

· 专论 ·

药用植物功能基因的研究思路与展望——以甘草为例

刘春生*, 刘颖

(北京中医药大学 中药学院, 北京 100102)

[摘要] 近些年来有关功能基因的研究已成为药用植物研究领域的热点, 研究内容涉及基因克隆、功能鉴定、多态性分析、表达模式分析以及功能基因与代谢途径的相关性分析等诸多方面。甘草是我国最常用的大宗药材之一, 其主要活性成分为甘草酸, 具有多种药理功能, 在国内外市场上应用广泛。本文以甘草为例, 对甘草酸代谢途径中已报道的功能基因进行调查研究, 在基因克隆、基因功能、基因多态性等方面进行分析, 以期揭示甘草酸合成代谢的分子机制奠定基础, 并为其他药用植物功能基因的研究提供思路。

[关键词] 药用植物; 甘草酸; 功能基因; 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶基因; 鲨烯合酶基因; β -香树脂醇合成酶基因; 细胞色素 P450 氧化酶

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)01-0001-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015010001

Research Ideas and Prospects of Functional Genes Involved in Medicinal Plants, Such as Glycyrrhizae Radix et Rhizoma LIU Chun-sheng*, LIU Ying (School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] In recent years, study of functional genes has become a hot area of research in medicinal plants. Research contents include gene cloning, characterization, polymorphism analysis, expression pattern analysis and relationship analysis between functional genes and metabolic pathway. The roots of *Glycyrrhiza uralensis* are widely used in China. Besides the medicinal value, they are also used as industrial raw materials and tobacco additives. Among all of the natural active components glycyrrhizic acid is believed to be the marker compound to characterize the quality of this Chinese herb. Many studies have shown that glycyrrhizic acid possesses various biological activities, such as anti-inflammatory, antitumor and immune-stimulating activities. In this paper the cloning, characterization and polymorphism of functional genes involved in glycyrrhizic acid biosynthesis in *G. uralensis* were analyzed. This work is significant for further studies concerned with strengthening the efficacy of *G. uralensis* by means of improved glycyrrhizic acid content and providing research ideas for functional gene studies in other medicinal plants.

[Key words] medicinal plants; glycyrrhizic acid; functional genes; 3-hydroxy-3-methylglutary CoA reductase; squalene synthase; β -amyrin synthase; cytochrome P450 monooxygenase

近些年来临床上对天然药物的实际需求不断增加, 而许多来源于植物的药物, 如紫杉醇, 难以实现工业化生产, 仍需要依赖生物来源, 从而引发资源争夺以及生态环境破坏。如何实现药用植物资源的可持续发展? 在诸多解决方案中, 生物技术的方法被寄予厚望。其中与药用活性成分生物合成关系密切的功能基因研究已经成为药用植物研究领域的

热点。

植物在长期进化过程中, 逐渐形成了与生存环境相适应的次生代谢途径, 而药用植物功能基因的研究主要是从对次生代谢产物生物合成起重要调控作用的关键酶的编码基因入手。目前涉及到的主要研究手段包括: 基于 EST 的测序分析技术^[1-3]、通过茉莉酸甲酯诱导以及基于实时荧光定量

[收稿日期] 20140821(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373909); 北京高等学校“青年英才计划”(YETP0819); 北京中医药大学自主课题(522/010060511)

[通讯作者] *刘春生, 博士, 教授, 博士生导师, Tel: 010-84738624, Fax: 010-84738611, E-mail: max_liucs@263.net

PCR 的组织特异性表达模式分析^[4]、药用植物转基因株系的诱导^[5]、基于 BAC 库和高通量测序技术的药用植物基因组探索^[6]、基于农杆菌的遗传转化研究^[7-8]以及药用植物功能蛋白质组学研究等等。

目前国际上在药用植物功能基因研究领域做出了突出贡献的国家主要有日本、美国、德国以及中国,涉及到包括青蒿、甘草、长春花、红豆杉、银杏、人参等在内的诸多药用植物。药用植物次生代谢产物主要有三大类,即:生物碱类、酚类以及萜类,其代谢研究均取得了长足进展。药用植物次生代谢途径中功能基因的克隆、其对应的关键酶的表达及功能鉴定、对次生代谢途径的影响及调控,是后基因组时代天然产物化学的新研究方向,将为利用生物技术改良次生代谢途径,提高次生代谢产物积累奠定重要基础。下面就以甘草为例,介绍甘草酸代谢途径中功能基因的研究现状。

