乙醇酸氧化酶不参与草酸的积累^[15],因此推测存在一种未知的酶能催化乙醛酸形成草酸,它很可能是乳酸脱氢酶^[74,75]或乙醛酸脱氢酶^[76,77]。然而,它们是否具有催化活性还有待进一步研究^[78]。除此以外,合成草酸的前体物质可能是抗坏血酸,通过 ^{14}C 标记的 *L*-抗坏血酸证实它用于合成草酸并最终形成草酸钙晶体^[13,14,35,79~82]。抗坏血酸合成草酸在晶异细胞内完成,合成反应受钙水平的调控^[9,83]。

2.2 钙的吸收和运输

植物根毛从土壤溶液中吸收钙离子,并在根部通过胞间联丝相连的共质体或细胞间隙(质外体)进

行运输^[84]. 在运输过程中需要钙离子通道、 Ca^{2+} -ATP(三磷酸腺苷, adenosine triphosphate)酶和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 反向转运子的参与^[85]. 钙离子在木质部中, 通过跨越内皮层凯氏带和木质部薄壁细胞组织进行运输, 部分 Ca^{2+} 可由离子通道流进内皮层细胞, 这部分钙离子有两种去向, 一种是通过共质体途径到达木质部薄壁细胞组织, 需要 Ca^{2+} -ATP 酶驱动进入中柱质外体; 另一种是由内皮层细胞运出, 沿内皮层内侧的质外体途径进入木质部导管, 并通过导管沉积在植物器官中^[85], 再随质外体途径由木质部流通到细胞间进行再次分配^[29,86]. 钙的运输需要平衡根细胞质中的钙浓度, 调控钙在木质部中运输的速度, 防止钙离子在地上部分过度的积累^[86]. 细胞内高浓度钙会对细胞产生毒害, 因此细胞通过某些酶来维持胞内钙离子的浓度. 这些酶能将胞内的钙离子分配到液泡或内质网中. 原生质膜、液泡膜和内质网上钙离子流速的动态变化与胞内和胞外环境胁迫相对应^[84]. 与钙有关的磷酸酶和蛋白酶的增加是胞内钙离子发生沉积和转化的信号因子^[87]. 植物体内 90%的钙是

以草酸钙晶体的形式存在^[9]. 大多数细胞通过泵出或分室化作用调控钙的水平. 在大藻(*Pistia stratiotes*)体内是通过细胞膜上钙离子通道调控草酸钙晶体合成所需的钙^[29], 并且特异细胞对钙的吸收能力显著高于其他非特异细胞^[29]. 内质网可吸收大量细胞质的钙, 并且钙网蛋白加强了内质网腔对钙的缓冲能力, 避免高水平钙对细胞造成的损伤. 胞内钙离子浓度的增加为草酸钙晶体的形成提供了充足的钙源, 而钙浓度的变化对草酸钙晶体的形态及水化状态都具有影响^[30].

2.3 草酸钙晶体在晶异细胞中合成

(1) 晶异细胞. 草酸钙晶体在特化细胞中形成, 这些特化细胞被称为晶异细胞, 它们含有一定数量特化的细胞器和对应的独特功能. 晶异细胞的细胞质中含有大量的高尔基体、线粒体、内质网、特化质体及与液泡内晶体相连的独特膜结构^[9,27,29](图3(a)). 高尔基体和线粒体为细胞的快速增长提供能量, 而内质网与细胞内合成草酸钙密切相关^[29]. 内质网腔

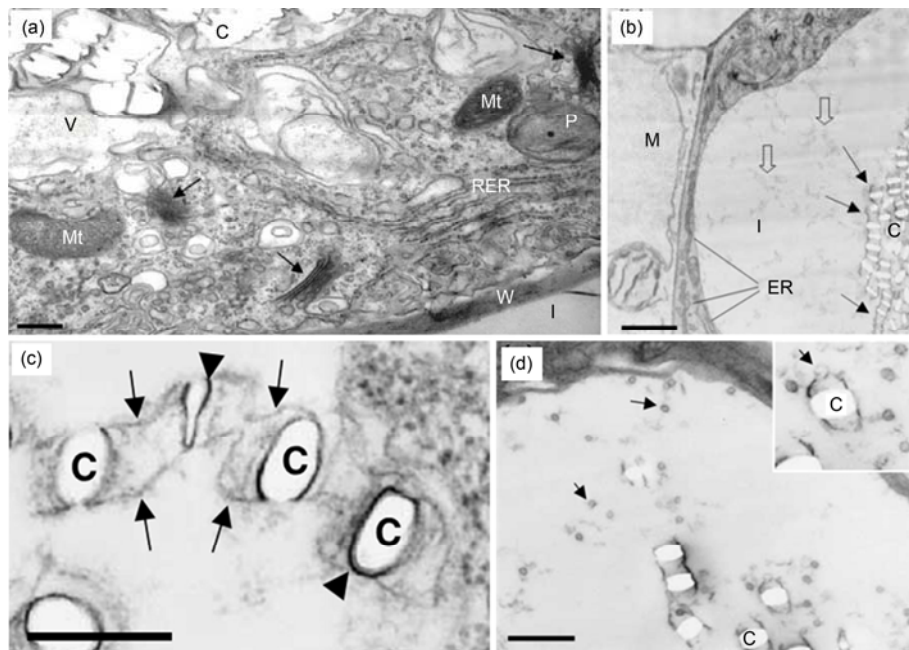


图3 草酸钙晶异细胞的透射电子显微镜图

(a) 晶体存在于晶异细胞的液泡中, 晶异细胞的细胞质中含有大量的线粒体、质体、光面内质网、粗面内质网、高尔基体(箭头)和其他膜结构. 标尺为 $1\ \mu\text{m}$ ^[29]; (b) 晶异细胞及相邻叶肉细胞的横切面, 在晶异细胞中, 晶体存在于液泡中并在膜的作用下排成纵列(箭头所示), 液泡中含有许多絮状物质(空心箭头所示), 细胞质中含有丰富的内质网. 标尺为 $2\ \mu\text{m}$ ^[27]; (c) 一系列正在形成的晶体, 这一列晶体的两侧都由膜限定(箭头所示), 每一个晶体都由腔膜包裹(无尾箭头所示). 标尺为 $0.25\ \mu\text{m}$ ^[27]; (d) 晶异细胞中含有许多小囊泡(箭头所示), 这些小囊泡与正在形成的晶体和腔膜有关. 插图示一个小囊泡与膜腔的一端相融合. 标尺为 $1\ \mu\text{m}$ ^[27]. 图(a)为大藻(*Pistia stratiotes*), 其余为浮萍(*Lemna minor*). M, 叶肉; C, 晶体; I, 晶异细胞; Mt, 线粒体; P, 质体; V, 液泡; W, 细胞壁; RER, 粗面内质网; ER, 内质网

中的钙网蛋白对晶异细胞内钙的累积起缓冲调节作用, 钙网蛋白和 Ca^{2+} 在晶异细胞内质网的特化空间内同时积累^[27,31,88]. 当外界钙浓度增加时, 晶体在 1 h 内填满整个晶异细胞^[32]. 内质网为钙的吸收提供了较大的比表面积, 同时钙网蛋白也调控钙的运输^[31,88,89]. 晶异细胞中的质体缺乏基粒和类囊体(图 3(a)), 不含活化酶, 不能进行光合作用^[9,27,29]. 草酸的前体是抗坏血酸, 将抗坏血酸转化成草酸是在质体上进行加工转化^[9].

