

药用甘草组织培养生产黄酮的研究进展

焦艳红, 宋艳茹, 高述民*

北京林业大学生物科学与技术学院, 北京100083

摘要: 甘草是驰名中外的中药材, 有“十方九草”之称, 甘草黄酮为其主要成分之一, 不仅具有消炎保肝、抗氧化、抗肿瘤、抗病毒和抗菌等药用功效, 还可用于食品、化妆品等工业生产中。本文介绍了甘草黄酮的种类、组织化学定位, 并着重总结了黄酮的组织培养获得途径及生物合成调控的影响因素, 在此基础上, 对今后的研究及应用进行了分析和展望, 旨在为更好地开发利用甘草黄酮提供一定的依据。

关键词: 甘草; 甘草黄酮; 细胞培养; 毛状根; 不定根

Research Advances on Production of Flavonoids by Licorice Tissue Culture

JIAO Yan-Hong, SONG Yan-Ru, GAO Shu-Min*

College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

Abstract: Licorice is an important component in many Chinese traditional medicines. As its secondary metabolites, licorice flavonoids not only have antiinflammatory, antioxidative, antitumor, antiviral and antibacterial effects, but also are used in food, cosmetics and other industries. Here we briefly described the classification and histochemical localization of licorice flavonoids, the recent progresses in the production of licorice flavonoids by different tissue culture approaches the regulation of influence factors among biosynthesis were summarized simultaneously. Finally, the problems remained to be studied and the possible research directions in this field are proposed. It can support a new insight into further study on utilization of licorice flavonoids.

Key words: licorice; *Glycyrrhiza* flavonoids; cell culture; hairy root; adventitious root

甘草为豆科(Leguminosae)甘草属(*Glycyrrhiza*)的多年生草本植物, 主要以根茎入药, 具补脾益气、清热解毒、润肺止咳、缓急定痛、调和诸药之功效(张波等2006), 素有“国佬”、“十方九草”、“众药之王”、“美白皇后”等美誉。甘草黄酮占甘草有效活性成分的1%~5%, 具有较强的抗氧化、抗肿瘤、抗病毒、抗菌和消炎保肝的重要作用(Chu等2012; Park等2009)。由于甘草重要的药用价值, 使得人们对甘草进行过度采挖, 造成野生甘草濒临灭绝, 2010年我国野生甘草总蕴藏量不足50万吨(黄明进等2010), 但每年需求量至少6万吨。为了保护甘草野生资源, 器官和体外组织培养成为获得甘草次级代谢产物的替代源(Karuppusamy 2009)。国内已有许多综述文献报道过甘草的研究进展(王巧娥等2011; 张波等2006; 苏俊喜等2010), 但多数集中于黄酮的药理作用、临床应用及分离纯化方法的研究, 近两年随着分子生物学研究的深入, 人们对提高黄酮的获得方法有了更深的认识, 本文结合国内外最新的研究结果, 着重对黄酮的获得途径和生物合成调控相关内容进行综述。

1 甘草黄酮类化合物及价值

甘草活性成分主要为三萜皂苷类(4%~24%)和黄酮类(1%~5%)及少量的多糖、生物碱、木质素、有机酸、香豆素、挥发油和多种氨基酸。目前国内外学者已从甘草中分离鉴定出61种三萜皂苷类化合物和300多种黄酮类化合物(王巧娥等2011)。甘草黄酮包括黄酮类、二氢黄酮类、查尔酮类、黄酮醇类、异黄酮类和甲氧基黄酮类化合物, 主要有: 甘草苷(liquiritin)、甘草素(liquiritigenin)、异甘草苷(isoliquiritin)、异甘草素(isoliquiritigenin)、新甘草苷(neoliquiritin)、新异甘草苷(neoisoliquiritin)、鼠李糖异甘草苷(isorhamnoliquiritin)、异甘草呋喃糖苷(licurazide)、5-O-甲基甘草本定(5-O-methyllicoricidin)、甘草利酮(licoricone)、甘草醇(glycyrol)、异甘草醇(isoglycyrol)、甘草西定(lico-

