

基于 ITS 序列位点特异性 PCR 鉴别桃仁与苦杏仁

高琳惠¹ 尹 艳² 李 佳¹ 马玥萌¹ 李文斌¹ 李博文¹ 张夏楠¹

(1 首都医科大学中医药学院,北京,100069; 2 贵州大学,贵阳,550025)

摘要 目的:对桃仁和苦杏仁进行分子鉴定研究,建立基于 ITS 序列位点特异性的 PCR 鉴定方法。方法:收集桃仁、苦杏仁样品,提取基因组总 DNA,用 ITS 通用引物进行测序,通过 BioEdit 软件进行序列比对,根据特异位点设计鉴别引物进行特异性 PCR 反应,并对 PCR 反应条件进行了优化。结果:基于 ITS 序列设计的特异性鉴别引物 G4-7 可以用于桃仁和苦杏仁的鉴别研究,在位点特异性 PCR 反应条件考察中,25 μ L 反应体系 DNA 模板用量适宜范围为 0.05 ~ 1 ng,退火温度在 59 $^{\circ}$ C 时特异性最佳,实验建立的方法对不同 DNA 聚合酶和 PCR 仪均具有普适性。结论:该研究设计的位点特异性引物在一定条件下的 PCR 反应中,桃仁能够扩增出 333 bp 清晰条带,而苦杏仁没有该条带,从而实现了桃仁与苦杏仁的快速、准确鉴别。

关键词 桃仁;苦杏仁;ITS;位点特异性 PCR;分子鉴定

Identification of Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum by PCR Amplification of Specific Alleles Based on ITS Sequences

Gao Linhui¹, Yin Yan², Li Jia¹, Ma Yuemeng¹, Li Wenbin¹, Li Bowen¹, Zhang Xia'nan¹

(1 School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2 School of Pharmaceutical Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract To identify Persicae semen amarum using DNA molecular identification, and establish classical PCR identification method. The internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA of Persicae Semen and Armeniacae semen amarum were amplified and bidirectionally sequenced. ITS sequences were analysed by BioEdit. Specific identification primers were designed according to the ITS sequences of specific alleles, and PCR reaction system was optimized. Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum can be identified by the specific primers G4-7 based on ITS sequences. In the condition's concentration is between 0.05-1 ng for a 25 μ L PCR reaction, the best annealing temperature is 59 $^{\circ}$ C. This method is well used for different DNA polymerases and different PCR instruments. The result showed that the 333 bp identification band can be amplified in Persicae semen, while it can not be amplified in Armeniacae semen amarum. It is confirmed that the PCR amplification system of specific alleles can be used to identify Persicae semen and Armeniacae semen amarum fastly and accurately.

Key Words Persicae Semen; Armeniacae Semen Amarum; ITS; PCR amplification of specific alleles; Molecular identification

中图分类号:R284;R917 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.09.050

桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *P. davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子,性平,味苦、甘,归心、肝、大肠经,具有活血祛瘀,润肠通便,止咳平喘之功效,用于经闭痛经,癥瘕痞块,肺病肠痛,跌扑损伤,肠燥便秘,咳嗽气喘^[1]。苦杏仁为蔷薇科同属植物山杏 *P. armeniaca* L. var. *ansu* Maxim.、西伯利亚杏 *P. sibirica* L.、东北杏 *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne 或杏 *P. armeniaca* L. 的干燥成熟种子,性微温、味苦,归肺、大肠经,具有降气止咳平喘,润肠通便之功效,用于咳嗽气喘,胸满痰多,肠燥便秘^[1]。桃仁与苦杏仁在外观上非常相似,经脱皮、炮制加工后更难区分,然而两者药

理作用显著不同,桃仁属于活血化瘀药,杏仁属于止咳平喘药。且两者主要化学成分均为苦杏仁苷,应用传统鉴别方法容易出现误差。此外,苦杏仁中苦杏仁苷含量较高,该化合物被苦杏仁酶代谢分解后会产生有毒的氢氰酸,过量则会引起中毒,桃仁和苦杏仁的混用容易引起潜在的用药风险^[2]。因此,建立一种快速、简易、准确鉴定桃仁和苦杏仁的分子鉴定体系,对于控制桃仁的药材质量以及用药安全都具有十分重要的意义。本实验基于 ITS 序列位点特异性 PCR 技术对桃仁和苦杏仁药材样品进行鉴别,设计特异性鉴别引物并对特异性 PCR 反应条件进行了摸索和优化,实验确定的鉴别方法稳定、快速,