液泡内与晶体相连的独特膜结构也与晶体的形成有关. 在晶异细胞中, 晶体存在于液泡中并在膜的限定下排成纵列(图 3(b)和(c)箭头所示), 每一个晶体都由腔膜包裹, 形成特定的空腔, 即膜腔(图 3(c)无尾箭头所示)^[2,27,49]. 晶异细胞中含有许多小囊泡(图 3(d)箭头所示), 这些小囊泡可能是通过融合方式调节腔膜形成的(图 3(d)插图箭头所示)^[27]. 膜腔和包裹膜腔的基质分子能调控晶体的形成^[27,30,49,90]: 主要是通过调节钙和草酸进入空腔的速率来控制晶体的生长速度和形貌^[30]. 钙离子跨膜转运机制尚不完全清楚. 可能性之一是钙直接从细胞质运到液泡; 二是通过基质蛋白的转运和囊泡融合运送到液泡内^[27,33]. 转运子将钙运输到液泡溶液中后, 扩散到正在生长的晶面上或针晶体的两端, 驱动晶体生长^[91]. 从晶异细胞中分离出的基质蛋白含有大量的酸性氨基酸, 具有较强的结合钙的能力^[33], 这将影响晶体成核、成核后的生长及最终的形貌. 液泡调控晶体的形貌, 同时协调晶体生长和细胞增大. 通常当晶异细胞膨胀到最大尺寸时, 晶体就会停止生长^[9].

(2) 草酸钙晶体在细胞内的调控. 在生物学上, 有关调控矿物形成存在两种假说, 即生物诱导和基质调控. 生物诱导形成的矿物形状与无机条件下形成的相似, 并且晶体的生长方向是随机的. 而基质调控是指生物体内的基质包括蛋白、多糖、脂蛋白和糖蛋白等为晶体的成核提供一个框架, 或者调控晶体的生长方向、速度和晶体形貌, 从而形成某种特定的晶体^[92].

调控晶体生长的蛋白既有晶异细胞上的蛋白(图 4(a))又有晶体内的蛋白(图 4(b)), 这些蛋白很有可能协同作用, 调控晶体的生长. 基质物质分为 3 个部分, 单个晶体内的水溶性及非水溶性基质(图 4(b))^[10,33]、晶体外与晶体相连的晶体腔基质^[49,51]和包裹晶体腔的富含碳水化合物的水溶性或非水溶性基质(图 4(a))^[49,89].

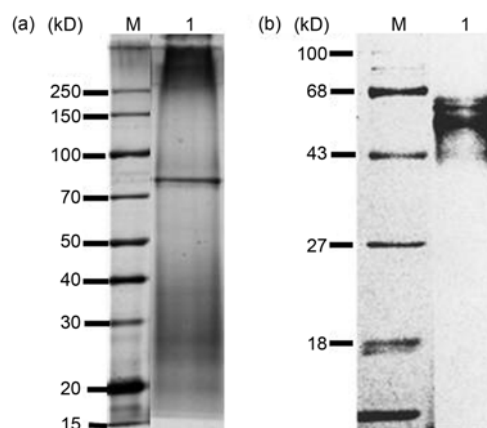


图 4 基质蛋白 SDS-PAGE 的银染分析

(a) 香蕉(*Musa cavendishii*)叶柄中针晶异细胞中溶于去污剂(非水溶性)的基质(作者未发表数据); (b) 大藻(*Pistia stratiotes*)叶片草酸钙晶体溶于甲酸(非水溶性)的基质^[33]. M, 标准蛋白; 1, 蛋白样品

这 3 种基质中存在调控晶体生长的碳水化合物^[49]和蛋白^[10,33,49,93,94], 其中有些蛋白是 3 种基质共有的^[33]. 对于与晶体相连的基质部分, 水溶性基质蛋白占晶体重量的 0.02%~0.10%, 而晶体内的蛋白占总的水溶性蛋白的 60%^[10], 晶体内非水溶性基质蛋白占晶体重量的 0.01%^[33]. 对于晶体外且与晶体相连的晶体腔基质和包裹晶体腔的富含碳水化合物的基质来说, 存在一种含有多聚糖的水溶性基质, 它包括一个独特的葡聚糖醛酸、阿拉伯糖、半阿拉伯糖和许多具有 N-连接糖蛋白的复杂碳水化合物特征的甘露糖单元. 碳水化合物可调控晶体的生长, 例如葡聚糖醛酸可能有抑制晶体生长的作用^[49]. 该水溶性基质还存在两种分子量分别为 60 和 70 kD 的蛋白^[49], 其中 70 kD 的蛋白是与热休克同源蛋白 (HSP70)相互作用的蛋白 (HIP), 该蛋白富含谷氨酸和天冬氨酸^[93], 对晶体成核有促进作用^[49]. 与晶体相连的水溶性基质蛋白, 也能够调控晶体的生长^[10,51].

在草酸钙晶体形成的过程中, 钙结合蛋白(calcium binding protein, CBP)起着至关重要的调控作用^[33], 该类蛋白主要包括钙网蛋白(calreticulin)^[20,88]和收钙素(calsequestrinlike)^[89], 这两种蛋白主要存在于细胞的内质网中^[88,89]. Bijarnia 等人^[20]从菜豆(*Dolichos biflorus*)种子中分离出一种新的蛋白二聚体, 其分子量为 98 kD, 等电点为 4.79, 与豌豆(*Pisum sativum*)中钙网蛋白的相似度最高, 该蛋白富含酸性氨基酸, 体外试验证实该蛋白能抑制草酸钙的结晶, 并且幼嫩叶片上钙网蛋白的表达量高于老叶片上的^[88]. 大

