高山大黄的显微及分子鉴定研究

费 烨[1] 付深振[1] 吴浩忠[1] 李启恩[2] 多吉任青[3] 陈 静[3] 闫兴丽[1] 魏胜利[1] 高增平[1]
(1 北京中医药大学中药学院,北京,100102; 2 兰州大学生命科学学院,兰州,730000; 3 西藏藏医学院,拉萨,850000)

摘要 目的:对蓼科药用植物高山大黄进行显微及分子鉴定研究。方法:采用石蜡切片、粉末制片对高山大黄根及根茎的横切面组织结构和粉末特征进行显微研究,并采用 *mat*K 基因序列分析技术对高山大黄进行了分子鉴定研究。结果:高山大黄根横切面中皮层宽,薄壁细胞中可见草酸钙簇晶,木质部宽广,导管径向排列;根茎髓部宽广,无异形维管束存在;粉末中草酸钙簇晶多,棱角大多短钝,导管木质化,多网纹导管,淀粉粒小而多。高山大黄 *mat*K 序列全长 1 524 bp,在基因上游 106、218、222、365、522、615、711、759、801、852 处存在十处碱基替换,且在 950 - 955 处存在 CAAGAA6 个碱基插入。结论:本研究获得了高山大黄比较全面的鉴定信息,上述显微特征可作为高山大黄显微鉴定依据,其 *mat*K 基因序列分析为高山大黄 DNA 条形码研究奠定基础。

关键词 高山大黄;显微鉴定;分子鉴定

Microscopic and Molecular Identification of Rheum Nobile

Fei Ye[1], Fu Shenzhen[1], Wu Haozhong[1], Duoji Renqing[3], Chen Jing[3] Yan Xingli[1], Wei Shengli[1], Gao Zengping[1]
(1 *School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100102, *China*; 2 *School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou* 730000, *China*; 3 *Tibetan Traditional Medical College, Lhasa* 850000, *China*)

Abstract **Objective**: To perform a study of the medicinal herbal microscopic and molecular identification of Rheum nobile radix and rhizome. **Methods**: The cross sections of Rheum nobile radix and rhizome were obtained by using paraffin sectioning, and temporary glycerol tablets with chloral hydrate were used to identify the microscopic structure of powder. The matK gene sequence analysis technique was used for molecular identification of Rheum nobile. **Results**: In the cross-section of radix, both the cortex and xylem were wide with vessels arranging radially and massive calcium oxalate crystal visible in parenchyma cells. Pith part was broad without any abnormal vascular bundle. Powder contained a mass of calcium oxalate crystals whose edges were mostly short blunt. There were lignified vessels and small starch grain as well. The length of matK gene sequence of Rheum nobile was 1 524 bp. Upstream of matK sequence, there were ten base-pair substitutions in 106, 218, 222, 365, 522, 615, 711, 759, 801, 852, and 6 bases CAAGAA inserted in 950-955. **Conclusion**: The research tends to contain relatively comprehensive identification information of Rheum nobile. These microscopic features can be used as evidence for identification of Rheum nobile radix and rhizome, and the matK gene sequence analysis helps lay a foundation for Rheum nobile DNA barcoding research.

Key Words Rheum nobile; Microscopic identification; Molecular identification

中图分类号:R284.1 **文献标识码**:A **doi**:10.3969/j.issn.1673 - 7202.2015.02.028

高山大黄是蓼科植物高山大黄 *Rheum nobile* Hook. f. et Thoms 或西伯利亚蓼 *Polygonum sibiricum* Laxm 的根茎[1],为常用藏药。高山大黄别名塔黄[2],据《新华本草纲要》记载,其根亦可入药[3]。高山大黄主产于西藏喜马拉雅山麓及云南西北部[4],形似宝塔[5],因其淡黄色半透明苞叶对于包裹其中的总状花序有类似温室的保温作用[6]而有“温室植物”之称。该药性温,味酸、苦,消肾性水肿,主治黄水病[2]。藏医认为黄水是机体的组成物质之一,受“龙”“赤巴”“培根”支配,生理异变时形成黄水病。黄水病可扩散至肌肉,游窜到脉道,或著于骨,或降于脏器,范围非常广泛[7]。因其治疗黄水病的疗效显著可靠,高山大黄在当地深受百姓青睐。到目前为止,仅有关于其苞叶的化学成分[6]和生态功能[8]等研究,未见有关高山大黄的鉴定研究报道,为了全面了解这一神秘的高山植物,本研究揭示了高山大黄的横切面及粉末的显微特征和 *mat*K 基因序列的特异性位点,为该药用植物的鉴定提供了科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料 实验材料采集自西藏,经西藏藏医学院嘎乌教授鉴定为蓼科(Polygonaceae)大黄属