基金项目:国家自然科学基金(81303166);国家中医药管理局中医药行业专项(201407003)

作者简介:高琳惠(1993.07—),女,在读研究生,研究方向:分子生药学,E-mail:gaolinhui1993@qq.com

通信作者:张夏楠(1982.04—),女,博士,讲师,研究方向:分子生药学,E-mail:xnzhang@ccmu.edu.cn

为桃仁和苦杏仁的准确鉴别提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品 桃仁与苦杏仁样品来源有:购自河北安
国中药材市场和安徽亳州药材市场的药材,由首都
医科大学中医药学院李佳副教授鉴定(编号:1,2,
10,11,12,19);采集自山西、河北、北京的桃仁、山桃
仁、苦杏仁样品由北京中医药大学刘春生教授鉴定
(编号:8,9,18,24,25,26);全国中药资源普查中心
提供的桃仁与苦杏仁样品(编号:3,4,5,6,7,13,14,
15,16,17,20,21,22,23),样品信息见表 1。桃仁标
准药材(山桃,121560-201302,编号 T)、苦杏仁标准
药材(杏,121554-201204,编号 X)购于中国食品药
品检定研究院。NCBI 下载序列见表 2。

表 1 本实验所用样品材料

编号	药材名	种名	产地	编号	药材名	种名	产地
1	桃仁	桃	西藏	14	桃仁	山桃	山西省临汾市
2	桃仁	桃	河北省	15	桃仁	山桃	山西省晋中市
3	桃仁	桃	山西省忻州市	16	桃仁	山桃	山西省长治市
4	桃仁	桃	山西省吕梁市	17	桃仁	山桃	山西省忻州市
5	桃仁	桃	山西省运城市	18	桃仁	山桃	山西省
6	桃仁	桃	山西省晋中市	19	苦杏仁	杏	河北省
7	桃仁	桃	湖南省株洲市	20	苦杏仁	杏	山西省忻州市
8	桃仁	桃	山西省	21	苦杏仁	杏	山西省长治市
9	桃仁	桃	河北省	22	苦杏仁	杏	山西省临汾市
10	桃仁	山桃	四川阿坝	23	苦杏仁	杏	山西省晋中市
11	桃仁	山桃	河北省	24	苦杏仁	杏	山西省
12	桃仁	山桃	北京市平谷	25	苦杏仁	杏	河北省
13	桃仁	山桃	山西省晋城市	26	苦杏仁	杏	北京市怀柔

表 2 NCBI 下载序列信息

药材名	GeneBank 号	来源物种
桃仁	JQ280475.1	<i>Prunus persica</i>
桃仁	AF318741.1	<i>Prunus persica</i>
桃仁	AF318744.1	<i>Prunus davidiana</i>
苦杏仁	AF318756.1	<i>Prunus armeniaca</i>
苦杏仁	EF211085.1	<i>Prunus armeniaca</i>

1.2 仪器 PCR 仪(Applied Biosystems Veriti;Eppendorf AG 22331);微量核酸定量仪(NanoDrop 2000C);高级荧光化学发光系统(FUSION-SL)。

1.3 试剂 植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型 DP305-2, TIANGEN);2 × EasyTaq PCR SuperMix (AS111, TRANS);2 × Taq PCR StarMix (A112, GenStar);Ex Taq DNA 聚合酶(RR53AM, TakaRa);Phu-sion 超保真 PCR Master Mix (M0531, BioLab);2K DNA Marker(E110, TransGen)。

1.4 方法

1.4.1 基因组 DNA 的提取、通用引物 PCR 扩增及
测序 取样品约 100 mg,经粉碎后,用植物基因组
DNA 提取试剂盒提取各药材总 DNA,最后用 50 μL