1 甘草酸代谢途径中功能基因的研究现状

甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 是最常用的大宗药材之一,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛和调和诸药等作用^[9]。其主要活性成分是甘草酸,具有镇痛、止咳、抗炎、抗肿瘤等多种功效^[10-13],在国内外市场上应用广泛。甘草酸 (glycyrrhizic acid) 属于三萜类化合物,经过甲羟戊酸途径 (MVA) 合成,见图 1。

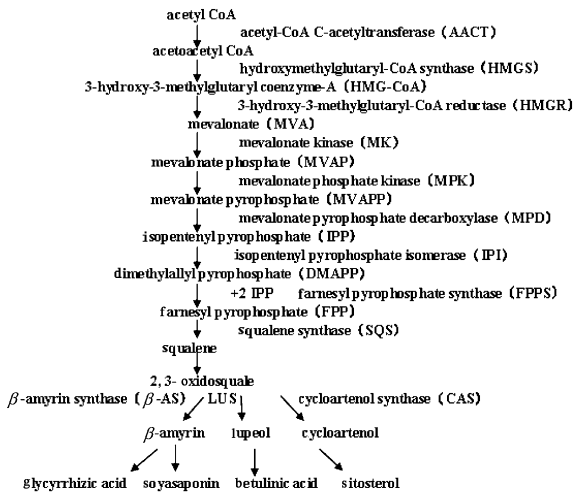


图 1 甘草酸的生物合成途径
Fig. 1 The biosynthetic pathway of glycyrrhizic acid

多种酶参与了甘草酸的生物合成,其中不乏一些关键酶。近些年来关于甘草酸代谢途径中关键酶所对应的功能基因的报道主要集中于以下几个基因,即:3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶基因 (3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase, HMGR), 鲨烯合酶基因 (squalene synthase, SQS), β -香树脂醇合成酶基因 (β -amyrin synthase, β -AS) 及 β -香树脂醇下游代谢途径中的细胞色素 P450 酶系。对于它们的研究包括了基因克隆、功能鉴定、多态性分析及表达模式分析等诸多方面。

1.1 3-羟基-3-甲基戊二酰 CoA 还原酶基因 HMGR HMGR 的主要功能是催化 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-

3-methylglutaryl CoA, HMG-CoA) 生成甲羟戊酸,这是一个不可逆的反应,因此 HMGR 被认为是 MVA 代谢途径中的第一个限速酶,对甘草酸的生物合成具有重要的调控作用^[14-16]。

笔者利用 RACE (rapid-amplification of cDNA ends) 方法对甘草 HMGR 基因 cDNA 进行了克隆,获得了长度为 1 872 bp 的 cDNA 序列 (GenBank 注册号 GQ845405), 开放阅读框 (open reading frames, ORF) 为 1 722 bp, 位于 39 ~ 1 760 bp, 包括 1 个 38 bp 的 5' -非翻译区 (5' -untranslated regions, 5' -UTR) 和 1 个 82 bp 的 3' -非翻译区 (3' -untranslated regions, 3' -UTR), 编码 573 个氨基酸残基。在大肠埃希菌中对其进行原核表达, SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 结果显示获得了相对分子质量约 60 kDa 的蛋白, 纯化后用作酶促反应, GC-MS 的结果显示产物为甲羟戊酸内酯 (MVL), 从而证明了克隆的 HMGR 基因的 cDNA 序列正确, 可发挥正常功能^[17]。

对甘草 HMGR 基因多态性研究结果显示^[18-19], 其基因编码区的多态性包括 ① 单核苷酸多态性 (SNPs): 共计 17 处, 如 185 bp 位点的 T/A 转换, 432 bp 位点处的 G/A 颠换。② 插入/缺失突变 (InDel): 发生在 74 ~ 79 bp 位点处, 表现为 CTGGCG 6 个碱基的插入, 但是未引起移码突变。③ 等位基因杂合多态性: 如有些样本在 72 bp 处存在 T/C 杂合, 81 bp 处存在 C/G 杂合, 99 bp 处存在 G/A 杂合。