基金项目:北京中医药大学自主选题(藏医药类)课题资助项目(编号:2013-zyy-02)

作者简介:费烨,在读硕士研究生,E-mail:rabea@126.com
通信作者:高增平,教授,博士生导师,主要研究方向:中药有效物质基础和质量研究,电话:(010)84738628,E-mail:gaozengping0812@163.com

(*Rheum*)高山大黄 *Rheum nobile* Hook. f. et Thoms。实验材料来源信息见表 1。

表 1 实验材料来源信息

Number	*Species*	Locality of voucher	Date
1	*Rheum nobile*	Lhasa, Xizang	2011 – 10
2	*Rheum nobile*	Linzhi, Xizang	2012 – 9
3	*Rheum nobile*	Linzhi, Xizang	2013 – 8

1.2 仪器 八两高速中药粉碎机 LG-08A(浙江瑞安市百信药机器械厂);切片机 SHANDON FINESSE325(北京鸿泰嘉业科技发展有限公司);TK-218 型恒温摊片拷片机(湖北泰维医疗科技有限公司);富士 X10 数码相机;OLYMPUS BX 51 显微系统及 DP71 图像采集系统。

1.3 方法

1.3.1 组织横切制片 新鲜植物组织经 FAA 液(福尔马林 – 冰醋酸 – 80% 乙醇 = 5∶5∶90)固定,按常规石蜡切片法[9],经过脱水、透明、浸蜡、包埋、修块、切片、展片烘干、脱蜡步骤后,以番红和固绿染色,制成永久石蜡切片,在显微镜下观察成像。

1.3.2 粉末制片 将高山大黄的根及根茎粉碎,过 60 目筛,取适量粉末水合氯醛透化,并滴加间苯三酚 – 盐酸制片,进行显微观察。

1.3.3 DNA 分子鉴定 1)DNA 提取:取药材约 100 mg,在预先冷冻的研钵中加液氮研磨成细粉。其余按照博迈德公司广谱植物基因组 DNA 提取试剂盒说明操作。1% 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 质量。所得 DNA-200 ℃ 保存。2)扩增引物:大黄 *mat*K 序列 PCR 扩增的引物采用日本 Rersearch Center for Ethnomedicines, Institute of Natural Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutial University 设计的三对引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物信息及退火温度见表 2。3)扩增 PCR 体系:PCR 扩增反应在 50 μL 的体系中完成。反应体系:灭菌 ddH_2O 30 μL, 10 × Buffer5 μL, 1.5 mmol/L $MgCl_2$/NTP4 μL,引物 2 μL,模板 1 μL,TaqDNA 聚合酶 l μL。DNA 模板约 50 ng。4)PCR 扩增程序:95 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,50 ℃退 50 s,72 ℃延伸 1 min,共 35 个循环后,72 ℃ 延伸 10 min。5)测序:PCR 扩增结果经琼脂糖凝胶电泳检测合格后送上海生工生物工程有限公司北京测序部进行双向测序。6)序列分析:测序结果用 CondonCode 软件进行峰图分析,去除低质量序列及引物端。用 ContingExpress 软件对序列进行拼接,对拼接后的序列进行手工校正,根据大黄属 *mat*K 界限截取高山大黄的 *mat*K 序列。

表 2 *mat*K 扩增引物片段及退火温度

Number	Sequence5'-3'	Tm(℃)
*Pt-trn*K692F	GACTGTATCGCACTATGTATC	51.0
*trn*K1544R	GGATAACCCCAGAATGCTTAG	51.0
*mat*K592F	TCCTACCGTGTGTGAATGCG	52.0
*mat*K8R	AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA	52.0
*trn*K1895F	GACATCCCATTAGTAAGCC	50.0
*trn*K2R	AACTAGTCGGATGGAGTAG	50.0

2 结果

2.1 根横切面 类圆形。木栓层 2 – 4 列细胞,排列紧密。皮层较宽,其间可见草酸钙簇晶散在。韧皮部较窄,韧皮射线明显,形成层整体成环,波状弯曲。木质部宽广,占横切面 1/2 以上,木质部射线明显,导管木质化成束径向排列,近中心处单个散在。薄壁细胞含草酸钙簇晶。见图 1。