无菌水洗脱。样品用通用引物 ITS^[3](序列见表 1)
以高保真酶扩增样品 DNA 并进行双向测序。PCR
扩增体系为 Phusion 超保真 PCR Master Mix 12.5
μL,正反向引物各 0.75 μL,DNA 2 μL,无菌水 9
μL,总体系 25 μL。PCR 扩增程序见表 3。PCR 产
物由北京睿博兴科生物技术有限公司测序部测序,
各样品均采用正反双向测序,以保证结果的准确性。

表 3 引物及 PCR 反应条件

引物 名称	引物序列 5´-3´	PCR 反应条件
ITS 5a fwd	CCITATCATTTAGAGGAAGGAG	98 ℃ 30 s,35 个循环(98 ℃ 10 s,50 ℃
4 rev	TCCTCCGCTTATTGATATGC	25 s,72 ℃ 30 s),72 ℃ 7 min,4 ℃ ∞
G4-7 6F	GGGGCCCTGCGGCTCCTT	94 ℃ 5 min,30 个循环(94 ℃ 30 s,59 ℃
7R	AGGCGTGCCCTCGGCCTAG	30 s,72 ℃ 30 s),72 ℃ 7 min,4 ℃ ∞

1.4.2 序列分析 将测序结果与网上桃仁与苦杏
仁序列用 CLUSTAL X 软件进行序列比对,使用
MEGA6 用邻接(NJ)法构建系统聚类树,Bootstrap
(1000 次重复)检验各分支的支持率。

1.4.3 特异性鉴别引物的设计 将所测得的序列
与 GenBank 中的桃仁与苦杏仁 ITS 序列用 BioEdit
软件进行比对分析,找出具有稳定差异的特异性片
段,筛选获得变异位点,通过该位点运用 Premier
Primer 5.0 软件针对桃仁的特异性片段设计多对鉴
别引物,并由睿博兴科生物技术有限公司合成。

1.4.4 PCR 引物特异性筛选 用所设计引物进行
PCR 反应,PCR 所用 25 μL 反应体系为:2 × EasyTaq
PCR Super Mix 12.5 μL,正反向引物各 0.5 μL,DNA
稀释 20 倍后取 1 μL,无菌水补齐。PCR 产物采取
琼脂糖凝胶电泳方法检测。以结果出现整齐、清晰
条带为阳性,其余为阴性,由此判断引物特异性。

1.4.5 特异性 PCR 反应条件优化 为获得最优的
位点特异性 PCR 反应条件,对其反应条件进行优
化,分别考察了 DNA 模板浓度(0.005 ng/μL、0.01
ng/μL、0.02 ng/μL、0.05 ng/μL、0.1 ng/μL、0.2 ng/
μL、0.25 ng/μL、0.5 ng/μL、1 ng/μL、2 ng/μL)、退
火温度(55 ℃、57 ℃、59 ℃、61 ℃、63 ℃)、聚合酶种
类(Ex Taq DNA 聚合酶、2 × Taq PCR StarMix、2 ×
EasyTaq PCR SuperMix)、不同 PCR 仪(Applied Bio-
systems Veriti;Eppendorf AG 22331)对 PCR 反应的
影响。反应体系为:DNA 聚合酶 12.5 μL,正反向引
物各 0.5 μL,DNA 1 μL,无菌水补足 25 μL。