藻叶片的晶异细胞中存在一种类收钙素(Calsequestrinlike)的钙结合蛋白, 分子量为 42 kD, 富含天冬氨酸, 具有较高的 Ca^{2+} 容量但亲和性低, 从而起到缓冲 Ca^{2+} 的作用^[89]. 然而真正能直接调控晶体的成核、生长和形貌的蛋白, 应该是位于晶体内部的蛋白. Li 等人^[33]对草酸钙晶体内的蛋白进行了研究. 先是从大藻叶片分别分离出少量的高度纯化针晶体和晶簇两种草酸钙晶体样品, 在晶体中加入 SDS(十二烷基硫酸钠, sodium dodecyl sulfate)并煮沸, 目的是去除晶体表面的蛋白, 再加入 EDTA(乙二胺四乙酸, ethylenediaminetetraacetic acid)以溶解不溶的草酸钙从而暴露出晶体内部的基质, 试验表明, 溶于 EDTA 的基质不存在蛋白, 而不溶部分的基质用 78%(体积比)的甲酸提取后, 经 SDS-PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳)和银染检测发现针晶体和晶簇含有 3 种相同的蛋白条带, 其中一种蛋白含量较多, 分子量为 55 kD, 另外两种蛋白含量较少, 分子量分别为 60 和 63 kD. 因为大量的分离单种晶体较为困难, 需要长时间的晶体积聚才能对蛋白进行进一步研究, 而混合晶体相对的分选速度要快得多, 这也是植物体中单种晶体蛋白进展缓慢的主要原因. 故 Li 等人^[33]又提取了针晶体和晶簇的混合晶体, 并用同样的方法得到混合晶体内的非水溶性蛋白, 电泳结果显示存在与单种晶体相同的 3 个蛋白条带(图4(b)). 对混合晶体内的基质蛋白进行氨基酸组分分析, 发现这种非水溶性基质富含酸性氨基酸, Gln/Glu(谷氨酰胺/谷氨酸)和 Asn/Asp(天冬酰胺/天冬氨酸)占基质蛋白的 20 mol%, 具有较强的钙结合能力. Bouropoulos 等人^[10]从烟草(*Nicotiana tabacum*)和番茄(*Lycopersicon esculentum*)中分离出纯的假四面体(pseudo-tetrahedral)的 COM, 用 KOH 75℃加热 30 min, 以去除晶体表面的蛋白, 超声波破碎晶体暴露出晶体内的基质, 通过透析和 Dowex 50WX8 阳离子交换树脂相结合的方法得到针晶体内的水溶性蛋白, 将蛋白水解后用反相高效液相的方法进行氨基酸的分离, 结果表明, 该蛋白富含甘氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和丝氨酸, 能促进晶体成核并调控晶体形貌, 这也许是这种假四面体晶体具有天然金字塔形的独特手性形态的原因. 所以, 晶体内的既存在水溶性蛋白又存在非水溶性蛋白, 推测这些蛋白在晶体形成过程充当不同的角色, 但同等重要.

在植物体内(*in vivo*)蛋白究竟是怎样调控草酸钙晶体生长的? 例如: 菜豆(*Phaseolus vulgaris*)种皮中的蛋白通过蛋白间的协同作用, 影响大分子物质的专一性, 抑制晶体成核, 并通过影响{120}面来调控晶体的形貌^[51]. 而在烟草(*Nicotiana tabacum*)和番茄(*Lycopersicon esculentum*)中, 水溶性基质蛋白中含有氨基 I (Amide I)峰, 波数为 1630 cm^{-1} , 即蛋白为 β -折叠构象, 这种构象有利于蛋白的羧基与钙离子结合, 能促进晶体的成核, 并优先促进{120}面的生长^[10]. 而 Fischer 等人^[94]研究了不同长度的 L-谷氨酸肽链对草酸钙亚稳态晶相稳定性的影响. 这种酸性氨基酸的肽段能抑制晶体的成核和生长, 并调控晶体的形貌和晶相, 还指出不仅仅是羧基的数量影响了晶体的形态、晶相和稳定性, 肽链的长度也是影响晶体重要因素, 较长的肽链能够增强 COD 的稳定性. 目前, 还未从植物的草酸钙晶体中分离鉴定出一种调节晶体生长的蛋白, 植物体内蛋白对晶体生长的调控机制也有待进一步地研究.

如上所述, 除基质分子对晶体生长起着重要的调控作用外, 还存在许多其他调控晶体生长的因素. 首先是晶体水化状态的影响^[9], 生物体中形成一种特定矿物结构是先形成一个稳定有序的且水化状态也逐渐趋于稳定的晶核, 从而可以更好地调控晶体的形成, 保证晶体大小、形状的均一^[95]. 草酸钙晶体存在三种水化状态: 一水草酸钙(calcium oxalate monohydrate, COM), $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (whewellite), 属于单斜晶系; 二水草酸钙(calcium oxalate dihydrate, COD), $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (weddelite), 属于四方晶系; 三水草酸钙(calcium oxalate trihydrate, COT), $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 属于三斜晶系. 三种晶相中 COM 是热力学最稳定相, 其次是 COT 和 COD, 植物草酸钙晶体中一般以 COM 形式存在, 少数以 COD 形式存在^[2]. 几乎很难发现 COT 形式的晶体, 但它很有可能是 COM 和 COD 形成的前体相^[96]. 其次, 钙和草酸的相对含量影响着晶体的形态^[55]. 再次, 晶体生长速度和形貌由晶室和基质大分子共同控制^[9,17], 特定分隔的细胞空间也是重要的调控因子, 针形的草酸钙晶体主要是在膜分隔的空间内形成, 因此很难在体外通过化学方法合成针状的草酸钙晶体. 此外, 在晶砂中存在非常特殊的额外表达的晶面, 这些面在化学合成条件下也是不可能出现的. 例如在茄科(Solanacea)植物中, 晶体形状是假四面体(pseudotetrahedral)且具有手性(图

2(c))^[10]. 这些专一性晶面(如 $(\bar{1}32)$ 面)比相邻的其他面生长更快,但在形貌上却很稳定^[58]. 我们知道化学合成的单斜草酸钙晶体属于 $P2_1/n$ 空间群,它具有中心对称的形貌不可能存在手性. 手性出现的唯一原因是膜包覆的晶室内可能存在特定的生物分子,它们对这些特殊晶面的快速生长具有稳定作用. 晶室的外包被膜将结晶空间从液泡溶液中分隔开,从而使 pH、离子强度和过饱和度(钙离子浓度)等可能被调节. 另外,晶室的特定空间中也许含有特殊的生物分子,它们可以对结晶过程(尤其是早期成核阶段)和晶体形貌施加不同的影响,因此理解生物分子和生长的晶面间的相互作用是至关重要的. 最近的结果表明:磷酸钙纳米晶被表面上强烈结合的柠檬酸分子(密度大约是一个分子/ 4 nm^2 ,即纳米晶表面的六分之一被柠檬酸分子所覆盖)而稳定,从而控制了纳米晶的厚度(大约 3 nm)同时也提高了骨的力学特性^[97].

3 草酸钙在离体条件下结晶的分子机制

目前,借助溶液化学和表面物理化学方法调查生物分子对人体肾结石(主要组成也是一水草酸钙^[97,98])形成的分子机制的研究相对较为深入. 这些已有的研究成果对理解植物体内草酸钙的生物矿化机制具有重要的借鉴作用.

