

- [26] 张国华, 迟华基. 黄连解毒汤对实热证大鼠T细胞亚群和IL-2活性的影响[J]. 广西中医学院学报, 2002, 5(3): 8.
- [27] 秦秀兰, 吴锦海, 郑有顺. 黄连解毒汤镇痛抗炎作用的实验研究[J]. 中药药理与临床, 1994, 5(6): 9-10.
- [28] 曹于平, 牟 聪, 孙继红, 等. 黄连解毒汤提取液的药理作用研究[J]. 中国药科大学学报, 1996, 27(10): 605-608.
- [29] 王黎曼, 温清欣及黄连解毒汤的抗炎作用[J]. 和汉医药学会志, 1993, 10(1): 73-75.
- [30] 王利津, 徐 强. 黄连解毒汤的抗炎作用机理研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(8): 493.
- [31] 吴 辉, 刘煌德, 吴 伟. 清热解毒法对肺炎衣原体感染致兔动脉粥样硬化的干预作用[J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2): 151.
- [32] 方 青, 詹小萍, 莫剑翎, 等. 黄连解毒汤对AD大鼠的治疗作用及对细胞因子含量的测定[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(6): 575.
- [33] 方素萍, 邱全瑛, 郝 任, 等. 黄连解毒汤含药血清对LPS/TNF- α 诱导的人中性粒细胞与血管内皮细胞间粘附的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2001, 7(2): 31.
- [34] Lu T, Liang Y, Song J, et al. Simultaneous determination of berberine and palmatine in rat plasma by HPLC-ESI-MS after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction and the pharmacokinetic application of the method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 40: 1218-1224.
- [35] Lu T, Song J, Huang F. Comparative pharmacokinetics of baicalin after oral administration of pure baicalin, *Radix Scutellariae* extract and Huang-Lian-Jie-Du-Tang to rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 110: 412-418.
- [36] 邓远雄, 杨昌华, 牟玲丽. 黄连解毒汤中黄芩苷和汉黄芩苷在糖尿病大鼠体内的药动学[J]. 中草药, 2008, 39(2): 227-231.

苔藓组织培养体系的应用

谢春锋, 姜红祥*

(山东大学药学院, 山东 济南 250012)

摘 要: 苔藓组织培养已有约100年的历史。与种子植物相比, 苔藓组织培养体系有许多特有属性, 如生长条件简单、再生能力强以及细胞分化充分等。其作为极具发展前景的模式生物广泛用于植物生理学、形态学、发育学以及植物生物技术等研究领域。综述了近年来苔藓组织培养体系在生物转化、生产次级代谢产物以及生物制药等方面的潜在应用, 同时也探讨了其在筛选抗菌和抗疟原虫药物方面的可能性。

关键词: 苔藓组织培养; 生物转化; 次级代谢产物; 生物制药

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)06-0938-06

Application of bryophyte tissue culture systems

XIE Chun-feng, LOU Hong-xiang

(School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Key words: bryophyte tissue cultures; biotransformation; secondary metabolites; biopharmaceuticals

植物组织培养作为一门技术学科, 开始于Haberlandt提出细胞全能性理论和进行离体培养研究。苔藓植物的组织培养可追溯到1906年, 首先是在无菌条件下培养出植物组织和器官。Hohe等^[1]已对苔藓组织培养的研究现状做了较为全面的综述, 认为苔藓组织培养体系具有许多种子植物无法竞争的优势: (1)孢子易于在无菌培养基上培养; (2)再生能力奇特; (3)生长条件简单, 可规避种子植物体外培养中的器官缩小和高度含水等问题; (4)对剪切力的低敏感性; (5)结构简单, 细胞分化完全; (6)基因组高效率地整合外源DNA。因此, 苔藓组织培养体系作为模式生物已广泛用于研究植物的代谢、发育以及基因功能等的研究^[2]。本文仅就近年来苔藓组织培养体系在生物转化、生产次级代谢产物以及生物制药等方面的应用状况进行归纳和总结, 同时也探讨了其在筛选抗菌和抗疟原虫药物方面的可能性。

1 生物转化

苔藓植物细胞生长条件比较简单, 故与种子植物细胞相比, 作为生物催化剂比较廉价。前人已对苔藓细胞悬浮培养液转化外源底物的能力进行了综述^[3]。本文着重阐述苔藓细胞悬浮培养液选择性地催化水解反应和氧化还原反应, 同时也简要介绍了其分泌的细胞色素P450酶和过氧化物酶催化的聚合反应。