收稿 2012-11-22 修定 2012-12-24

资助 国家自然科学基金(30671709); 林木育种国家工程实验室, 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室和国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室基金。

* 通讯作者(E-mail: gsm689@sohu.com; Tel: 010-62338717)。

ricidin), 此外光果甘草还特有光甘草定(glabridin) (罗祖良等2011)、甘草查尔酮A (licochalcone A)、甘草查尔酮B (licochalcone B)及光甘草轮(glyz-aglabrin) (Montoro等2011)。异甘草苷和甘草苷为二氢黄酮, 在甘草中甘草苷含量约为3.6%, 而甘草素、异甘草素的含量仅为0.1%左右(何三民和石森林2003), 为查尔酮类, 在预防和治疗肺炎、哮喘、神经退行性脑部疾病药物的研究中显示出良好的研究前景(Liu等2008; Yang等2012; Chen等2009; Xie等2009)。甘草具有很强的耐寒耐旱性, 是固沙、改良生态环境的先锋植物, 此外还可作为添加剂、香料剂应用于食品、卷烟和化妆品等工业生产中, 具有重要的生态和经济价值(Hayashi和Sudo 2009)。

2 甘草黄酮类化合物的组织化学定位

黄酮类化合物组织化学定位常用的染色剂有NaOH、MgAC、DPBA (diphenylboric acid 2-amin-oethyl ester)、硫酸-茴香醛和AlCl₃ (廖云海等2010; 葛楚源等2012; Tattini等2000; 程娟等2010)。甘草黄酮类与碱反应时, 由黄色渐变为橙色, 而与AlCl₃乙醇溶液反应时生成黄色络合物, 在荧光显微镜下呈黄绿色或蓝白色的荧光(廖云海等2010)。

甘草黄酮主要分布于叶、主根、根状茎和茎中, 但不同营养器官中的含量不同。赵则海等(2004)认为甘草总黄酮含量以叶中最高, 平均含量为叶片干重的1.39%~2.64%, 同样地廖云海等(2010)发现光果甘草营养器官中黄酮类含量为叶>根状茎>主根>茎, 叶中主要分布在表皮、腺毛、胶囊细胞、厚角组织、韧皮部和木质部中的薄壁细胞中; 茎中分布在周皮、韧皮部和粘液细胞中; 而根则分布于周皮中。此外彭励和胡正海(2007)也证实了腺毛是甘草叶片中黄酮类成分的主要积累场所, 在腺毛发育成熟的分泌期, 逐渐积累于分泌细胞及角质层下腔中。相反地也有研究认为甘草黄酮主要积累于主根中, 且含量变化与根生长年限有关, 其次为根状茎, 而叶和地上茎中的含量较低(彭励等2008)。黄酮类化合物常以苷或游离态存在于甘草中, 在开花结实期, 合成大量的游离黄酮分布在茎、叶和花中, 以抵抗病原菌的侵害, 从而使地下器官中积累的甘草苷减少, 所以研究结果的差异可能是由于材料的采集时期不同造成的。

3 获得甘草黄酮的组织培养途径

3.1 细胞培养法

细胞培养法是培养药用植物次生代谢产物的最常用的有效途径之一, 目前植物细胞培养技术已比较成熟。多数研究表明甘草愈伤组织易诱导且以下胚轴诱导愈伤率最高, 其次为子叶。MS为常用基本培养基, 在甘草愈伤诱导继代中6-BA是必不可少的, 而2,4-D利于非胚性愈伤组织的诱导、继代, 能有效提高诱导率, 但严重抑制胚性愈伤的生长。通常地NAA、6-BA和2,4-D三种激素配合使用最适合甘草愈伤组织诱导继代, 也有NAA和2,4-D分别与6-BA配合使用(文甜甜等2011; Wongwicha等2008), 此外2,4-D与KT组合也能进行悬浮继代培养, 培养周期为20 d左右。黄惠英等(2011)研究发现随着NAA和2,4-D浓度的增加, 甘草总黄酮的量和甘草酸也随之升高, 目前甘草细胞培养主要为高产细胞株系的筛选、有效成分的含量及细胞生长的影响因素(Arias-Castro等1993; Shabani等2009)、细胞培养物的药理药效(Man等2012)、悬浮细胞总黄酮含量的测定方法(文甜甜等2011)、活性成分的分离纯化及生物反应器的探讨(Wang等2010)等方面的研究。