借助原位原子力显微镜(*in situ* AFM), OPN 蛋白(Osteopontin, 一个富含天冬氨酸的尿蛋白)和柠檬酸分子分别在调控草酸钙结晶过程中所体现出的位置(面)专一性作用(site-specific interactions)已经完全被揭示,它是目前理解分子尺度下草酸钙生物矿化机制最重要的化学概念之一^[99,100]. 作为调控分子(添加或杂质分子),柠檬酸对草酸钙矿物表面生长的抑制可通过经典的 C-V 模型加以定量解释. 添加分子(图 5(a)中红色圆点)吸附到台缘(step edges)上阻止了台阶移动(step pinning)的 C-V 模型有两个主要参数^[101]: 添加分子的平均间距 L_i 和台阶临界半径 r_c . 在微观尺度下看,台阶由许多漂浮的扭折(kink)组成,但在介观尺度下,它变弯曲且曲率半径由 L_i 决定. 依据 Gibbs-Thomson(G-T)效应^[102,103],台阶弯曲导致过饱和度降低;越过杂质分子后台阶移动速度 v_i 是由 L_i/r_c 决定. C-V 模型认识到 G-T 关系可解释通过添加或杂质分子结合到晶面台缘上,从而阻断新生长单元黏附到相应位置上,导致明显的生长抑制,这表现在直台阶变弯曲且粗糙(图 5(b)),同时台阶移动速度明显

变慢. 在草酸钙-柠檬酸体系中,柠檬酸选择性结合到草酸钙的 $(\bar{1}01)$ 面(带正电),而对 (010) 面(带负电)的影响较小. 这是由于柠檬酸分子的羧基和草酸钙晶格上钙离子的配位作用,以及柠檬酸分子的羟基和草酸根作用后形成氢键,使得柠檬酸在 $(\bar{1}01)$ 面获得最大的结合能,因此选择性结合到 $(\bar{1}01)$ 面而阻断台阶的移动(图 5(b))^[104]. 面专一性作用和微观 C-V 模型也同样适用于解释柠檬酸对草酸钙体相生长和形貌的影响^[98].

台阶移动速度和溶液过饱和度以及生长的动力学系数(β)有关,而 β 和台阶上的扭折密度(n_k)成正比. 考虑到吸附在扭折上的柠檬酸分子也可以使台阶速度减慢(通过扭折阻滞, kink blocking),因此,随着柠檬酸浓度的增加 β 将变小. 柠檬酸在晶面上的吸附可用 Langmuir 吸附动力学公式描述. 考虑 β 的影响后,修订后的 C-V 模型可精确地描述柠檬酸对草酸钙 $(\bar{1}01)$ 晶面上台阶速度的影响^[105]:

$$v_i/v_0 = \left(1 - A_3 \left(\frac{A_2 C_i}{1 + A_2 C_i}\right)^{0.5}\right) \left[1 - \frac{e^{A_1 \left(\frac{A_2 C_i}{1 + A_2 C_i}\right)^{0.5}} - 1}{e^\sigma - 1}\right], \quad (1)$$

其中 $A_1 = [2\gamma_{\text{riser}}(\Omega h)^{0.5}]/(B_1 k_B T)$, $A_2 = k_A/k_D$ 和 $A_3 = [\gamma_{\text{riser}}(\Omega h)^{0.5}]/n_{k0}$. C_i 是柠檬酸浓度, σ 是草酸钙在溶液中生长的过饱和度, γ_{riser} 是单位台阶高度下的台缘自由能, Ω 是草酸钙固体的分子体积, h 是台阶高度, k_B 是 Boltzmann 常数, T 是温度, v_0 和 n_{k0} 分别是在纯溶液中的台阶移动速度和台阶上的扭折密度, k_A 和 k_D 分别是杂质分子(柠檬酸)在晶面上黏附和脱附的速率系数^[105]. 此外,改变背景电解质也可导致台阶速度和晶面形貌的变化,其中 KCl 的影响最小, NaCl 影响最大,前者的动力学系数 β 几乎是后者的 3 倍^[106].

然而有趣的是, OPN 分子在草酸钙 $(\bar{1}01)$ 面上吸附后并不明显影响台阶的生长动力学,而是显著地抑制 (010) 面的台阶移动(台阶变粗糙)^[21,107]. 为了理解 OPN 蛋白的作用方式和模拟它的活性区域,人工合成了富含天冬氨酸的含有 27 个残基的多肽(DDDS)₆DDD(简称为 DDDS, D=天冬氨酸, S=丝氨酸),以用于离体调查 OPN 及相关分子对草酸钙结晶的调控. 原位 AFM 的研究发现 DDDS 对 (010) 和 $(\bar{1}01)$ 面都有作用,并且修饰了晶面形貌和抑制台阶生长

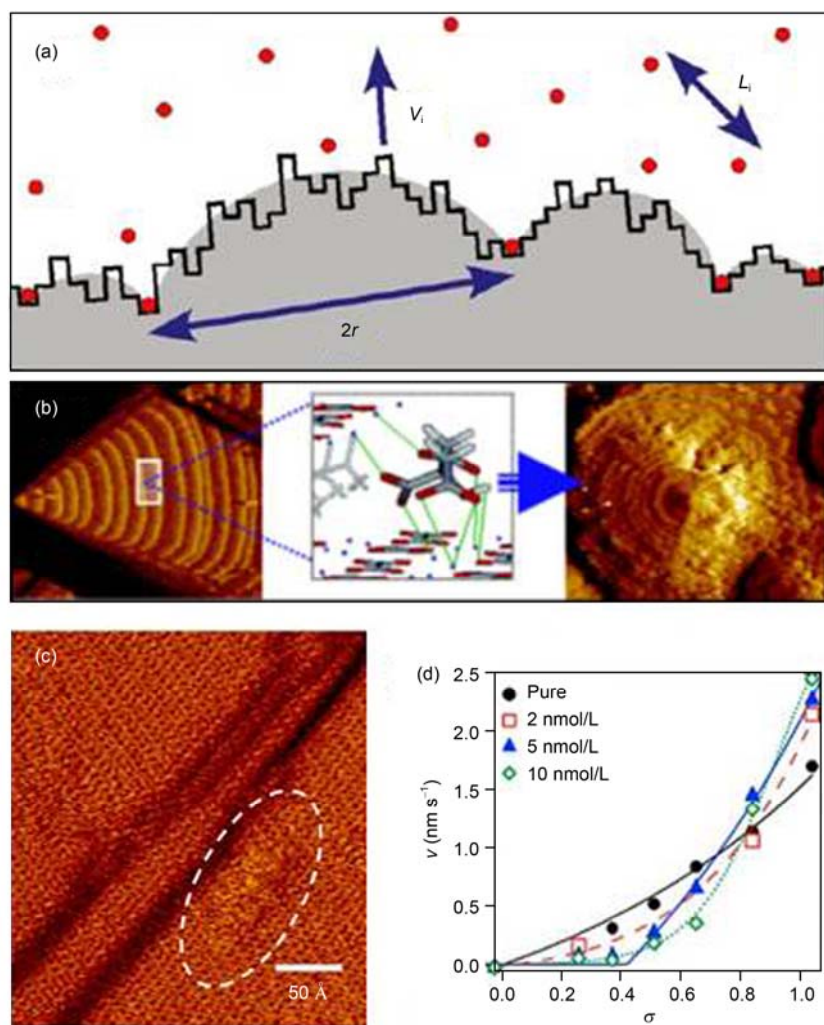


图 5 草酸钙结晶的分子机制

(a) 添加/杂质分子(红色圆点)阻止台阶移动(速度为 v_i)的 C-V 模型示意图. 添加分子的平均间距为 L_i , 台阶临界半径为 r_c ^[102]. (b) AFM 和分子模拟指出柠檬酸分子选择性地结合到草酸钙($\bar{1}01$)面的原子台阶上, 进而阻断了台阶移动^[104]. (c) 高分辨 AFM 显示了吸附在(010)面平台上的 DDDs 团簇, 其中之一接近台阶(点状椭圆圈点), 另一个在台阶的上方. 图中的晶格是清晰可见的^[110]. (d) 在不同的 DDDs 浓度下, 台阶移动速度和过饱和度间的关系^[110]