1.1 水解反应: 苔藓植物地钱 *Marchantia polymorpha* L. 的培养液具有水解外源底物的能力。推测可能是水解酶分泌到培养基中, 介导了水解反应。Izumi等^[4]观察到这一现象, 并证实该酯酶可水解乙酸萘酯(naphthyl acetate), 其相对分子质量为 4×10^4 。最近, Hirata等^[5]从地钱细胞悬浮培养液中分离出两种酯酶, 可立体选择性地催化 α 萘醇酯生成手性纯的 α 酮(e.e. >99%)。手性纯的 α 酮在不对称有机合成中

收稿日期: 2007-12-10

作者简介: 谢春锋, 男, 博士研究生。 Tel: 13869181905 E-mail: xie.chunfeng@yahoo.com.cn

* 通讯作者: 姜红祥 Tel/Fax: (0531)88382019 E-mail: louhongxiang@sdu.edu.cn

常作为重要的手性合成子。值得一提的是,这两种酯酶的对映选择性相反,且随着 α 位取代基的链长和空间位阻的增加而相互转化。

另外,苔藓细胞悬浮液可对消旋混合物进行动力学拆分,成为制备有价值的手性纯化合物的工具^[6]。如地钱悬浮细胞可催化*R*-乙酰衍生物生成相应的*R*-醇,*S*-乙酰衍生物却没有发生变化,可籍此加以分离(图1)。

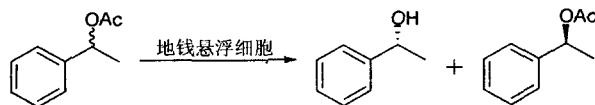


图1 1-苯乙基醋酸酯消旋体的水解拆分

Fig. 1 Hydrolysis and resolution of *rac*-(1-phenylethyl) acetate

1.2 氧化还原反应: α,β 不饱和羰基化合物中的碳碳双键很难通过化学方法选择性加氢还原,但用含有依赖NADH还原酶的植物细胞系统可轻易实现。Speicher等^[7]证实苔藓植物细胞培养液可化学选择性和立体选择性地转化酮、 β -酮酯和 α,β 不饱和羰基化合物。如(-)-(5*R*)-carvon可催化生成(+)-*iso*-dihydrocarvon和(+)-*n*-dihydrocarvon,底物的碳碳双键加氢还原,但羰基并未变化。

Hirata等^[8]发现与其他高等植物悬浮细胞培养液相比,地钱细胞悬浮培养液可高效率地氢化马来酰亚胺衍生物(maleimides)生成相应的琥珀酰亚胺衍生物(succinimides)。此外,还证实地钱细胞悬浮培养液可氢化共轭的双键,而丙烯位的碳则发生羟基化反应^[9]。

另有报道^[10],地钱细胞悬浮液可区域选择性地使3,6-dialkylcyclohexane-1,2-diones的碳碳单键氧化裂解生成相应的酸,同时脱去一个碳。所得产物在有机合成中是重要的中间体(图2)。

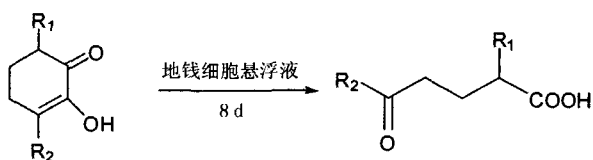


图2 地钱对3,6-dialkylcyclohexane-1,2-diones的生物转化

Fig. 2 Biotransformation of 3,6-dialkylcyclohexane-1 and 2-diones using *M. polymorpha*

1.3 聚合反应:许多天然产物通常通过一个或多个酚类化合物聚合产生,该过程可通过自由基反应来实现。地钱细胞悬浮培养液可使二氢白藜芦醇发生聚合反应,生成以醚键或碳碳键连接的开环二聚体。地钱细胞中的细胞色素P450酶和过氧化物酶可催化酚类化合物产生自由基进而发生聚合反应。Friedrich等^[11]从地钱细胞悬浮培养液中分离得到地钱素C合酶(依赖细胞色素P450酶)可使半叶苔酸聚合生成地钱素C。随后,Hirata等^[12]发现化学胁迫可使地钱细胞悬浮培养液分泌过氧化物酶。该酶的相对分子质量为 3.7×10^4 ,氨基酸部分序列与高等植物不同,可催化半叶苔素聚合