2 结果与分析

2.1 通用引物 PCR 扩增电泳结果 ITS 通用引物
扩增样品的成功率为 100%,即全部具有明亮清晰
条带。扩增结果如图 1。

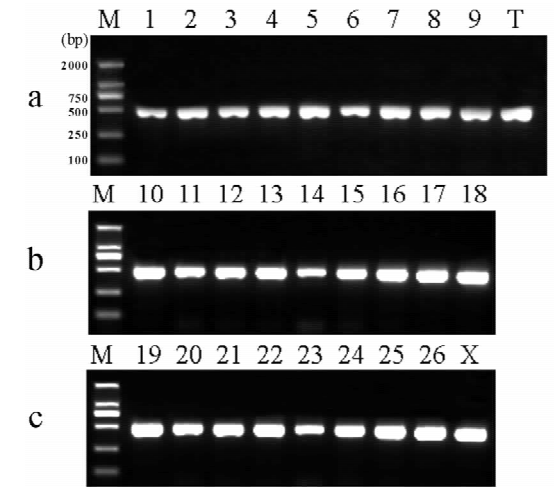


图1 通用引物 PCR 结果

注:a:桃仁1-9 以及桃仁标准药材 T;b:山桃 10-18;c:杏仁 19-26 以及苦杏仁标准药材 X;M:DNA 分子标记

2.2 基于 ITS 序列桃仁与苦杏仁样品的系统进化树构建 采用 Mega 6 分析软件进行桃仁与苦杏仁系统发育树的构建,采用邻接法 (NJ) 构建系统发育树。见图 2,采用 Kimura2-parameter 距离,系统树各分支的置信度用 bootstrap method 检验,共进行 1 000 次循环。由图 2 可知,桃仁样品与桃仁标准药材聚为一支,苦杏仁与苦杏仁标准药材聚为一支,表明 ITS 序列用于桃仁与苦杏仁的分子鉴定具有一定的理论依据。

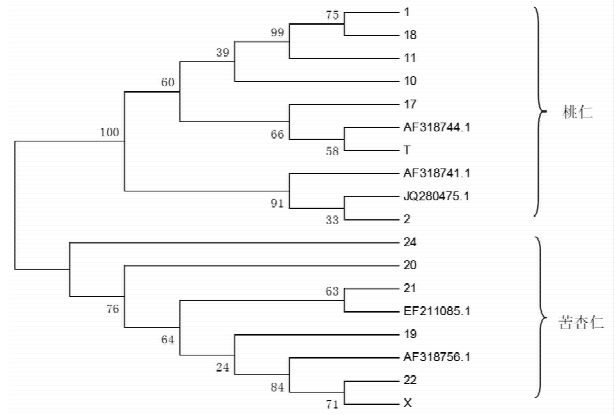


图2 基于 ITS 序列构建的桃仁与杏仁药材的邻接 (NJ) 树

注:桃仁:1, 2, 10, 11, 17, 18, T, AF318744.1, AF318741.1, JQ280475.1;苦杏仁:19, 20, 21, 22, 24, X, AF318756.1, EF211085.1

2.3 特异性引物 PCR 扩增 用筛选的特异 PCR 引物 G4-7 (序列见表 3) 对提取的桃仁和苦杏仁 DNA 模板进行扩增。如图 3 所示,桃仁标准药材与桃仁样品特异性扩增结果呈阳性,条带整齐、清晰明亮,大小 333 bp,而苦杏仁标准药材与苦杏仁样品特异性扩增结果均呈阴性,证明该引物具有良好的特

异性。

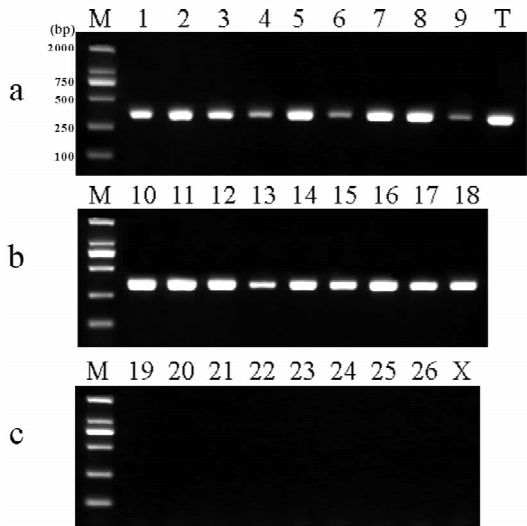


图3 特异引物 PCR 结果

注:a:桃1-9 以及桃仁标准药材 T;b:山桃 10-18;c:杏仁 19-26 以及苦杏仁标准药材 X M:DNA 分子标记

2.4 PCR 扩增反应条件优化

2.4.1 DNA 模板量的考查 对 25 μ L PCR 反应体系中的模板 DNA 用量进行了考察,结果如图 4,DNA 模板浓度在 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 时苦杏仁出现假阳性条带,而在 0.02 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 时桃仁不能出现清晰、明亮条带,且其引物二聚体明显增多 (见图 4),因此确定本方法 DNA 模板浓度适宜范围应为 0.05 ~ 1 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。实验采用 0.05 $\text{ng}/\mu\text{L}$ DNA 模板浓度继续进行其他条件的考察。