动力学^[108]. 而 DDDG(G=甘氨酸)的抑制作用要小得多, 其原因可能与多肽序列中甘氨酸的疏水性有关, 这使 DDDG 在溶液中相对不稳定而趋向折叠, 从而使序列中天冬氨酸和草酸钙晶面作用的有效羧基数目减小, 减弱了结合强度. 分子模拟结果指出, 通过将 OPN 序列中的丝氨酸磷酸化后, OPN 结合到草酸钙($\bar{1}01$)面的结合能显著增加, 这表明带负电的磷酸根和草酸钙晶面的静电作用加强, 从而提高了结合强度, 显著地抑制草酸钙成核和成核后的生长^[109].

最近, 使用亚纳米级高分辨率的 AFM 可看到草酸钙晶体表面单个原子层. 图 5(c)清晰显示了吸附在

平台上的多肽(DDDS)团簇. 高分辨 AFM 的动力学研究深入揭示了 DDDs 和草酸钙晶面的多重作用(促进或抑制晶面生长, 以及在两种不同状态间的转换)^[110]: 在较低过饱和度或较高的肽浓度下, DDDs 可在(010)面上形成表面吸附的团簇(surface-adsorbed clusters, 大小为 10 nm 左右), 进而阻止台阶的移动(图 5(d)). 团簇通过 van der Waals 作用, 非专一性黏附在草酸钙晶面平台上. 通常它和晶面的作用较弱, 而只有在高浓度下(团簇密度高, 在晶面平台上的覆盖率也高), DDDs 对生长的抑制显著; 在较高过饱和度或较低的肽浓度下, 溶质分子黏附到晶面平台/台阶/扭折上

的速率提高(即 DDDS 提高了面生长速度)。加速效应可能与序列中的天冬氨酸分子有关,它们可能提高了晶面钙离子的解溶剂化能力,即通过取代水分子使溶质分子黏附到晶面的能垒降低,从而加速了台阶移动,促进其生长^[11]。解溶剂化作用是晶体生长过程中速度限制的关键步骤^[12]。在 2.3 部分提到植物中调控草酸钙晶体生长的蛋白大部分为酸性氨基酸,含有丰富的谷氨酸和天冬氨酸^[20,88,89,93],可以调控(促进或抑制)矿物的生长,这和它们本身的生物化学特性有关,尤其是它们的亲水性和带电性^[113]。

4 结论和研究展望

在植物体内分布广泛、形态多种多样的草酸钙晶体是一个高度调控的复杂产物,它们在细胞内外的沉积现象表明,草酸钙晶体的形成不是一个简单的化学沉淀反应,它们不仅受生物分子的影响(可促进或抑制晶体生长),而且被细胞和膜定义的空间精确地调控。特化细胞的发育与晶核生长以及细胞膨胀存在显著的协同作用。而最关键的生物大分子在晶体形成过程中的调控机制仍然不完全清楚,对应的蛋白结构和功能研究更是缺乏。结合各种生物化学和细胞化学方法,分析和观测晶体在植物体内形成

的过程,尤其是特异细胞(包括膜包覆的空间)、生物基质分子和矿物间的相互作用,将有可能揭示植物草酸钙的矿化机制。近年来,通过化学诱变的方法,在遗传模式植物蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中得到几种草酸钙晶体的突变体^[4],从而为研究草酸钙晶体的形成提供了新线索。此外,明确草酸生物合成途径、钙和草酸在晶异细胞中的转运,将有助于揭示在有机-无机的协同作用下草酸钙晶体的生物矿化机制。通过超微结构、生理、生化和遗传方法的结合,为系统分析有机酸、多肽/蛋白(包括糖蛋白)、多糖和脂类分子对草酸钙晶体形成的调控作用提供相应技术手段。结合离体条件下的溶液化学和表面化学研究方法,特别是利用原位 AFM,在近分子尺度下调查以上生物分子甚至细胞对结晶动力学过程的影响,将是未来一个主要的研究方向。由于植物体内草酸钙形成的复杂性,目前仍有许多问题尚待解决,例如,抗坏血酸形成草酸的生物通道;在草酸和钙源同时存在下(溶液相对过饱和),细胞是如何控制晶体的有序合成。了解以上问题不仅有助于揭示草酸钙的生物矿化机制,同时借助植物体内草酸钙形成的生物化学过程,为推进抑制人体内结石的植物药物开发或为基因疗法治疗结石疾病提供理论依据。

参考文献

- 1 Van Leeuwenhoek A. Other microscopical observations, made by the same, about the texture of the blood, the sap of some plants, the figure of sugar and salt, and the probable cause of the difference of their fasts. *Philos Trans R Soc Lond*, 1675, 10: 380–385
- 2 Pennisi S V, McConnell D B, Gower L B, et al. Intracellular calcium oxalate crystal structure in *Dracaena sanderiana*. *New Phytol*, 2001, 150: 111–120
- 3 Levy-Lior A, Weiner S, Addadi L. Achiral calcium-oxalate crystals with chiral morphology from the leaves of some solanacea plants. *Helvetica Chimica Acta*, 2003, 86: 4007–4017
- 4 Nakata P A, McConn M M. Isolation of *Medicago truncatula* mutants defective in calcium oxalate crystal formation. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1097–1104
- 5 Webb M A. Cell-mediated crystallization of calcium oxalate in plants. *Plant Cell*, 1999, 11: 751–761
- 6 Lersten N R, Horner H T. Crystal macropatterns in leaves of Fagaceae and Nothofagaceae: A comparative study. *Plant Syst Evol*, 2008, 271: 239–253
- 7 Hudgins J W, Kreckling T, Franceschi V R. Distribution of calcium oxalate crystals in the secondary phloem of conifers: A constitutive defense mechanism? *New Phytol*, 2003, 159: 677–690
- 8 Cote G G. Diversity and distribution of idioblasts producing calcium oxalate crystals in *Dieffenbachia seguine* (Araceae). *Am J Bot*, 2009, 96: 1245–1254
- 9 Franceschi V R, Nakata P A. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Ann Rev Plant Biol*, 2005, 56: 41–71
- 10 Bouropoulos N, Weiner S, Addadi L. Calcium oxalate crystals in tomato and tobacco plants: Morphology and *in vitro* interactions of crystal-associated macromolecules. *Chem Eur J*, 2001, 7: 1881–1888
- 11 Libert B, Franceschi V R. Oxalate in crop plants. *J Agric Food Chem*, 1987, 35: 926–938
- 12 Franceschi V R. Oxalic acid metabolism and calcium oxalate formation in *Lemna minor* L. *Plant Cell Environ*, 1987, 10: 397–406