生成二聚体、三聚体和四聚体,并鉴定了其中一个二聚体为perrottetin E(图3)。

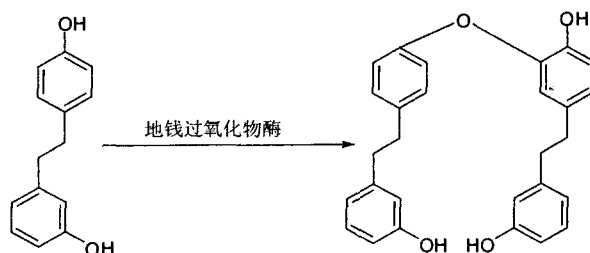


图3 地钱过氧化物酶对半叶苔素的二聚作用

Fig. 3 Dimerization of lunularin by *M. polymorpha* peroxidase

2 生产次级代谢产物

近年来从苔藓植物中分离获得了大量结构新颖而且活性显著的萜类化合物和芳香族化合物,表明苔藓植物是生物活性天然产物的重要来源^[13]。但苔藓植物体积很小,种间杂生,不易区别和分离,在野外往往很难采集到大量且纯的苔藓植物体。解决这一问题最有希望的方法是进行苔藓植物的组织培养,以获得大量纯的苔藓植物材料。因为苔藓体外培养液的分化较为充分,所以可定性且定量地产生与野生植物相同的次级代谢物。另一方面,这也刺激了人们对苔藓天然产物生物合成途径的研究。Beck曾综述了苔藓组织培养液生产次级代谢产物的研究概况^[14]。

Tazaki等^[16]以野外采集的拟尖叶叶苔 *Jungermannia subulata* Evans 孢子为外植体,诱导出了愈伤组织,成熟的孢蒴消毒后转至Gamborg B5 固体培养基和MSK-4 培养基中,然后继代培养,形成细胞悬浮培养液。愈伤组织、细胞悬浮液和野生配子体提取液的气相色谱特征相同,产生4个对映-贝壳杉烷型二萜,即对映-贝壳杉烷-3,15二酮(I)、对映-贝壳杉烯(II)、对映-贝壳杉烯-15 β -醇(III)和对映-贝壳杉烯-15-酮(IV)。比较4个二萜在愈伤组织、细胞悬浮液和野生配子体中的量。除I外,其他3个二萜的量基本相当。

Sauerwein等^[16]将小叶苔 *Fossombronia pusilla* (L.) Nees的孢蒴消毒后转至含有Gamborg B5的固体培养基和液体培养基中培养,生成分化的固体和液体培养材料。而孢蒴在Knop培养基中培养则可获得未分化的愈伤组织,从植物材料的 CH_2Cl_2 提取液中发现了4个二萜类化合物: α -山道年(V)、核子木醛A(VI)、核子木醛B(VII)和8-羟基-9-氢核子木醛A(VIII)。它们均对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草杆菌表现出抑制活性,其中V的活性最强,而VII最弱。比较VI和VII在野生苔藓、分化的固体培养材料、分化的液体培养材料和未分化的愈伤组织固体培养基中的量,发现VI和VII在前三者中的量相当,而在未分化的愈伤组织中的量仅为它们的1/10。原因可能是分化的培养材料中细胞较大,油体多且体积较大。

近年来其他从体外培养的苔藓材料中获得的次级代谢产物见表1和图4。

3 生物制药

转基因苔藓生物制药首先由德国弗赖堡大学绿色创新

表1 近年来苔藓体外培养材料中获得的其他次级代谢产物
Table 1 Some secondary metabolites from bryophyte cultures *in vitro*