HMGR 编码氨基酸序列中存在以下两类变异, 即: L/V 型突变 (-HSL, -HSV) 和 GA 插入型突变 (GALLV, GALS V), 其中 -HSV 型为甘草中普遍存在类型, -HSL 型为甘草酸低含量甘草的特有类型, GALS V 型为甘草酸高含量甘草特有类型。在对其编码酶催化效率进行研究后发现 L/V 型突变 (-HSL, -HSV) 催化活性近似, GA 插入型突变 (GALLV, GALS V) 催化活性近似, 但插入型突变的催化活性显著高于前者, 是前者的 2 倍左右。

1.2 鲨烯合酶基因 SQS 鲨烯合酶 (SQS) 处在法呢基二磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 到三萜或者其他产物的分支点, 是碳源流向三萜的关键酶, 其正向调节时可促进三萜的合成^[7, 20-21]。SQS 基因属于多基因家族, 到目前为止在拟南芥 *Arabidopsis thaliana*^[8, 22]、光果甘草 *Glycyrrhiza glabra*^[23] 以及其他植物中已经发现了至少 2 种 SQS 基因, 它们具有不同的表达活性。

卢虹玉等^[24-25] 分别采用不同的方法克隆了甘草 SQS1 及 SQS2 的 cDNA 序列。SQS1 的 cDNA 序列 (GenBank 注册码: AM182329) 长度为 1 241 bp, 编码 413 个氨基酸残基组成的多肽, SQS2 的 cDNA 序列 (GenBank 注册码: AM182330) 长度为 1 239 bp, 编码 412 个氨基酸残基组成的多肽。这 2 条序列与日本学者 Hayashi 等^[23] 报道的光果甘草的 2 条 SQS 的 cDNA 序列同源性均在 98% 以上, 氨基酸序列的一致性也均在 98% 以上。在大肠埃希菌中对甘草 SQS 基因进行异源表达的研究, SDS-PAGE 结果显示在约 67 kDa 位置出现了空白对照中没有的条带, 对其纯化后进行酶促反应, TLC 的检

测结果显示出现了空白对照中没有的斑点,而 GC-MS 的检测结果进一步证明酶促反应的产物中出现了鲨烯合酶对应的产物,即:鲨烯(squalene),表明克隆获得的 SQS 基因功能正常^[25]。

对甘草 SQS1 基因多态性研究结果显示^[26],其基因编码区的多态性共包括 ①单核苷酸多态性(SNPs):共有 22 个位点存在 SNPs,其中 7 个位点发生 A/G 转换,8 个位点发生 C/T 转换,2 个位点发生 A/C 颠换,3 个位点发生 A/T 颠换,1 个位点发生 C/G 颠换,1 个位点发生 T/G 颠换。除 495, 606, 1 117 bp 处为同义突变外,其他均为错义突变,错义突变率为 80.9%。②插入/缺失长度多态性(InDel):存在 1 处 InDel,即有些样本在 738~740 bp 位点缺失 GGA3 个碱基,导致酶的长度缩短一个氨基酸残基。③无义突变:甘草 SQS1 编码序列中存在 1 处无义突变。由于 1 231 bp 位碱基 C 突变成 T,使得有些样本中提前出现终止密码子 TAA,导致酶的长度缩短 3 个氨基酸残基。④选择性剪接多态性(AS):选择性剪接是真核细胞一种重要的 mRNA 转录后加工机制,可视同一基因产生多种 mRNA 转录本,翻译为多种多肽序列,从而增加蛋白多样性并影响 mRNA 稳定性。在所分析的 SQS1 基因中存在内含子保留(intron retention)和外显子遗漏(exon skipping)2 种选择性剪切多态性。

在 SQS2 基因编码序列中只存在一种多态性,即 SNPs。SQS2 编码序列中共有 9 个位点存在 SNPs,其中 4 个位点发生 A/G 转换,4 个位点发生 C/T 转换,1 个位点发生 A/T 颠换。除 63, 396, 513, 660 bp 处为同义突变外,其他均为错义突变,错义突变率为 55.5%。