- 13 Yang J C, Loewus F A. Metabolic conversion of *L*-ascorbic acid to oxalic acid in oxalate-accumulating plants. *Plant Physiol*, 1975, 56: 283–285
- 14 Keates S A, Tarlyn N, Loewus F A, et al. *L*-ascorbic acid and *L*-galactose are sources of oxalic acid and calcium oxalate in *Pistia stratiotes*. *Phytochemistry*, 2000, 53: 433–440
- 15 Xu H W, Ji X M, He Z H, et al. Oxalate accumulation and regulation is independent of glycolate oxidase in rice leaves. *J Exp Bot*, 2006, 57: 1899–1908
- 16 Xiong T C, Bourque S, Lecourieux D, et al. Calcium signaling in plant cell organelles delimited by a double membrane. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763: 1209–1215
- 17 Hoyer J R, Asplin J R, Otvos L. Phosphorylated osteopontin peptides suppress crystallization by inhibiting the growth of calcium oxalate crystals. *Kidney Int*, 2001, 60: 77–82
- 18 Kurutz J W, Carvalho M, Nakagawa Y. Nephrocalcin isoforms coat crystal surfaces and differentially affect calcium oxalate monohydrate crystal morphology, growth, and aggregation. *J Cryst Growth*, 2003, 255: 392–402
- 19 Letellier S R, Lochhead M J, Campbell A A, et al. Oriented growth of calcium oxalate monohydrate crystals beneath phospholipid monolayers. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1380: 31–45
- 20 Bijarnia R K, Kaur T, Singla S K, et al. A novel calcium oxalate crystal growth inhibitory protein from the seeds of *Dolichos biflorus* (L.). *Protein J*, 2009, 28: 161–168
- 21 Wang L J, Zhang W, Qiub S R, et al. Inhibition of calcium oxalate monohydrate crystallization by the combination of citrate and osteopontin. *J Cryst Growth*, 2006, 291: 160–165
- 22 Scheffel A, Gruska M, Faivre D, et al. An acidic protein aligns magnetosomes along a filamentous structure in magnetotactic bacteria. *Nature*, 2006, 440: 110–114
- 23 Suzuki M, Saruwatari K, Kogure T, et al. An acidic matrix protein, pif, is a key macromolecule for nacre formation. *Science*, 2009, 325: 1388–1390
- 24 Pueschel C M, West J A. Cytoplasmic streaming of calcium oxalate crystals in *Callipsygma wilsonis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Phycol Res*, 2007, 55: 278–285
- 25 Pueschel C M, West J A. Calcium oxalate crystals in the marine red alga *Spyridia filamentosa* (Ceramiales; Rhodophyta). *Phycologia*, 2007, 46: 565–571
- 26 Barabé D, Lacroix C, Chouteau M, et al. On the presence of extracellular calcium oxalate crystals on the inflorescences of Araceae. *Bot J Linn Soc*, 2004, 146: 181–190
- 27 Mazen A M A, Zhang D Z, Franceschi V R. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: Physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. *New Phytol*, 2003, 161: 435–448
- 28 Korth K L, Doege S J, Park S H, et al. *Medicago truncatula* mutants demonstrate the role of plant calcium oxalate crystals as an effective defense against chewing insects. *Plant Physiol*, 2006, 141: 188–195
- 29 Volk G M, Goss L J, Franceschi V R. Calcium channels are involved in calcium oxalate crystal formation in specialized cells of *Pistia stratiotes* L. *Ann Bot*, 2004, 93: 741–753
- 30 Volk G M, Lynch-Holm V J, Kostman T A, et al. The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biol*, 2002, 4: 34–45
- 31 Kostman T A, Franceschi V R, Nakata P A. Endoplasmic reticulum sub-compartments are involved in calcium sequestration within raphide crystal idioblasts of *Pistia stratiotes* L. *Plant Sci*, 2003, 165: 205–212
- 32 Franceschi V R. Calcium oxalate formation is a rapid and reversible process in *Lemna minor* L. *Protoplasma*, 1989, 148: 130–137
- 33 Li X X, Zhang D Z, Lynch-Holm V J, et al. Isolation of a crystal matrix protein associated with calcium oxalate precipitation in vacuoles of specialized cells. *Plant Physiol*, 2003, 133: 549–559
- 34 Salinas M L, Ogura T, Soffchi L. Irritant contact dermatitis caused by needle-like calcium oxalate crystals, raphides, in *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. *Contact Dermatitis*, 2001, 44: 94–96
- 35 Horner H T, Kausch A P, Wagner B L. Ascorbic acid: A precursor of oxalate in crystal idioblasts of *Yucca torreyi* in liquid root culture. *Int J Plant Sci*, 2000, 161: 861–868
- 36 Julian C G, Bowers P W. The nature distribution of daffodil pickers' rash. *Contact Dermatitis*, 1997, 37: 259–262
- 37 Zone S. Raphides in palm embryos and their systematic distribution. *Ann Bot*, 2004, 93: 415–421
- 38 Lesniewska J, Och B, Charzynska M. Tapetal raphides of *Tradescantia bracteata*: The strategy of their transport from anther to stigma. *Acta Biol Cracov Ser Bot*, 2005, 47: 70
- 39 Osuji J O, Ndukwu B C. Probable functions and remobilisation of calcium oxalates in *Musa* L. *Afri J Biotech*, 2005, 4: 1139–1141
- 40 Igersheim A, Buzgo M, Endress P K. Gynoecium diversity and systematics in basal monocots. *Bot J Linn Soc*, 2001, 136: 1–65