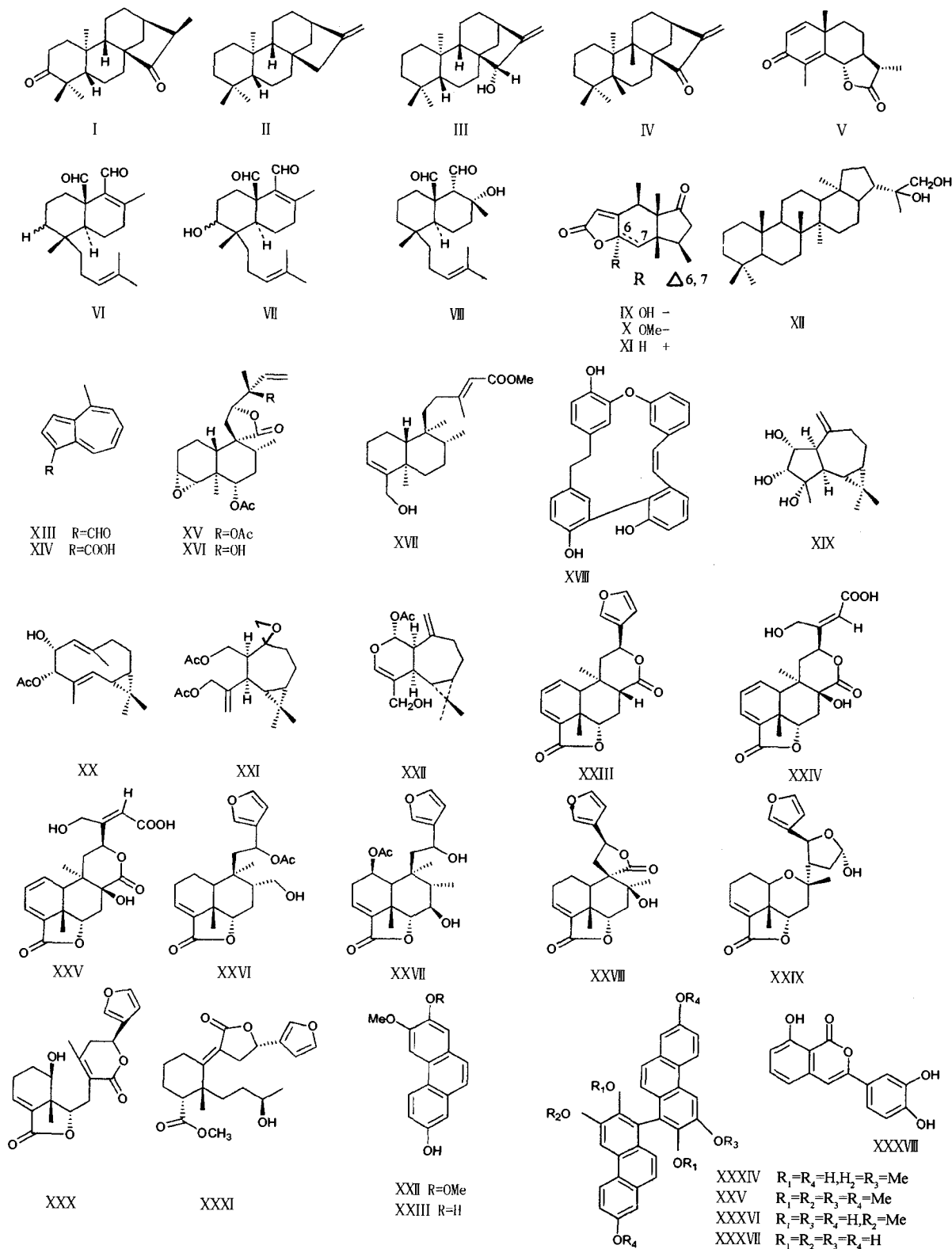
苔藓物种	外植体	培养基	次级代谢产物	
			编号	名称
绿片苔 <i>Aneura pinguis</i> ^[17]	配子体	Gamborg B5	IX	6 α -羟基-3-酮-绿叶苔烷-5(10)-烯-11,6-内酯
			X	6 α -甲氧基-3-酮-绿叶苔烷-5(10)-烯-11,6-内酯
			XI	3-酮-绿叶苔烷-5(10),6-二烯-11,6-内酯
<i>Asterella blumeana</i> ^[18]	配子体	Gamborg B5	XII	22,29-二羟基何伯烷
<i>Calypogeia azurea</i> ^[19]	孢子	MSK-4	XIII	4-甲基蕈-1-甲醛
			XIV	4-甲基蕈-1-甲酸
平台异萼苔 <i>Heteroscyphus planus</i> ^[20~22]	配子体	AP,MSK-4	XV	heteroscypholide A
			XVI	heteroscypholide B
			XVII	18-羟基-5,10- <i>trans</i> -克罗烷-3,13E-二烯-15-羧酸甲酯
			XVIII	planusin A
			XX	planotriol
			XXI	<i>ent</i> -3 β -乙酰氧基-2 β -羟基-双环大牻牛儿烯
			XXII	<i>ent</i> -2,3-二乙酰氧基-10 α ,15 α -环氧-2,3-开环-别香橙烷-4(14)-烯
			XXIII	4- <i>O</i> -deacetylplagiochiline C
			XXIV	15,16-环氧,1,3,13(16),14-四烯克罗烷-17,12:18,6-二内酯
			XXV	15-羧-8 β ,16-二羟基-1,3,13E-三烯克罗烷-17,12:18,6-二内酯
圆叶苔 <i>Jamesoniella autumnalis</i> ^[23,24]	配子体	Gamborg B5	XXVI	15-羧-8 β ,16-二羟基-1,3,13Z-三烯克罗烷-17,12:18,6-二内酯
			XXVII	12-乙酰氧-15,16-环氧-17-羟基- <i>cis</i> -克罗烷-3,13(16),14-三烯-18,6-内酯
			XXVIII	1 β -乙酰氧-7,12-二羟基-15,16-环氧- <i>cis</i> -克罗烷-3,13(16),14-三烯-18,6-内酯
			XXIX	8-羟基-15,16-环氧- <i>cis</i> -克罗烷-3,13(16),14-三烯-8,6,20,12-二内酯
			XXX	圆叶苔内酯H
			XXXI	圆叶苔内酯I
			XXXII	圆叶苔内酯J
			XXXIII	2,3-二甲氧-7-羟菲
			XXXIV	2,7-二羟-3-甲氧菲
			XXXV	3,3'-二甲氧-2,2',7,7'-四羟-1,1'-联菲
地钱 <i>Marchantia polymorpha</i> ^[25]	配子体	Gamborg B5	XXXVI	2,2',3,3',7,7'-六甲氧-1,1'-联菲
			XXXVII	3-甲氧-2,2',3',7,7'-五羟-1,1'-联菲
			XXXVIII	2,2',3,3',7,7'-六羟-1,1'-联菲
			XXXIX	3-(3,4-二羟苯)-8-羟异香豆素
			XL	褐藻素 a
			XL I	13 ² -羟-(13 ² -S)-褐藻素 a
			XL II	13 ² -羟-(13 ² -R)-褐藻素 a
			XL III	过氧化褐藻素 a
			XL IV	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-16-羟-15,18-二羧酸-15,16-内酯
			XL V	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-1,13-三烯-15,18-二羧酸-15,16-内酯
卵叶羽苔 <i>Plagiochila ovalifolia</i> ^[26]	孢子	MSG-4	XL VI	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-1,3,13-三烯-15-羟-16,18-二羧酸-16,15-内酯
			XL VII	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-1,3,13-三烯-16-羟-15,18-二羧酸-15,16-内酯
			XL VIII	(-)-15,16-环氧- <i>cis</i> -克罗烷-3,13(16),14-三烯-12-羧-18-羧酸-18,6 α -内酯
			XL IX	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,16-二羟-15,18-二羧酸-15,16:18,6 α -二内酯
			XL X	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XI	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XII	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XIII	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XIV	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XV	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
林地合叶苔 <i>Scapania nemorea</i> ^[27]	孢子	B5	XL XVI	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XVII	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XVIII	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XIX	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XX	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XXI	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XXII	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XXIII	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XXIV	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯
			XL XXV	(-)- <i>cis</i> -克罗烷-3,13-二烯-12,15-二羟-16,17,18-三羧酸-16,15:18,6 α -二内酯