就氨基酸序列而言,SQS1 氨基酸序列存在 18 处氨基酸替换突变,其中保守替换占 47.06%,非保守替换占 53.94%,说明半数以上的突变对氨基酸结构及功能有影响。SQS2 氨基酸序列中存在 5 处突变,其中保守替换占 40%,非保守替换占 60%,表明 SQS2 氨基酸突变以引起结构和功能变异的非保守突变为主。具有不同多态性的 SQS 基因其编码酶催化效率差异显著。

1.3 β -香树脂醇合成酶基因 β -AS β -香树脂醇合成酶(β -AS)处于形成甘草酸类化合物(齐墩果烷型)或白桦脂酸类化合物(羽扇豆烷型)的重要分支点,催化 2,3-氧化鲨烯环化生成 β -香树脂醇进而形成甘草酸^[27-28]。

陈宏昊等^[29]对甘草 β -AS 基因进行分段扩增及拼接,最终获得了长度为 4 109 bp 的甘草 β -AS 全长 DNA 序列,包含 13 个内含子及 14 个外显子。沈湛云等^[30]克隆获得了甘草 β -AS 基因 cDNA 序列,其编码区长度为 2 289 bp,编码 762 个氨基酸残基。在酿酒酵母中对其进行异源表达,SDS-PAGE 结果显示得到了大小约 87 kDa 的目的蛋白,TLC 及 GC-MS 结果均显示该蛋白可催化生成 β -香树脂醇,从而证明获得的 β -AS 基因具有完整的催化活性。

对 β -AS 基因序列多态性进行分析^[31],结果发现甘草 β -AS 基因编码区在 94 254 bp 分别存在 2 个单核苷酸突变位点。在 94 bp 位点发生 G/A 转换,为错义突变,导致该位点

处甘氨酸/天冬氨酸转换,254 bp 处发生 C/T 转换,为同义突变。对具有不同多态性位点的 β -香树脂醇合成酶进行催化效率的研究^[32],结果显示不同基因型的酶催化效率差异显著,94 bp 位点为 A,254 bp 位点为 T 的基因型催化效率最高,因此推测此基因型是高含量甘草酸形成的原因之一。

笔者利用 RT-PCR 对 β -AS 基因的时空表达模式进行了研究^[33],结果发现就空间特异性而言, β -AS 基因在甘草的地上部分没有表达,在地下组织中,新陈代谢最旺盛的根尖部分表达量高于根茎。此模式与甘草酸在甘草体内的积累模式相一致^[34]。就时间特异性而言,甘草 β -AS 基因在全年中的表达水平可分为 4 个阶段,12 月至 2 月, β -AS 基因表达低于检测水平;3 月至 5 月, β -AS 基因开始表达,表达量逐渐上升;5,6 月及 8,9 月表达量保持较高水平;10,11 月表达量开始下降。

1.4 细胞色素 P450 酶系 日本学者 Hikaru Seki 对位于甘草酸代谢途径中 β -香树脂醇下游的细胞色素 P450 酶系进行了研究,并做了相关报道^[35-36]。

CYP88D6 是细胞色素 P450 单氧酶基因,通过体外酶促反应对其进行功能鉴定,研究显示其催化位于 β -香树脂醇 C-11 位的连续两步氧化反应,生成 11-氧化- β -香树脂醇,这可能是位于 β -香树脂醇和甘草酸之间的中间产物。将 CYP88D6 与 β -AS 基因在酵母中共表达,同样会催化 β -香树脂醇氧化形成 11-氧化- β -香树脂醇。利用 RT-PCR 对该基因的表达情况进行检测,结果发现仅能在根部及根状茎中检测到其表达,在叶和茎中均不能检测到其表达,这可能与甘草酸在甘草植物中的积累模式有关,这也与本文作者对 β -AS 基因时空表达模式的研究相一致。