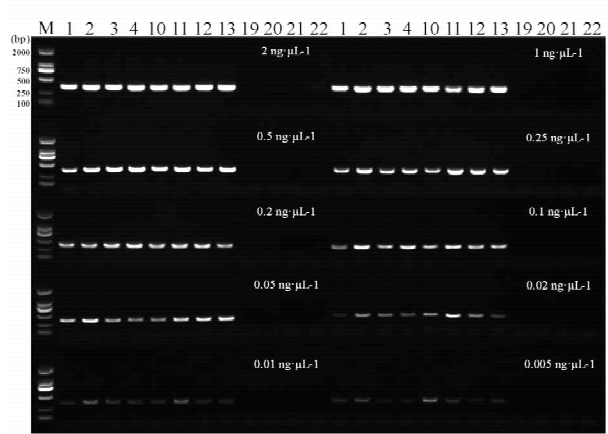


图4 DNA 模板浓度优化结果

注:1-13:桃仁,19-22:苦杏仁;M:DNA 分子标记

2.4.2 退火温度的考查 设置退火温度分别为 55 $^{\circ}\text{C}$ 、57 $^{\circ}\text{C}$ 、59 $^{\circ}\text{C}$ 、61 $^{\circ}\text{C}$ 、63 $^{\circ}\text{C}$ 进行考察,结果见图 5。从结果可见,桃仁均出现整齐、清晰条带,而苦杏仁均无条带,表明退火温度对其无明显影响,采用 59 $^{\circ}\text{C}$ 作为此方法的退火温度。

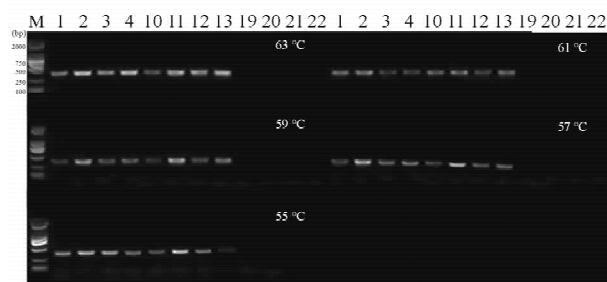


图5 退火温度考查结果

注:1-13:桃仁,19-22:苦杏仁;M:DNA 分子标记

2.4.3 DNA 聚合酶的考察 对 Ex Taq DNA 聚合酶,2 × Taq PCR StarMix,2 × EasyTaq PCR SuperMix 3 种聚合酶进行考察。结果如图 6。采用不同聚合酶的 PCR 反应,伪品均无条带,而正品均有 333 bp 特异性扩增条带,说明特异性引物可用多种酶进行实验,无单一局限性。

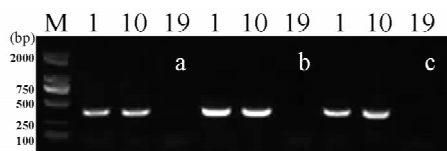


图6 不同酶考查结果

注:1,10:桃仁,19:苦杏仁。a:Ex Taq DNA 聚合酶,b:2 × Taq PCR StarMix,c:2 × EasyTaq PCR SuperMix;M:DNA 分子标记

2.4.4 PCR 仪对实验结果重复性的影响 选用 2 种不同型号的 PCR 仪(Eppendorf AG 22331、Applied Biosystems Veriti)进行考察,结果桃仁均出现整齐、明亮清晰的条带,苦杏仁均无条带出现(图 7),表明此方法稳定性好,重复性高,PCR 仪对其结果无明显影响。

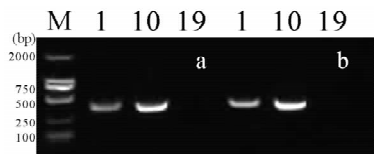


图7 不同 PCR 仪考查结果

注:1,10:桃仁,19:苦杏仁。a:Eppendorf AG 22331 PCR 仪;b:Applied Biosystems Veriti PCR 仪;M:DNA 分子标记