生物技术公司提出。发现与其他生物系统相比,苔藓植物小立碗藓 *Physcomitrella patens* (Hedw.) B. S. G. 具有许多无法比拟的优势(表2)^[28~30]。特别值得一提的是,小立碗藓是迄今唯一能够高效率地通过同源重组将外源DNA整合至基

因组中的植物,可有效地将木糖和岩藻糖转糖酶基因敲除,从而产生人源化的重组蛋白。转基因苔藓制药与其他表达系统制药过程相比具有上市时程(time-to-market)更短、安全性更高及成本更加低廉的优势。

小立碗藓反应器已成功表达了一种防止深部静脉血栓形成的人源化单克隆蛋白,正处于临床前阶段。这种IgG抗体可与天然配基正常结合。小立碗藓生物反应器中每个细胞每天可产生80 pg的人血管内皮生长因子重组蛋白,这比感

染杆状病毒的昆虫细胞表达系统产量更大。目前世界范围内的小立碗藓基因组工程已经启动,这将进一步提高小立碗藓反应器的安全性。苔藓制药有望为21世纪生物制药开辟一条新的产业途径。



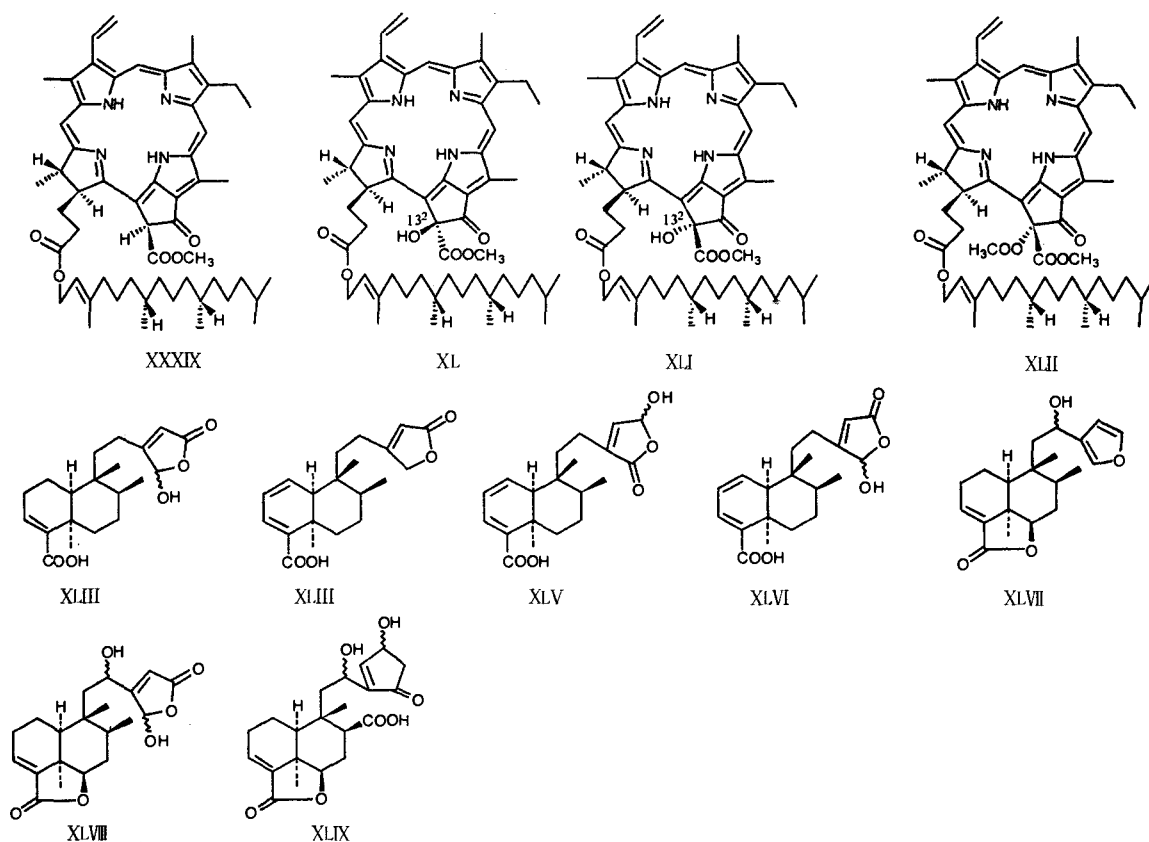


图4 化合物 I ~ XLIX 的结构

Fig. 4 Structures of compounds I — XLIX

表2 生产重组蛋白中微生物/动物细胞、高等陆生植物细胞和苔藓植物的特征比较

Table 2 Comparison with characteristics of microbe/animal cells, higher land plant cells, and bryophyte cells in production of recombinant proteins