3.2 甘草毛状根培养

自Kamada等(1986)用发状农杆菌感染颠茄建立起毛状根培养系统以来, 以培养珍贵药用植物的毛状根来获取次生代谢产物已成为国内外研究的新热点, 也被认为是继细胞培养法之后获得植物次生代谢产物的有效来源。据不完全统计, 目前在人参、西洋参、蒙古黄芪、新疆雪莲、黄芩等100余种植物均已建立了毛状根培养系统, 为获得药用植物有效次生代谢产物开辟了一条新途径。

诱导甘草毛状根的外植体主要有子叶、子叶节、叶片、茎段、下胚轴、愈伤组织, 除愈伤组织外其他均能诱导出毛状根, 且子叶节和下胚轴诱导率高, 诱导时间短。Wongwicha等(2011)用幼叶和嫩茎诱导出毛状根, 在1/2MS培养基中能快速增长。Mehrotra等(2008)研究了光果甘草外植体年龄、类型和生理状态对农杆菌转化能力及生物反应器大规模培养毛状根的影响。光照对毛状根生长有抑制作用。研究表明甘草毛状根中含有生药中的5种黄酮类化合物, 高于愈伤组织和组培苗根

中的含量, 其中甘草查耳酮含量是愈伤组织中的15.5倍(杨世海等2006)。卢虹玉等(2011)通过紫外分光光度法和HPLC检测甘草毛状根中的总黄酮含量发现不同根系中总黄酮含量差异很大, 最高接近生药根, 达0.803%; 并且大多数根系高于正常组培苗根, 总黄酮含量随着培养时间的延长呈增加趋势, 至9周时增加了68.5%。此外毛状根中的黄酮还分泌到培养液中, 最高量为每100 mL培养液1.36 mg (卢虹玉等2010)。

3.3 不定根诱导与根尖离体培养

根是许多药用植物有效成分的合成储藏器官, 根的离体培养体系是研究植物根系营养吸收和次生代谢产物合成等的重要手段。采用甘草不定根扩大培养生产黄酮类化合物, 国外未见研究报道, 国内仅见对甘草不定根诱导的报道, 但不定根继代生长缓慢, 成为以后研究解决的主要问题。张坚等(2011)对甘草外植体与外源性激素诱导不定根的能力进行了研究, 认为根为最佳外植体, 且在1/2MS添加0.5 mg·L⁻¹ NAA中生根率最高, 细胞分裂素抑制不定根的诱导。此外, 高文远等(2005)将甘草芽和子叶的愈伤组织接到MS+IBA+KT培养基上, 经15~20 d也诱导出不定根。目前甘草不定根主要是以MS为基本培养基, 通过根和叶片或甘草愈伤组织诱导而来, 而诱导不定根的激素主要为IBA、NAA单独使用(张坚等2011)或与KT组合使用(高文远等2005)。

许多实验表明离体培养的根中能产生与栽培植物含量相同或更高的有效成分(张治国等1993), 且遗传物质稳定。鲁守平等(2008)对影响乌拉尔甘草离体根尖生长的培养基、激素、维生素浓度及黄酮含量进行分析, 结果表明: B₅和1/3MS培养基中附加0.10 mg·L⁻¹ IBA, 可使离体根尖明显伸长并产生较多侧根, 此外0.50 mg·L⁻¹的VB₁可显著促进甘草离体根系的鲜重增加, 总黄酮含量可达0.75%, 高于栽培甘草的含量, 但没有检测到甘草酸的产生。梁玉玲等(2000)认为胀果甘草无菌苗根尖在1/3MS+IBA1.0 mg·L⁻¹+20 g·L⁻¹蔗糖的液体培养基中, 1个月后甘草酸含量高于所有愈伤组织含量, 且比生药含量高43.3%。此外Awad等(2011)认为MS含3%蔗糖的培养基适合甘草离体根尖培养, 甘草酸含量为1.32 mg·g⁻¹。