3 讨论

由于桃仁品种繁杂,形态变异大,且与苦杏仁形态相似,尤其是山桃仁在形态上与杏仁更加难以区分,故传统鉴别在实际应用中很难将两者准确区别。位点特异性引物 PCR 具有操作简单、成本低、重复性好等优点,使用特异性引物可以极大降低 PCR 的假阳性率,保证鉴定结果的准确性^[4],特别是近年来快速 PCR 技术迅速发展,使得中药材分子鉴定在现

场快速鉴定上的应用成为了可能^[5-6]。如李振华等^[7]通过位点特异 PCR 的方法证明了荒漠肉苁蓉能扩增出 331 bp 的条带,而混伪品不能,从而实现了荒漠肉苁蓉与其混伪品的快速、准确鉴别。陈康等^[8]在位点特异性引物 PCR 方法的基础上改良实验条件,应用快速 PCR 方法通过显示荧光区分真伪蛇类药材,所建立的蛇类药材快速 PCR 真伪检测方法可在 30 ~ 45 min 完成。赵丹等^[9]对太子参药材及其混伪品的 rDNA-ITS 片段进行比对分析,应用特异性引物 PCR 方法将太子参药材及其混伪品进行了很好的区分。

DNA 条形码技术在物种鉴别分类上起到了越来越重要的作用^[10-12]。植物常用鉴别序列是 ITS 序列,包括 ITS1、ITS2,分别位于 18S ~ 5.8S rDNA、5.8S ~ 26S rDNA 之间,长度分别为 187 ~ 298 bp 和 187 ~ 252 bp,而 18S、5.8S、26S rDNA 的序列又非常保守,所以其通用引物可适用物种范围广泛^[13]。Chen 等^[3]比较了药用植物中 7 个候选的 DNA 条形码(psbA-trnH、rbcL、matK、rpoC1、ycf5、ITS2 以及 ITS),并且测试了 ITS2 鉴别 753 个属 4 800 个物种的 6600 个样品的成功率,结果为其鉴别成功率在种水平上为 92.7%,最终认为 ITS2 可做为更广泛的药用植物鉴别 DNA 条形码。林韵涵等对药材桃仁及其近缘种进行分子鉴定,结果表明 ITS2 序列作为 DNA 条形码可以有效地鉴定药材桃仁及其近缘种。因此本实验最初选用桃仁及苦杏仁药材 ITS2 序列进行测序,但由于其亲缘关系较近,序列相似度较高,且多处均为单个碱基的不同,因此难以设计鉴别度较好的特异引物。中国植物条形码工作组^[14]对来自 42 目 75 科 141 属 1 757 个物种的 6 286 个种子类植物样本的 rbcL、matK、psbA-trnH、ITS 序列进行研究,结果表明 ITS 有最高的鉴别能力,建议 ITS/ITS2 应成为种子植物的核心条形码。因此本实验即对桃仁及苦杏仁药材 ITS 序列进行测序,2 种药材 ITS 序列中 Poly 结构较多,突变缺失情况较严重,并不是所有药材均能测序成功,但根据所测序结果以及与网上序列进行比对分析,设计特异性鉴别引物,结果表明其引物特异性好,鉴别能力高,可作为桃仁及苦杏仁药材鉴别的特异引物。

本实验通过特异引物筛选和条件优化,最终确定 25 μL PCR 反应体系时,引物 G4-7 在 DNA 模板加样量 0.05 ~ 1 ng 范围内,退火温度 55 ~ 63 °C 时可将桃仁与苦杏仁进行有效的鉴别。该方法灵敏度高,稳定性好,可用于桃仁与苦杏仁的分子鉴别以及

桃仁药材分子鉴定的推广与应用,且为桃仁药材的快速鉴别提供了参考依据。

参考文献

[1] 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,2015:201-202,277-278.

[2] 杜虹韦,张爱华,赵欣蕾. 苦杏仁毒性及其解毒方法研究进展[J]. 黑龙江中医药,2013,43(4):58-59.