CYP72A154 也是细胞色素 P450 氧化酶基因,将其在能够自发生产 11-氧化- β -香树脂醇的工程酵母菌中进行表达,结果显示其催化位于 11-氧化- β -香树脂醇 C-30 位的连续三步氧化反应。此外,作者还发现了另外 2 个 CYP72A 亚家族成员,即 CYP72A153 与 CYP72A155,其中 CYP72A153 与 CYP72A154 具有 60.0% 的相似度,CYP72A155 与 CYP72A154 具有 50.9% 的相似度。对这两者也进行了体内及体外氧化活性鉴定,然而均未检测出类似的活性。对 CYP72A154 基因的表达情况进行检测,结果发现仅能在根部及根状茎中检测到其表达,在叶中不能检测到其表达,这也与上述 CYP88D6 及 β -AS 基因的表达模式相一致。

2 甘草酸代谢途径中功能基因的研究意义

甘草是最常用大宗药材,有“十药九甘草”之称。此外,它也是烟草添加剂、食品矫味剂的重要原料,国内外用量很大。商品甘草过去主要来自于野生资源,由于过度采挖,甘草野生资源遭到了严重破坏,国务院已明令禁止采挖野生甘草(国发[2000]13号),目前栽培甘草已经是主流商品。但是,大部分栽培甘草存在品质退化和甘草酸含量低等问题,达不到《中国药典》和《日本药典》规定的甘草酸含量不低于 2.0% 和 2.5% 的合格标准^[37-38],既影响甘草临床疗效,也制约栽培甘草的出口。因此,提高栽培甘草的质量已经成为制

约甘草资源可持续发展的关键问题。

为了解决上述甘草资源可持续发展这一“瓶颈”问题,人们试图通过多种手段来累积甘草中的次生代谢产物甘草酸,包括植物组织培养的方法。但是,经检测无论是愈伤组织还是毛状根培养体系,都只能获得甘草次生代谢产物中的黄酮类化合物,如甘草素、异甘草素、甘草苷、异甘草苷、甘草查耳酮等化合物,而很难获得甘草次生代谢产物中的三萜类化合物,如甘草酸^[39-40]。因此,这就需要我们转变研究思路,在清晰的了解甘草酸次生代谢途径的基础上,明确甘草酸生产的关键影响因素,从而更好的解决这一问题。

目前,国内外有关功能基因多态性对其调控产物的影响已有许多报道^[41-42],均证明功能基因的微小变异就可对调控产物在数量或质量上产生影响。因此,清晰的了解甘草酸代谢途径中各功能基因及其作用,对于揭示甘草酸形成的分子机制具有至关重要的作用。除上述基因编码区存在的多态性之外,笔者在研究过程中还发现在天然存在的甘草植株中功能基因 HMGR, SQS 及 β -AS 尚存在有拷贝数多态性 (CNVs)^[43-44]。因此,对甘草酸代谢途径中的功能基因开展研究,将不仅为揭示甘草酸合成代谢的分子机制奠定基础,还将为实现甘草中甘草酸的高水平积累提供分子基础。

3 药用植物功能基因的研究展望

近些年来随着“人类基因组计划”的顺利开展,美国又相继提出了“微生物基因组计划”以及“植物基因组计划”。虽然植物的功能基因组研究起步较晚,但也得到了迅速的发展。而我国提出的“中药基因组计划”是利用分子生物学、生物信息学等现代化生物技术与其他科学技术相结合对中药进行现代化研究与开发的重大战略措施。功能基因的研究恰是这一计划中最为重要的研究内容之一。

植物的次生代谢产物主要有三大类,即:生物碱类、萜类、酚酸类。我国科研工作者经过不懈的努力,在这三大类次生代谢产物的功能基因研究中均作出了突出贡献,如:通过高通量测序 454 GS FLX 的 EST 分析技术,获得了包括 HMGR, FPPS 等在内的 9 个参与三萜皂苷合成的关键酶基因,以及 133 个 CYP450 候选基因^[1-3];从忍冬 *Lonicera japonica*、红白忍冬 *L. japonica*、红腺忍冬 *L. hypoglauca* 和水忍冬 *L. dasystyla* 中分别克隆获得了各自的脂酰-酰基载体蛋白硫酯酶^[45]等脂肪酸生物合成中的关键酶;从丹参 *Salviae miltiorrhizae* 毛状根中获得的一系列细胞色素 P450 酶系以及二萜合酶等基因片段^[46]等黄酮类代谢途径中的功能基因;从长春花 *C. roseus* 中克隆得到的 5-磷酸脱氧木酮糖还原酶、次番木鳖苷合成酶、异胡豆苷合成酶等吲哚生物碱合成途径中的关键酶编码基因^[47]。这些功能基因的研究将为药用植物次生代谢分子机制的揭示奠定基础。