以上方法都为黄酮的获得提供了有效途径, 细胞培养生长快且易扩大培养, 获得的黄酮含量低于或近似于栽培甘草根和中国医药典标准, 且具有类似的抗炎作用(Man等2012), 但甘草酸生成量低, 细胞中会产生桦木酸和皂甙两种结构不同的三萜类成分(Hayashi 2009), 使药用成分不稳定, 所以在工业化生产中受到局限。毛状根和不定根均能产生与原植物相同或更高含量的次生代谢产物, 且遗传物质稳定, 比细胞培养易放大, 不定根没有外源基因导入, 在药物产品的研发方面更有优势, 更具可靠的安全保障, 特别是自韩国、日本实现人参不定根的工业化生产(Choi等2000)以来, 我国的莢膜黄芪、三七、桃儿七等中药材也逐渐建立了不定根离体培养体系, 显示了不定根培养生产次生代谢产物的巨大优越性。

4 促进组织培养中黄酮物质合成的方法

4.1 添加诱导子和前体

诱导子作为植物防御反应信号因子可刺激植物发生防御反应(Zhao等2005), 促使次生代谢产物的积累, 因此, 在植物细胞培养中添加生物和非生物诱导子是提高次生代谢物生产的最常用的有效方法。应用于植物的诱导子包括糖蛋白类、蛋白质类、多糖类及微生物类, 其中最常用的是茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MJ)、真菌碳水化合物、酵母提取物、水杨酸和NO等。次生产物的合成与诱导子的浓度、添加时间及种类等因素密切相关。研究发现MJ作为细胞信使是激发次生代谢产物产生最有效的诱导子(Wongwicha等2011)。杨英等(2008b)认为MJ在10~200 μmol·L⁻¹范围内抑制胀果甘草细胞的生长, 但促进总黄酮产量的增加。卞爱华等(2008)利用水杨酸、酵母提取物、水解酪蛋白、高糖、高盐及超声等诱导子提高了甘草悬浮细胞中甘草酸的含量。此外杨英等(2008a)还发现10 mg·L⁻¹的水杨酸能显著促进细胞生长及总黄酮含量, 并增强细胞中保护酶活性及苯丙氨酸裂解酶的活性。Zhang等(2011)在研究甘草毛状根培养提高查尔酮和总黄酮的含量的生产中加入吐温80, 发现黄酮类化合物含量的增加与mRNA水平、苯丙氨酸解氨酶, 4-香豆酸辅酶连接酶及肉桂-4-羟化酶的活性有关。此外生物与非生物诱导子协同作用是提高次生代谢的新的有效方

法, Zhang等(2009)证明了PEG8000与YE共同添加比单独添加更有利于毛状根甘草黄酮合成。

黄酮类化合物是莽草酸和多酮化途径生物合成的产物, 乙酸、苯丙氨酸和酪氨酸是黄酮类合成途径中碳架的主要来源, 所以合成前体的喂养也是提高次生代谢产量的有效途径。在植物细胞次生代谢中, 苯丙氨酸作为代谢中间体参与蛋白质的合成或作为碳源和氮源影响细胞生长, 其最佳添加浓度为 $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 苯丙氨酸、酪氨酸和乙酸钠对甘草细胞的生长没有抑制作用, 而肉桂酸浓度高于 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对细胞的生长存在抑制作用(杨英等2007)。研究表明 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 亮氨酸也能促进悬浮细胞甘草酸的合成(卞爱华等2008)。

4.2 培养条件

培养基种类、激素配比、光照时间、光颜色及培养温度也影响植物次生代谢物的生成。研究发现 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA与 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,4-D组合时, 子叶愈伤组织中甘草总黄酮量达到最高, 而当NAA为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 更有利于下胚轴愈伤组织中总黄酮量的积累, 为 $8.54 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (黄惠英等2011)。王磊(2007)认为光照比黑暗能显著提高黄酮含量, 且蓝光最利于黄酮含量的提高。