[3] Chen S,Yao H,Han J,et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010,5(1):e8613.

[4] 黄璐琦. 中药分子鉴定操作指南[M]. 上海:上海科学技术出版社,2014.

[5] 蒋超,侯静怡,黄璐琦,等. 快速 PCR 方法在金银花真伪鉴别中的应用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3668-3672.

[6] 蒋超. 中药现场快速鉴别方法的建立—以金银花为例[D]. 北京:中国中医科学院,2013.

[7] 李振华,龙平,邹德志,等. 基于 ITS 序列位点特异性 PCR 的肉苁蓉与其混伪品的鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3684-3688.

[8] 陈康,蒋超,袁媛,等. 快速 PCR 方法在蛇类药材真伪鉴别中的应用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3673-3677.

[9] 赵丹,周涛,江维克,等. 太子参药材的快速分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3689-3694.

[10] 韦健红,吴文如,喻良文,等. DNA 条形码技术在生物分类中的应用[J]. 广东药学院学报,2010,26(4):430-433.

[11] 裴男才,陈步峰. 生物 DNA 条形码:十年发展历程、研究尺度和功能[J]. 生物多样性,2013,21(5):616-627.

[12] 韩建萍,宋经元,姚辉,等. 中药材 DNA 条形码鉴定的基因序列比较[J]. 中国中药杂志,2012,37(8):1056-1061.

[13] 程龙,葛斐林,刘泽邦,等. 中药资源 DNA 条形码鉴定方法研究进展[C]. 北京:第四届中国中药商品学术大会暨中药鉴定学科教学改革与教材建设研讨会论文集,2015:398-404.

[14] Li DZ,Gao LM,Li HT,et al. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer(ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011,108(49):19641-19646.

(2016-11-30 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第 2189 页)

[16] 刘素梅. 紫草素诱导人神经胶质瘤 U251 细胞凋亡及相关机制的研究[D]. 新乡:新乡医学院,2014.

[17] Duan D,Zhang B,Yao J,et al. Shikonin targeting the cytosolic thioredoxin reductase to induce ROS-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. Free Radic Biol Med,2014,70C:182-193.

[18] 周健. 紫草素提取、转化及其脂质体制备工艺研究[D]. 承德:承德医学院,2016.

[19] 葛素因,王芳,周歌,等. 新疆紫草及其毛状根中萘醌类化合物的研究[J]. 中药新药与临床药理,2015,25(5):675-681.

[20] 李翠芳,王芳,麻浩. 新疆紫草毛状根提取物的抗氧化活性研究[J]. 新疆农业科学 2010,47(2):291-295.

[21] 涂美娟. OCT1 及 CYP3A4 介导的吡咯里西啶生物碱肝脏转运及毒性研究[D]. 杭州:浙江大学,2014.

[22] 解欣然,张蕾,刘欣,等. 紫草素对 IL-17 诱导角质形成细胞增殖

及趋化因子表达的影响[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):946-949.

[23] 付绍秀,雷用钊. 复方紫草油治疗肛周湿疹疗效观察[J]. 实用中医药杂志,2014,11(30):1046.

[24] 康真,先民,王家祝,等. 紫草油联合龙血竭和维生素 B12 治疗放射性皮炎[J]. 西部医学,2014,26(12):1599-1600+1603.

[25] 陈闵希,李健. 复方紫草油加表皮生长因子外用治疗难治性创面临床观察[J]. 中国实用医药,2014,8(31):135.

[26] 罗宏宾. 紫草素对皮肤成纤维细胞增殖、凋亡的调控及抑制增生性瘢痕形成的机制研究[D]. 杭州:浙江中医药大学,2017.

[27] 楚广玉. 紫草纱条与康惠尔泡沫敷料贴对晚期癌症患者深度压疮治疗效果的比较[D]. 天津:天津医科大学,2016.

[28] 朱丽. 复方紫草油在重症药疹皮肤护理中的应用[J]. 中国医疗美容,2014,4(4):140-141.

(2017-08-20 收稿 责任编辑:徐颖)