此外,药用植物的转录组及叶绿体基因组的研究^[48],也可挖掘出与次生代谢合成相关的关键酶,从而揭示次生代谢合成途径的分子机制,并为后续合成生物学的研究提供重要的生物学基础。目前,借鉴工程学思想,以基因工程为主要手段的合成生物学为实现次生代谢产物的高效异源合成提

供了一种可行的思路,并已成功用于青蒿素^[49]、紫杉醇^[50]等重要天然产物的人工合成中。

虽然我国的药用植物基因研究较为活跃、进展较快,并在一些领域取得了较为重要的进展,但在药用植物功能基因的研究过程中应体现我国传统中草药的深刻内涵,加强原创性研究,建立和完善药用植物功能基因研究的技术体系,获得具有我国自主知识产权、功能明确且应用前景广阔的重要基因,从而为中药现代化的发展做出贡献。

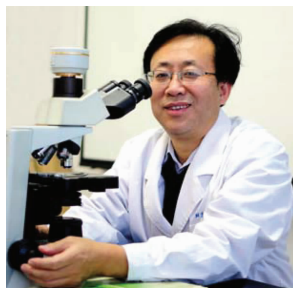
[参考文献]

- [1] Chen S L, Luo H M, Li Y, et al. 454 EST analysis detects genes putatively involved in ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. Plant Cell Rep, 2011, 30(9): 1593-1601.
- [2] Sun C, Li Y, Wu Q, et al. *De novo* sequencing and analysis of the American ginseng root transcriptome using a GS FLX Titanium platform to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis [J]. BMC Genomics, 2010, 11(4): 262-273.
- [3] Luo H M, Sun C, Sun Y Z, et al. Analysis of the transcriptome of *Panax notoginseng* root uncovers putative triterpene saponin-biosynthetic genes and genetic markers [J]. BMC Genomics, 2011, 23(12): S5-S10.
- [4] Choi D W, Jung J D, Young I H, et al. Analysis of transcripts in methyl jasmonate-treated ginseng hairy roots to identify genes involved in the biosynthesis of ginsenosides and other secondary metabolites [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 557-566.
- [5] Han J Y, Kim H J, Kwon Y S, et al. The cytochrome P450 enzyme CYP716A47 catalyzes the formation of protopanaxadiol from dammarenediol-II during ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng* [J]. Plant Cell Physiol, 2011, 52(12): 2062-2073.
- [6] Hong C P, Lee S J, Park J Y, et al. Construction of a BAC library of korean ginseng and initial analysis of BAC-end sequences [J]. Mol Gen Genomics, 2004, 271(6): 709-716.
- [7] Lu H Y, Liu J M, Zhang H C, et al. Ri-mediated transformation of *Glycyrrhiza uralensis* with a squalene synthase gene (CuSQS1) for production of glycyrrhizin [J]. Plant Mol Biol Rep, 2008, 26: 1-11.
- [8] Mirjalili M H, Moyano E, Bonfill M, et al. Overexpression of the *Arabidopsis thaliana* squalene synthase gene in *Withania coagulans* hairy root cultures [J]. Biologia Plantarum, 2011, 55(2): 357-360.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 80-81.