此外在细胞悬浮培养中通过物理化学、生物或非生物方法也能促进细胞培养中次生代谢物的产生, 高艳丽等(2008)通过改变培养基中硝态氮与铵态氮的比例及氮源总量, 程焕欣等(2010)用干旱胁迫, 刘颖等(2006)使用稀土元素, 均能促进愈伤细胞的生长和黄酮化合物含量。

4.3 分子生物学方法

黄酮类化合物是莽草酸途径和多酮化途径生物合成的产物, 生物合成中关键酶为苯丙氨酸解氨酶(phenylalanineammonialyase, PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)、查尔酮合酶(chalcone synthase, CHS)、查尔酮异构酶(chalcone isomerase, CHI)和黄酮合酶(flavone synthase, FNS), 近年来随着人们对黄酮合成途径及关键酶的深入研究, 利用基因工程对药用植物进行遗传改造逐渐成为促进次生代谢物合成的主要手段。

Park等(2011)通过查尔酮异构酶的过度表达促进黄芩毛状根培养中黄酮的合成, 同样地Zhang等(2009)也证实了查尔酮异构酶基因过量表达能

有效提高甘草毛状根中黄酮产量, 并认为诱导子的协同作用与合成酶基因的过表达相结合的方式更能显著促进甘草黄酮的合成, 另外CHI的异位表达, 也能显著提高转基因番茄果实中总黄酮醇的含量。研究还发现CHS与其他合成酶基因的表达具有协同作用(Tunen等1988), Lukaszewicz等(2004)将CHS与CHI、DFR(黄酮醇还原酶)基因同时转入马铃薯中, 明显提高了花色苷的含量。另外还有许多学者从反向遗传学角度, 利用基因干扰技术促进目的代谢产物的合成。Jiang等(2010)利用RNA干扰大豆黄酮合成酶基因促进异黄酮类化合物的产生。侯春喜(2009)对催化2,3-氧化鲨烯向齐敦果烷型三萜皂苷合成支路的 β -AS基因进行干扰, 有效增加了毛状根中达玛烷型人参皂苷及多种单体皂苷的含量。Liang等(2009)用携带反义CS(环阿屯醇合成酶)的农杆菌转化人参, 发现反义转化组和对照组毛状根在生长早期人参皂苷含量接近, 而在生长末期反义转化组的总皂苷含量比对照组高50%~100%。

综上所述, 次生代谢物生物合成酶基因的过量表达、多种合成酶基因的协同表达、反义技术、RNAi技术及诱导子与转基因手段相结合的方法是近年来促进药用植物次生代谢合成的重要手段, 所得出的结果说服力更强, 效果更显著, 这些新方法为更好的获得甘草次生代谢产物提供了新思路, 今后仍将是研究提高甘草黄酮含量的重要技术手段。

5 展望

组织培养生长周期短, 且不受区域、种类及季节的限制, 为进一步研究甘草活性成分的药理作用奠定了基础, 同时也有效地保护了甘草野生资源, 但仍有许多问题有待于解决, 比如如何使细胞或根器官快速稳定的生长, 如何保证活性物质在药物使用中的安全性, 是否能实现不定根的高效诱导及生物反应器大量培养, 这些问题的解决, 将会为我们今后对甘草黄酮进行更深层次的研究开辟新的领域。甘草基因工程方面虽然也取得了很大进步, 但与其他药用植物相比, 甘草遗传转化体系还不稳定, 普遍存在转化率低、基因易沉默、后代遗传不稳定等问题, 且多数还停留在实验室探索阶段, 没有进入实际生产应用。此外在

保护甘草野生资源方面应采用退耕还草、围栏封育、合理采挖等多种措施, 真正处理好甘草资源利用与生态环境保护的关系, 确保我国的甘草资源及产业可持续发展。

影响黄酮化合物积累的因素很多, 要想有效提高黄酮类次生代谢物的产量同时降低成本, 今后重点还应放在甘草代谢关键酶的分子克隆及基因工程方面, 若能同时增强多个合成酶基因的协同表达对提高黄酮产量具有更重要的意义。相信随着科学技术的不断发展, 甘草黄酮类化合物潜在的药用价值将进一步被开发出来, 作为新药开发的资源, 甘草黄酮类化合物必有广阔的前景, 将为人们的生活带来更大的好处。