- 41 Franceschi V R. Calcium oxalate in plants. *Trends Plant Sci*, 2001, 6: 331
- 42 Katayama H, Fujibayashi Y, Nagaoka S, et al. Cell wall sheath surrounding calcium oxalate crystals in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 2007, 231: 245–248
- 43 Sharawy S M. Numerical taxonomic evaluation of calcium oxalate and calcium carbonate crystals in the leaves of certain *Ficus* species (Moraceae). *Feddes Repert*, 2004, 115: 441–452
- 44 Demiray H. Calcium oxalate crystals of some *Crataegus* (Rosaceae) species growing in Aegean region. *Biol Bratislava*, 2007, 62: 46–50
- 45 Coelho E G, Amaral A C F, Ferreirab J L P, et al. Calcium oxalate crystals and methyl salicylate as toxic principles of the fresh leaves from *Palicourea longiflora*, an endemic species in the Amazonas state. *Toxicon*, 2007, 49: 407–409
- 46 Rinallo C, Modi G. Content of oxalate in *Actinidia deliciosa* plants grown in nutrient solutions with different nitrogen forms. *Biol Plantarum*, 2002, 45: 137–139
- 47 严巧娣, 苏培玺, 陈宏彬, 等. 五种 C₄ 荒漠植物光合器官中含晶细胞的比较分析. *植物生态学报*, 2008, 32: 873–882
- 48 Franceschi V R. Developmental features of calcium oxalate crystal sand deposition in *Beta vulgaris* L leaves. *Protoplasma*, 1984, 120: 216–223
- 49 Webb M A, Cavaletto J M, Carpita N C, et al. The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *Plant J*, 1995, 7: 633–648
- 50 Arnott H J, Webb M A. Twinned raphides of calcium oxalate in grape (*Vitis*): Implications for crystal stability and function. *Int J Plant Sci*, 2000, 161: 133–142
- 51 Jáuregui-Zúñiga D, Reyes-Grajeda J P, Moreno A. Modifications on the morphology of synthetically-grown calcium oxalate crystals by crystal-associated proteins isolated from bean seed coats (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Sci*, 2005, 168: 1163–1169
- 52 Park S H, Doege S J, Nakata P A, et al. *Medicago truncatula*-derived calcium oxalate crystals have a negative impact on chewing insect performance via their physical properties. *Entomol Experi App*, 2009, 131: 208–215
- 53 Nakata P A, McConn M M. Influence of the calcium oxalate defective4 (cod4) mutation on the growth, oxalate content, and calcium content of *Medicago truncatula*. *Plant Sci*, 2003, 164: 617–621
- 54 Gonzalez J A Z, Costa M D, Silva I R, et al. Accumulation of oxalic acid and calcium crystals in eucalypt ectomycorrhizas. I—Oxalic acid production and nutrient concentration in fine lateral roots colonized with ectomycorrhizal fungi. *Rev Bras Ciênc Solo*, 2009, 33: 541–553
- 55 Molano-Flores B. Herbivory and calcium concentrations affect calcium oxalate crystal formation in leaves of *Sida* (Malvaceae). *Ann Bot*, 2001, 88: 387–391
- 56 Lersten N R, Horner H T. Crystal diversity and macropatterns in leaves of Oleaceae. *Plant Syst Evol*, 2009, 282: 87–102
- 57 Paiva E A S, Machado S R. Role of intermediary cells in *Peltodon radicans* (Lamiaceae) in the transfer of calcium and formation of calcium oxalate crystals. *Braz Arch Biol Technol*, 2005, 48: 147–153
- 58 Prywer J. Theoretical analysis of specific evolution of some faces of plant COM crystals. *CrystEngComm*, 2009, 11: 196–202
- 59 Kaplan H C A, Buyukkartal H N. Calcium oxalate crystals in leaves of *Quercus cerris* L And *Q Ilex* L. *Bangladesh J Bot*, 2009, 38: 103–105
- 60 Meric C. Calcium oxalate crystals in some species of the tribe inuleae (asteraceae). *Acta Biol Cracov Ser Bot*, 2009, 51: 105–110
- 61 Bremer B, Bremer K, Chase M W, et al. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Bot J Linn Soc*, 2009, 161: 105–121
- 62 De Costa L M, Tronto J, Constantino V R L, et al. Extraction and concentration of biogenic calcium oxalate from plant leaves. *Rev Bras Ciênc Solo*, 2009, 33: 729–733
- 63 Jáuregui-Zúñiga D, Ferrer M A, Calderon A A, et al. Heavy metal stress reduces the deposition of calcium oxalate crystals in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *J Plant Physiol*, 2005, 162: 1183–1187
- 64 Singer D M, Johnson S B, Catalano J G, et al. Sequestration of Sr (II) by calcium oxalate—A batch uptake study and EXAFS analysis of model compounds and reaction products. *Geochim Cosmochim Acta*, 2008, 72: 5055–5069
- 65 Massey L K, Roman-Smith H, Sutton R A. Effect of dietary oxalate and calcium on urinary oxalate and risk of formation of calcium oxalate kidney stones. *J Am Diet Assoc*, 1993, 93: 901–906
- 66 Holmes R P, Kennedy M. Estimation of the oxalate content of foods and daily oxalate intake. *Kidney Int*, 2000, 57: 1662–1667
- 67 Morita A, Yanagisawa O, Takatsu S, et al. Mechanism for the detoxification of aluminum in roots of tea plant (*Camellia sinensis* (L) Kuntze). *Phytochemistry*, 2008, 69: 147–153
- 68 Cessna S G, Sears V E, Dickman M B, et al. Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *Plant Cell*, 2000, 12: 2191–2199
- 69 Weir T L, Bais H P, Stull V J, et al. Oxalate contributes to the resistance of *Gaillardia grandiflora* and *Lupinus sericeus* to a phytotoxin produced by *Centaurea maculosa*. *Planta*, 2006, 223: 785–795