- [10] Rackova L, Jancinova V, Petrikova M, et al. Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin [J]. Nat Prod Res, 2007, 21 (14): 1234-1241.
- [11] Kim J K, Oh S M, Kwon H S, et al. Anti-inflammatory effect of roasted licorice extracts on lipopolysaccharide induced inflammatory responses in murine macrophages [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345 (3): 1215-1223.
- [12] Leonetti C, Scarsella M, Zupi G, et al. Efficacy of a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug and cytotoxic drugs in human colon cancer cell lines *in vitro* and xenografts [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5 (4): 919-926.
- [13] Tatsuzaki J, Taniguchi M, Bastow K F, et al. Anti-tumor agents 255: novel glycyrrhetic acid-dehydrozingerone conjugates as cytotoxic agents [J]. Bio Med Chem, 2007, 15 (18): 6193-6199.
- [14] Bach T J. Synthesis and metabolism of mevanoic acid in plants [J]. Plant Physiol Biochem, 1987, 25: 163-178.
- [15] Friesen J A, Rodwell V W. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A (HMG-CoA) reductases [J]. Genome Biology, 2004, 93(5): 248-259.
- [16] Yang Z, Park H, Lacy G H, et al. Differential activation of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase genes by wounding and pathogen challenge [J]. Plant Cell, 1991, 3(4): 397-405.
- [17] 刘颖,徐巧仙,席培宇,等. 甘草 HMGR 基因 cDNA 的克隆及功能鉴定 [J]. 药学学报, 2013, 48 (5): 773-779.
- [18] 刘颖,徐巧仙,王学勇,等. 甘草 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因多态性对其编码酶催化效率的影响 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (24): 3784-3788.
- [19] 刘颖,徐巧仙,王学勇,等. 甘草 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶基因多态性与甘草酸含量的相关性分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (24): 3789-3792.
- [20] Lee M H, Jeong J H, Seo J W, et al. Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in *Panax ginseng* overexpressing squalene synthase gene [J]. Plant Cell Physiol, 2004, 45(8): 976-984.
- [21] Seo J W, Jeong J H, Shin C G, et al. Overexpression of squalene synthase in *Eleutherococcus senticosus* increases phytosterol and triterpene accumulation [J]. Phytochemistry, 2005, 66(8): 869-877.
- [22] Kribii R, Arro M, Arco A D, et al. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* SQS1 gene encoding squalene synthase involvement of the C-terminal region of the enzyme in the channeling of squalene through the sterol pathway [J]. Eur J Biochem, 1997, 249(1): 61-69.
- [23] Hayashi H, Huang P, Inoue K. Up-regulation of soyasaponin biosynthesis by methyl jasmonate in cultured cells of *Glycyrrhiza glabra* [J]. Plant and Cell Physiology, 2003, 44(4): 404-411.
- [24] 卢虹玉,刘敬梅,阳文龙,等. 甘草鲨烯合酶基因分离及植物表达载体的构建 [J]. 药物生物技术, 2007, 14 (4): 255-258.
- [25] Liu Y, Zhang N, Chen H H, et al. Cloning and characterization of two cDNA sequences coding squalene synthase involved in glycyrrhizic acid biosynthesis in *Glycyrrhiza ralenis* [J]. Lec Not Elect Engin, 2013, 269:329-342.
- [26] 刘颖,张宁,王学勇,等. 甘草鲨烯合酶基因多态性对其编码酶催化效率影响的研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (24): 3777-3783.
- [27] Wang Z, Guhling O, Yao R, et al. Two oxidosqualene cyclases responsible for biosynthesis of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit cuticular triterpenoids [J]. Plant Physiology, 2011, 155(1): 540-552.
- [28] Hayashi H, Huang P, Kirakosyan A, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding β -amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in *Licorice* [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 24 (8): 912-916.
- [29] Chen H H, Liu Y, Zhang X Q, et al. Cloning and characterization of a gene coding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizic acid biosynthesis in *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2013, 3 (6):416-424.
- [30] 沈湛云,刘春生,王学勇. 甘草 β -香树脂醇合成酶的编码区克隆与序列分析 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34 (19): 2438-2440.
- [31] 沈湛云,刘春生,王学勇,等. 甘草 β -香树脂醇合成酶的编码区 SNP 与甘草酸含量的相关性研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (7): 813-816.
- [32] 沈湛云,刘春生,黄建梅,等. 甘草 β -香树脂醇合成酶的多态性对其催化效率的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35 (22): 2941-2944.
- [33] 刘颖,刘春生. 甘草 β -AS 基因时空表达模式研究 [J]. 中药材, 2012, 35 (4): 528-531.
- [34] Hayashi H, Hiraoka N, Ikeshiro Y. Seasonal variation of glycyrrhizin and isoliquiritigenin glycosides in the root of *Glycyrrhiza glabra* L. [J]. Biol Pharm Bull, 1998,