参考文献

- 卞爱华, 高文远, 王娟(2008). 不同诱导子对甘草悬浮培养细胞中甘草酸积累的影响. 中国药学杂志, 43 (22): 1690~1693
- 程焕欣, 梁玉玲, 姚红宝(2010). 干旱胁迫对甘草愈伤组织总黄酮含量的影响. 安徽农业科学, 11: 5633~5635
- 程娟, 胡长鹰, 徐德平(2010). 甘草甜素与甘草苷的提取分离与结构鉴定. 食品工业科技, 31 (9): 127~129
- 高文远, 陈海霞, 郭肖红, 陈巍(2005). 甘草不定根组织培养方法. [中国专利]: CN1653886
- 高艳丽, 高山林, 焦小珂, 张晓霞, 吴炯(2008). 培养基中氮源对胀果甘草细胞悬浮培养生产黄酮类化合物的影响. 海峡药学, 20 (10): 136~139
- 葛楚源, 陈文列, 李钻芳, 廖乃顺, 黄云梅, 梁一池, 刘献祥(2012). 草珊瑚植物叶、茎显微结构与黄酮组织化学定位研究. 中国中药杂志, 37 (4): 438~441
- 何三民, 石森林(2003). HPLC法测定甘草中甘草素、异甘草素、甘草苷的含量. 中草药, 34 (7): 618~619
- 侯春喜(2009). 人参皂苷生物合成关键酶基因MVD和 β -AS的克隆及 β -AS的反义表达[学位论文]. 长春: 吉林大学
- 黄惠英, 马文芳, 陈晓燕, 王清(2011). NAA和2,4-D对甘草愈伤组织细胞染色体倍性及次生代谢物的影响. 中草药, 42 (10): 2104~2109
- 黄明进, 王文全, 魏胜利(2010). 我国甘草药用植物资源调查及质量评价研究. 中国中药杂志, 35 (8): 947~952
- 梁玉玲, 管延英, 阳丽, 王淑敏(2000). 胀果甘草愈伤组织培养及甘草酸含量分析. 河北大学学报(自然科学版), 20 (4): 365~368
- 廖云海, 陆嘉惠, 李娜, 张际昭, 李学禹(2010). 光果甘草营养器官结构及其总黄酮的组织化学定位和含量研究. 西北植物学报, 30 (12): 2406~2411
- 刘颖, 魏景芳, 李冬杰, 李俊英(2006). 稀土元素对甘草细胞生长及甘草酸合成的影响. 广西植物, 26 (1): 101~104
- 卢虹玉, 刘敬梅, 张海超, 高山林(2011). 甘草毛状根诱导培养及其黄酮含量检测的研究. 中国药学杂志, 46 (11): 814~818
- 卢虹玉, 刘义, 张海超, 高山林(2010). 甘草毛状根中甘草总黄酮和甘草酸的检测和分析. 中国现代应用药学, 27 (1): 43~46
- 鲁守平, 孙群, 杨艳春, 王建华, 孙宝启(2008). 乌拉尔甘草离体根尖培养方法的建立. 中国农学通报, 24 (2): 93~97
- 罗祖良, 李倩, 覃洁萍, 杨美华(2011). 光果甘草的研究进展. 中草药, 42 (10): 2154~2158
- 彭励, 胡正海(2007). 甘草腺毛的形态发生和组织化学研究. 分子细胞生物学报, 40 (6): 395~398
- 彭励, 胡正海, 李金亭, 张琪(2008). 甘草苷在乌拉尔甘草中的分布及其含量动态变化研究. 药物分析杂志, 28 (8): 1230~1233
- 苏俊喜, 周颖, 闫文军, 刘维平(2010). 甘草有效成分应用的研究进展. 畜牧与饲料科学, 31 (8): 111~113
- 王磊(2007). 甘草细胞培养生产甘草黄酮的条件优化及黄酮含量分析研究[学位论文]. 武汉: 华中科技大学
- 王巧娥, 任虹, 曹学丽(2011). 甘草研究开发与利用现状. 中国农学通报, 27 (4): 290~295
- 文甜甜, 高文远, 张黎明, 王娟, 吕连媛(2011). 甘草悬浮细胞总黄酮含量的测定方法. 时珍国医国药, 22 (3): 648~649