- 70 Kim K S, Min J Y, Dickman M B. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2008, 21: 605–612
- 71 Yu L, Jiang J Z, Zhang C, et al. Glyoxylate rather than ascorbate is an efficient precursor for oxalate biosynthesis in rice. *J Exp Bot*, 2010, 61: 1625–1634
- 72 Nakata P A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. *Plant Sci*, 2003, 164: 901–909
- 73 Richardson K E, Tolbert N E. Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolate oxidase. *J Biol Chem*, 1961, 236: 1280–1284
- 74 Baker P R S, Cramer S D, Kennedy M, et al. Glycolate and glyoxylate metabolism in HepG2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287: 1359–1365
- 75 Mdluli K, Booth M P, Brady R L, et al. A preliminary account of the properties of recombinant human glyoxylate reductase (GRHPR), LDHA, and LDHB with glyoxylate, and their potential roles in its metabolism. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1753: 209–216
- 76 Balmforth A J, Thomson A. Isolation and characterization of glyoxylate dehydrogenase from the fungus *Sclerotium rolfii*. *Biochem J*, 1984, 218: 113–118
- 77 Tokimatsu T, Nagai Y, Hattori T, et al. Purification and characteristics of a novel cytochrome c dependent glyoxylate dehydrogenase from a wood-destroying fungus *Tyromyces palustris*. *FEBS Lett*, 1998, 437: 117–121
- 78 Sugiyama N, Taniguchi N. Evaluation of the role of lactate dehydrogenase in oxalate synthesis. *Phytochemistry*, 1997, 44: 571–574
- 79 Loewus F. Biosynthesis and metabolism of ascorbic acid in plants and of analogs of ascorbic acid in fungi. *Phytochemistry*, 1999, 52: 193–121
- 80 Smirnoff N, Conklin P L, Loewus F A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52: 437–467
- 81 Kostman T A, Tarlyn N M, Loewus F A, et al. Biosynthesis of L-ascorbic acid and conversion of carbons 1 and 2 of L-ascorbic acid to oxalic acid occurs within individual calcium oxalate crystal idioblasts. *Plant Physiol*, 2001, 125: 634–640
- 82 Kostman T A, Koscher J R. L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase is present in calcium oxalate crystal idioblasts of two plant species. *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41: 201–206
- 83 Nakata P A, McConn M M. Isolated *Medicago truncatula* mutants with increased calcium oxalate crystal accumulation have decreased ascorbic acid levels. *Plant Physiol Biochem*, 2007, 45: 216–220
- 84 White P J. The pathways of calcium movement to the xylem. *J Exp Bot*, 2001, 52: 891–899
- 85 Yang H Q, Jie Y L. Uptake and transport of calcium in plants. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2005, 31: 227–234
- 86 White P J, Broadley M R. Calcium in plants. *Ann Bot*, 2003, 92: 487–511
- 87 White P J. Calcium channels in higher plants. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1465: 171–189
- 88 Nakata P A, Kostman T A, Franceschi V R. Calreticulin is enriched in the crystal idioblasts of *Pistia stratiotes*. *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41: 425–430
- 89 Franceschi V R, Li X X, Zhang D Z, et al. Calsequestrinlike calcium-binding protein is expressed in calcium-accumulating cells of *Pistia stratiotes*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 6986–6990
- 90 Webb M A, Arnott H J. Inside plant crystals: A study of the noncrystalline core in druses of *Vitis vinifera* endosperm. *Scan Electron Microsc*, 1983, 4: 1759–1770
- 91 Kostman T A, Franceschi V R. Cell and calcium oxalate crystal growth is coordinated to achieve high-capacity calcium regulation in plants. *Protoplasma*, 2000, 214: 166–179
- 92 Veis A. A window on biomineralization. *Science*, 2005, 307: 1419–1420
- 93 Webb M A, Cavaletto J M, Klanrit P, et al. Orthologs in *Arabidopsis thaliana* of the Hsp70 interacting protein Hip. *Cell Stress Chaperon*, 2001, 6: 247–255
- 94 Fischer V, Landfester K, Muñoz-Espí R. Stabilization of calcium oxalate metastable phases by oligo (L-glutamic acid): Effect of peptide chain length. *Cryst Growth Des*, 2011, 11: 1880–1890
- 95 Weiner S, Sagi I, Addadi L. Choosing the crystallization path less traveled. *Science*, 2005, 309: 1027–1028
- 96 Ouyang J M, Dengb S P, Zhou N, et al. Effect of tartrates with various counterions on the precipitation of calcium oxalate in vesicle solutions. *Colloid Surf A-Physicochem Eng Asp*, 2005, 256: 21–27
- 97 Hu Y Y, Rawal A, Schmidt-Rohr K. Strongly bound citrate stabilizes the apatite nanocrystals in bone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 22425–22429
- 98 Wang L J, De Yoreo J J, Guan X Y, et al. Constant composition studies verify the utility of the Cabrera Vermilyea (C-V) model in explaining mechanisms of calcium oxalate monohydrate crystallization. *Cryst Growth Des*, 2006, 6: 1769–1775
- 99 Shiraga H, Min W, Vandusen W J, et al. Inhibition of calcium oxalate crystal growth *in vitro* by uropontin: Another member of the aspartic acid-rich protein superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 426–430

- 100 De Yoreo J J, Qiu S R, Hoyer J R. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 291: 1123–1132
- 101 Cabrera N, Vermilyea D A. Growth and perfection of crystals. In: Doremus R H, Roberts B W, Turnbull D, eds. *Proceedings of an International Conference on Crystal Growth*. New York: Wiley, 1958. 393
- 102 De Yoreo J J, Zepeda-Ruiz L A, Friddle R W, et al. Rethinking classical crystal growth models through molecular scale insights: Consequences of kink-limited kinetics. *Cryst Growth Des*, 2009, 9: 5135–5144
- 103 王荔军, 鲁剑巍, 徐芳森, 等. 近分子尺度下正磷酸钙的结晶和溶解动力学. *科学通报*, 2010, 55: 2794–2802
- 104 Qiu S R, Wierzbicki A, Salter E A, et al. Modulation of calcium oxalate monohydrate crystallization by citrate through selective binding to atomic steps. *J Am Chem Soc*, 2005, 127: 9036–9044
- 105 Weaver M L, Qiu S R, Hoyer J R, et al. Improved model for inhibition of pathological mineralization based on citrate-calcium oxalate monohydrate interaction. *J ChemPhysChem*, 2006, 7: 2081–2084
- 106 Weaver M L, Qiu S R, Hoyer J R, et al. Inhibition of calcium oxalate monohydrate growth by citrate and the effect of the background electrolyte. *J Cryst Growth*, 2007, 306: 135–145
- 107 Qiu S R, Wierzbicki A, Orme C A, et al. Molecular modulation of calcium oxalate crystallization by osteopontin and citrate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 1811–1815
- 108 Wang L J, Qiu S R, Zachowicz W, et al. Modulation of calcium oxalate crystallization by linear aspartic acid-rich peptides. *Langmuir*, 2006, 22: 7279–7285
- 109 Wang L J, Guan X Y, Tang R K, et al. Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of calcium oxalate crystallization. *J Phys Chem B*, 2008, 112: 9151–9157
- 110 Friddle R W, Weaver M L, Qiu S R, et al. Subnanometer atomic force microscopy of peptide-mineral interactions links clustering and competition to acceleration and catastrophe. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 11–15
- 111 Piana S, Jones F, Gale J D. Aspartic acid as a crystal growth catalyst. *CrystEngComm*, 2007, 9: 1187–1191
- 112 Piana S, Jones F, Gale J D. Assisted desolvation as a key kinetic step for crystal growth. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 13568–13574
- 113 Elhadj S, De Yoreo J J, Hoyer J R, et al. Role of molecular charge and hydrophilicity in regulating the kinetics of crystal growth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 19237–19242

Calcium oxalate biomineralization in plants

LI XiuLi, ZHANG WenJun, LU JianWei & WANG LiJun

College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Calcium oxalate (CaOx) biomineralization with diverse and species-specific morphologies and structures formed in specialized cells (idioblast) is a basic and important process in many plant families. During their formation there exist the synergetic interactions between cell growth/expansion and crystal nucleation/growth, indicating that the mineralization process is precisely controlled by biomacromolecules through the exquisite bio-regulation mechanisms rather than a simple chemical precipitation reaction. The mineralized phases and the final mature products formed inside cells are shaped and thermodynamically stabilized by various biomacromolecules expressed and synthesized in corresponding bio-pathways. CaOx crystals in plants fulfill a variety of crucial functions, including the high-capacity calcium regulation and self-protection of plants against herbivory by large animals as well as insects, this may reflect an evolutionary signature under various environmental stresses. In this review, the possible biochemical events in relation to CaOx crystal formations *in vivo* will be discussed, especially for the oxalic acid biosynthetic pathways, the uptake and accumulation of calcium ions and modulation of crystallization as well. In addition, recent progress in dynamics of CaOx crystallization *in vitro* at the near-molecular level provides new insights into the molecular mechanisms of formation and function of CaOx crystals in plants.

plants, calcium oxalate, idioblast, biomineralization

doi: 10.1360/972012-603