- 21(9): 987-989.
- [35] Hikaru S, Kiyoshi O, Satoru S, et al. Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin [J]. PNAS, 2008, 105(37): 14204-14209.
- [36] Hikaru S, Satoru S, Kiyoshi O, et al. Triterpene functional genomics in licorice for identification of CYP72A154 involved in the biosynthesis of glycyrrhizin [J]. Plant Cell, 2011, 23(11): 4112-4123.
- [37] Yamamoto Y, Majima T, Saiki I. Pharmaceutical evaluation of *Glycyrrhiza uralensis* roots cultivated in eastern Nei-Meng-Gu of China [J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(8): 1144-1149.
- [38] 刘春生,王文全. 栽培甘草不同部位甘草酸含量的单株分析[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(24): 2660-2661.
- [39] 卢虹玉,刘敬梅,张海超,等. 甘草毛状根诱导培养及其黄酮含量检测的研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(11): 814-818.
- [40] 卢虹玉,刘义,张海超,等. 甘草毛状根中甘草总黄酮和甘草酸的检测和分析[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(1): 43-46.
- [41] 宋书娟,刘英芝,从日昌,等. PAX6 基因突变能够引起人脑结构异常[J]. 北京大学学报:医学版, 2005, 37(1): 48-50.
- [42] 王芳,赵辉,王燕,等. 小麦 Wx-B1 基因酶切片段长度多态性及其与直链淀粉的含量[J]. 植物生理与分子生物学报, 2005, 31(3): 269-274.
- [43] 刘颖,刘东吉,刘春生,等. 基于 HMGR, SQS1, β -AS 基因 CNVs 的甘草道地性机制研究[J]. 药学学报, 2012, 47(2): 250-255.
- [44] 刘颖,刘东吉,刘春生. 甘草 HMGR, SQS1, β -AS 合酶基因 CNVs 检测体系的建立[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(3): 283-287.
- [45] 汪周勇,蒋超,陈敏,等. 金银花类药用植物 *FatB* 基因克隆和生物信息学分析[J]. 药学学报, 2012, 47(10): 1394-1398.
- [46] 崔光红,黄璐琦,邱德有. 丹参功能基因组学研究—丹参毛状根不同时期基因表达谱分析[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(13): 1267-1272.
- [47] 韩梅,赵博,安志刚,等. 长春花萜类吲哚生物碱生物合成途径中重要酶(DXR, SLS, C10H, STR)基因的克隆与表达[J]. 植物研究, 2007, 27(5): 564-568.
- [48] Kim K J, Lee H L. Complete chloroplast genome sequences from Korean ginseng (*Panax ginseng*) and comparative analysis of sequence evolution among 17 vascular plants [J]. DNA Research, 2004, 11(4): 247-261.
- [49] Tsuruta H, Paddon C J, Eng D, et al. High-level production of amorpha-4'11-diene, a precursor of the antimalarial agent artemisinin in *Escherichia coli* [J]. Plos One, 2009, 4(2): e4489.
- [50] Ajikumar P K, Xiao W H, Tyo K E, et al. Isoprenoid pathway optimization for taxol precursor overproduction in *Escherichia coli* [J]. Science, 2010, 330(60): 70-74.

[责任编辑 邹晓翠]



作者简介 刘春生,博士、教授、博士生导师,现任北京中医药大学中药学院中药鉴定系主任,中国植物学会药用植物和植物药委员会委员、中国生态学会中药资源生态委员会委员、中华中医药学会中药鉴定分会委员。国家中医药管理局中药鉴定重点学科带头人。

近年来主持和参加的主要科研课题共20余项,科研方向为中药有效成分生物合成功能基因研究和中药鉴定新技术和新方法研究。如“基于灰色关联和分子模拟技术的甘草酸含量核心调控网络的功能基因多态性对甘草酸含量的作用机制研究”、“甘草功能基因拷贝数多态性对甘草酸含量的作用机制研究”、“甘草功能基因多态性对甘草酸含量的作用机制研究”等国家自然科学基金项目;教育部博士点基金“甘草 BAS 基因分子地图的构建研究”等课题。发表论文100余篇。近年来共主编或副主编教材15部。