- 杨世海, 刘晓峰, 沈昕, 郑俊华(2006). 甘草Ri质粒转化及不同理化因子对甘草毛状根生长的影响. 中国中药杂志, 31 (11): 875~878
- 杨英, 何峰, 季家兴, 雷晶, 陈雪红, 余龙江(2007). 四种前体对胀果甘草细胞悬浮培养生产甘草黄酮的调控效果评价. 武汉植物学研究, 25 (5): 484~489
- 杨英, 何峰, 季家兴, 郑辉, 余龙江(2008a). 外源水杨酸对悬浮培养甘草细胞中甘草黄酮积累的影响. 植物生理学通讯, 44 (3): 504~506
- 杨英, 郑辉, 何峰, 季家兴, 余龙江(2008b). 不同浓度茉莉酸甲酯对悬浮培养的胀果甘草细胞合成甘草总黄酮的影响. 云南植物研究, 30 (5): 586~592
- 张波, 官月平, 田庆来, 刘会洲(2006). 乌拉尔甘草中黄酮类化学成分的研究进展. 中成药, 28 (9): 1362~1365
- 张坚, 高文远, 王娟, 吕连媛(2011). 甘草不定根培养的研究. 天津中医药, 28 (1): 75~77
- 张治国, 韩献忠, 蔡志光, 刘骅, 王黎, 胡欣(1993). 条叶龙胆根培养物中龙胆苦苷的产生和含量. 植物生理学报, 19 (1): 66~70
- 赵则海, 曹建国, 李庆勇, 付玉杰, 祖元刚(2004). 黑龙江省西部乌拉尔甘草总黄酮含量的动态变化研究. 植物研究, 24 (2): 235~239
- Arias-Castro C, Scragg AH, Stafford A, Rodriguez-Mendiola M (1993). Growth characteristics of *Glycyrrhiza glabra* cell suspension cultures. Plant Cell Tiss Org Cult, 34: 77~82
- Awad V, Shirke R, Mukherjee S, Khadke S, Pawar P, Meti N, Har-sulkar A (2011). Somatic embryogenesis, regeneration and *in vitro* production of glycyrrhizic acid from root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 47: 525~535
- Chen ZA, Wang JL, Liu RT, Ren JP, Wen LQ, Chen XJ, Bian GX (2009). Liquiritin potentiates neurite outgrowth induced by nerve growth factor in PC12 cells. Cytotechnol, 60: 125~132
- Choi SM, Son SH, Yun SR, Kwon OW, Seon JH, Paek KY (2000). Pilot-scale culture of adventitious roots of ginseng in a bioreactor system. Plant Cell Tiss Org Cult, 62: 187~193
- Chu X, Ci XX, Wei MM, Yang XF, Cao QJ, Guan MF, Li HY, Deng YH, Feng HH, Deng XM (2012). Licochalcone A inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response *in vitro* and *in vivo*. J Agric Food Chem, 60 (15): 3947~3954