特 征	微生物/动物细胞	高等陆生植物细胞	苔藓植物(小立碗藓)
剪切力敏感性	低/高	高	低
生产时期	不聚集成团	聚集成团	聚集成团
多聚蛋白的折叠组装	无/有	有	有
蛋白糖基化	无/有	有	有
植物特异的蛋白免疫原性的消除(木糖和岩藻糖引起)	—	难	易
生长条件	复杂	复杂	简单
下游处理	复杂	简单	简单
培养成本	低/高	高	低
感染动物病毒、病原菌、致癌基因以及细菌毒素的风险	高	低	低
基因操作	易/难	难	易
基因遗传稳定性	稳定	不稳定	稳定

4 药理筛选模型

苔藓植物中同时存在两种合成萜类代谢的前体物质异戊烯焦磷酸(isopentenyl diphosphate, IPP)的途径。其中2-C-甲基-D-赤藻糖醇-4-磷酸(MEP)途径的存在对苔藓组织培养成为药理筛选模型具有重要的意义。MEP途径存在于植物、细菌和疟原虫中,但人体中不存在这一途径。故该途径中所涉及的酶都可以成为筛选除草剂和抗病原微生物药物的潜在靶点。任何能阻断植物中MEP途径的物质均可成为潜在的抗病原微生物的药物。如除草剂fosmidomycin 不仅能

抑制鼠耳芥属植物中的DXR酶(deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase),而且也能抑制恶性疟原虫 *Plasmodium falciparum* 中的DXR酶,从而能够治愈感染疟原虫的小鼠^[31]。

这类植物筛选模型具有以下优势:(1)植物异戊二烯合成的速率要远高于微生物系统中的合成速率,这样表现特征较为灵敏;(2)植物筛选模型不需要特别的防护措施,较为安全,已有几种植物成功地用于药理筛选模型^[32,33]。虽然目前尚没有苔藓植物药理筛选模型报道,但鉴于苔藓组织培养

的优点,其发展潜力很大。

5 结语

目前,人们对苔藓植物的生理生化细节了解较少。这种现状很大程度上限制了人们在分子水平上理解和调控苔藓植物生命活动,成为苔藓组织培养应用的瓶颈。不过由于苔藓植物组织培养在学术上和工业上有巨大的应用价值,可以预期苔藓植物组织培养的研究必将全面地开展,也将得到更广泛的应用。

参考文献:

- [1] Hohe A, Reski R. From axenic spore germination to molecular farming: one century of bryophyte *in vitro* culture [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 23(8): 513-521.
- [2] Cove D, Bezanilla M, Harries P, *et al.* Mosses as model systems for the study of metabolism and development [J]. *Annu Plant Biol*, 2006, 57: 497-520.
- [3] Speicher A, Roeser H. Bioconversions of exogenous substrates by cell suspension cultures of bryophytes [J]. *Curr Top Phytochem*, 2002, 5: 53-66.
- [4] Izumi S, Yamamoto Y, Hirata T. Secretion of an esterase from the cultured suspension cells of *Marchantia polymorpha* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 38(4): 831-833.
- [5] Hirata T, Shimoda K, Kawano T. Asymmetric hydrolysis of enol esters with two esterases from *Marchantia polymorpha* [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, 11(5): 1063-1066.
- [6] Speicher A, Roeser H. Enantioselective hydrolase type bioconversions of exogenous substrates by cell suspension cultures of bryophytes [J]. *Tetrahedron: Asymmetry*, 2002, 13(21): 2365-2368.
- [7] Speicher A, Roeser H, Heisel R. Stereoselective oxidoreductase type bioconversions of exogenous substrates by cell suspension cultures of bryophytes [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2003, 22(1-2): 71-77.
- [8] Hirata T, Takaraka A, Hegazy M E F, *et al.* Hydrogenation of the C-C double bond of maleimides with cultured plant cells [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2005, 32(4): 131-134.
- [9] Hegazy M E F, Kuwata C, Matsushima A, *et al.* Biotransformation of sesquiterpenoids having α , β -unsaturated carbonyl groups with cultured plant cells of *Marchantia polymorpha* [J]. *J Mol Catal B: Enzym*, 2006, 39(1-4): 13-17.
- [10] Matsuura Y, Chai W, Endoh E, *et al.* Oxidative cleavage of the C-C bond of 3,6-dialkylcyclohexane-1, 2-diones by cell suspension cultures of *Marchantia polymorpha* [J]. *Phytochemistry*, 2002, 61(6): 669-673.
- [11] Friederich S, Rueffer M, Asakawa Y, *et al.* Cytochromes P-450 catalyze the formation of marchantins A and C in *Marchantia polymorpha* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(7): 1195-1202.
- [12] Hirata T, Ashida Y, Mori H, *et al.* A 37-kDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress [J]. *Phytochemistry*, 2000, 55(3): 197-202.
- [13] 王小宁, 姜红祥. 苔藓植物生物活性成分研究进展 [J]. *中草药*, 2005, 36(2): 303-307.
- [14] Becker H. Secondary metabolites from bryophytes *in vitro* cultures [J]. *J Hattori Bot Lab*, 1994, 76: 283-291.
- [15] Tazaki H, Iwasaki T, Nakasuga I, *et al.* ent-Kaurane-type diterpenoids produced by cell culture of the liverwort *Jungermannia subulata* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(8): 1427-1430.
- [16] Sauerwein M, Becker H. Growth, terpenoid production and antibacterial activity of an *in vitro* culture of the liverwort *Fossombronia pusilla* [J]. *Planta Med*, 1990, 56(4): 364-367.
- [17] Tazaki H, Soutome H, Nabeta K, *et al.* Pinguiculate derivatives from an axenic culture of the liverwort *Aneura pinguis* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 465-468.
- [18] Neves M, Morais R, Gafner S, *et al.* Three triterpenoids and one flavonoid from the liverwort *Asterella blumeana* grown *in vitro* [J]. *Phytother Res*, 1998, 12(1): 21-24.
- [19] Ono K, Toyota M, Asakawa Y, *et al.* Two azulenes produced by the liverwort, *Calypogeia azurea*, during *in vitro* culture [J]. *Phytochemistry*, 1992, 31(5): 1667-1670.
- [20] Nabeta K, Oohata T, Ohkubo S, *et al.* Spiro- γ -lactone diterpenes from *in vitro* cultures of the liverwort, *Heteroscyphus planus* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 41(2): 581-587.
- [21] Nabeta K, Ohkubo S, Hozumi R, *et al.* Macrocyclic bisbibenzyls in cultured cells of the liverwort, *Heteroscyphus planus* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(7): 1941-1943.
- [22] Nabeta K, Ohkubo S, Hozumi R, *et al.* Alloaromandendranes, bicyclogermacrane and 2, 3-*seco*-alloaromandendranes in cultured cells of the liverwort, *Heteroscyphus planus* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(1): 83-93.
- [23] Tazaki H, Nabeta K, Becker H. Clerodane-type diterpenoids from axenic cultures of the liverwort *Jamesoniella autumnalis* [J]. *Phytochemistry*, 1998, 48(4): 681-685.
- [24] Tazaki H, Becker H, Nabeta K. *Seco*-clerdane diterpenoids jamesoniellides H, I and J in axenic cultures of the liverwort *Jamesoniella autumnalis* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(6): 743-750.
- [25] Adam K P, Becker H. Phenanthrenes and other phenolics from *in vitro* cultures of *Marchantia polymorpha* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35(1): 139-143.
- [26] Matsuo A, Ono K, Hamasaki K, *et al.* Phaeophytins from a cell suspension of the liverwort *Plagiochila ovalifolia* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(2): 427-430.
- [27] Geis W, Buschauer B, Becker H. *cis*-Clerodanes from axenic cultures of the liverwort *Scapania nemeorea* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 51(5): 643-649.
- [28] Doran P M. Foreign protein production in plant tissue cultures [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(2): 199-204.
- [29] Decker E L, Reski R. The moss bioreactor [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2004, 7(2): 166-170.
- [30] Decker E L, Gorr G, Reski R. Moss-an innovative tool for protein production [J]. *Bioforum Europe*, 2003, 7: 96-97.
- [31] Jomma H, Wiesner J, Sanderbrand S, *et al.* Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as anti-malarial drugs [J]. *Science*, 1999, 285: 1573-1576.
- [32] Zeidler J, Schwender J, Mueller C, *et al.* The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for drugs against malaria and pathogenic bacteria [J]. *Biochem Soc T*, 2000, 28: 796-798.
- [33] Lange B M, Ketchum R E B, Croteau R B. Isoprenoid biosynthesis. Metabolite profiling of peppermint oil gland secretory cells and application to herbicide target analysis [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(1): 305-314.