- Hayashi H, Sudo H (2009). Economic importance of licorice. *Plant Biotechnol*, 26: 101~104
- Hayashi H (2009). Molecular biology of secondary metabolism: case study for *Glycyrrhiza* plants. In: Kirakosyan A, Kaufman PB (eds). *Recent Advances in Plant Biotechnology*. New York: Springer, 89~103
- Jiang YN, Wang B, Li H, Yao LM, Wu TL (2010). Flavonoid production is effectively regulated by RNAi interference of two flavone synthase genes from *Glycine max*. *J Plant Biol*, 53 (6): 425~432
- Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H, Shimomura K (1986). Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Rep*, 5: 239~242
- Karuppusamy S (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res*, 3 (13): 1222~1239
- Liang YL, Zhao SJ, Zhang X (2009). Antisense suppression of cycloartenol synthase results in elevated ginsenoside levels in *Panax ginseng* hairy roots. *Plant Mol Biol Rep*, 27: 298~304
- Liu B, Yang J, Wen QS, Li Y (2008). Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, relaxes guinea-pig tracheal smooth muscle *in vitro* and *in vivo*: role of cGMP/PKG pathway. *European J Pharmacol*, 587: 257~266
- Lukaszewicz M, Matysiak-Kata I, Skala J, Fecka I, Cisowski W, Szopa J (2004). Antioxidant capacity manipulation in transgenic potato tuber by changes in phenolic compounds content. *J Agric Food Chem*, 52 (6): 1526~1533
- Man SL, Wang J, Gao WY, Guo SB, Li YY, Zhang LM, Xiao PG (2012). Chemical analysis and anti-inflammatory comparison of the cell culture of *Glycyrrhiza* with its field cultivated variety. *Food Chem*, 136 (2): 513~517
- Mehrotra S, Kukreja AK, Khanuja SPS, Mishra BN (2008). Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electron J Biotechnol*, 11: 717~728
- Montoro P, Maldini M, Russo M, Postorino S, Piacente S, Pizza C (2011). Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. *J Pharm Biomed Anal*, 54: 535~544
- Park NI, Xu H, Li XH, Kim SJ, Park SU (2011). Enhancement of flavone levels through overexpression of chalcone isomerase in hairy root cultures of *Scutellaria baicalensis*. *Funct Integr Genomics*, 11 (3): 3491~3496
- Park SJ, Song HY, Youn HS (2009). Suppression of the TRIF-dependent signaling pathway of toll-like receptors by isoliquiritigenin in RAW264.7 macrophages. *Mol Cells*, 28 (4): 365~368
- Shabani L, Ehsanpour AA, Asghari G, Emami J (2009). Glycyrrhizin production by *in vitro* cultured *Glycyrrhiza glabra* elicited by methyl jasmonate and salicylic acid. *Russ J Plant Physiol*, 56: 621~626
- Tattini M, Gravano E, Pinelli P, Mulinacci N, Romani A (2000). Flavonoids accumulate in leaves and glandular trichomes of *Phillyrea latifolia* exposed to excess solar radiation. *New Phytol*, 148 (1): 69
- Tunen AJV, Koes RE, Spelt CE, van der Krol AR, Stuitje AR, Mol JNM (1988). Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. *EMBO J*, 7 (5): 1257~1263
- Wang GR, Qi NM, Wang ZM (2010). Application of a stir-tank bioreactor for perfusion culture and continuous harvest of *Glycyrrhiza inflata* suspension cells. *Afr J Biotech*, 9 (3): 347~351
- Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama Y, Putalun W (2011). Methyl jasmonate elicitation enhances glycyrrhizin production in *Glycyrrhiza inflata* hairy roots cultures. *Z Naturforsch*, 66c: 423~428
- Wongwicha W, Tanaka H, Shoyama Y, Tuvshintogtokh I, Putalun W (2008). Production of glycyrrhizin in callus cultures of licorice. *Z Naturforsch*, 63c: 413~417
- Xie YC, Dong XW, Wu XM, Yan XF, Xie QM (2009). Inhibitory effects of flavonoids extracted from licorice on lipopolysaccharide-induced acute pulmonary inflammation in mice. *Int Immunopharmacol*, 9 (2): 194~200
- Yang EJ, Min JS, Ku HY, Choi HS, Park MK, Kim MK, Song KS, Lee DS (2012). Isoliquiritigenin isolated from *Glycyrrhiza uralensis* protects neuronal cells against glutamate-induced mitochondrial dysfunction. *Biochem Biophys Res Commun*, 421 (4): 658~664
- Zhang HC, Liu JM, Chen HM, Gao CC, Lu HY, Zhou H, Li Y, Gao SL (2011). Up-regulation of licochalcone A biosynthesis and secretion by Tween 80 in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Mol Biotechnol*, 47: 50~56
- Zhang HC, Liu JM, Lu HY, Gao SL (2009). Enhanced flavonoid production in hairy root cultures of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch by combining the over-expression of *chalcone isomerase* gene with the elicitation treatment. *Plant Cell Rep*, 28: 1205~1213
- Zhao J, Davis LC, Verpoorte R (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 23: 283~333