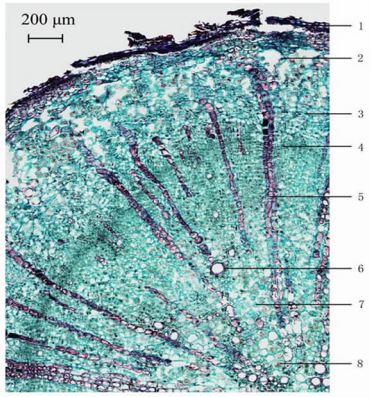


图 1 高山大黄根的显微结构

2.2 根茎横切面 类圆形。木栓层数列细胞,栓内层排列紧密,充满红棕色物质。皮层较窄,韧皮部细胞小,排列紧密,射线明显 1 – 4 列细胞,形成层整体成环状。木质部较宽,木质部导管径向排列。髓部宽广,薄壁细胞排列疏松,无异形维管束存在。薄壁细胞含草酸钙簇晶。见图 2。

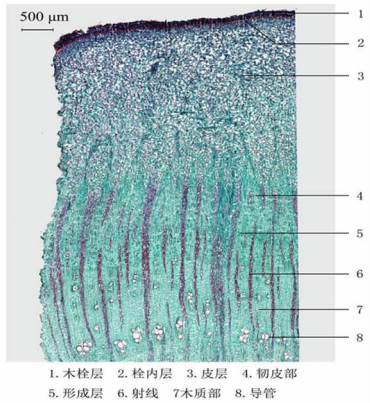
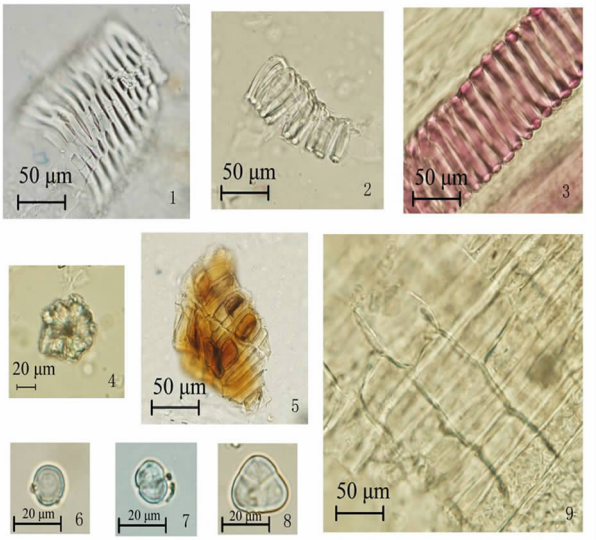


图 2 高山大黄根茎的显微结构

表 3　高山大黄 *mat*K 序列对比(以掌叶大黄 Pq1 *mat*K 序列为参比，* 表示与之相同基因，– 表示序列空缺位点)

Species	Samples	Nucleotide position																															
		1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	6	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9	9	9	1	1	1
		0	1	2	6	7	4	5	2	8	1	1	1	0	1	5	4	6	8	9	0	3	5	5	5	5	5	5	5	0	2	4	
		6	8	2	5	9	3	1	2	7	2	5	9	7	1	9	3	4	7	1	1	8	2	9	0	1	2	3	3	5	4	9	8
																														9	4	5	
Rheum palmatum	Pq1	G	T	T	G	C	T	G	C	A	A	A	A	C	A	G	C	A	C	C	C	C	A	A	–	–	–	–	–	–	C	T	G
Rheum nobile	1	T	A	G	A	A	A	G	T	G	T	G	C	G	G	A	A	C	A	T	A	A	G	C	C	A	A	G	A	A	*	C	*
	2	T	A	G	A	A	A	G	T	G	*	G	C	G	G	A	A	T	*	T	A	A	G	C	C	A	A	G	A	A	T	*	T
	3	T	A	G	A	A	A	G	T	G	*	G	C	G	G	A	A	T	*	T	A	A	G	C	C	A	A	G	A	A	T	*	T

2.3　粉末　淡黄棕色。草酸钙簇晶多，直径 20 ~ 35 μm，棱角大多短钝。导管木质化，多网纹，还有具缘纹孔及螺纹导管，直径 20 ~ 123 μm。木薄壁细胞排列整齐。淀粉粒小而多，单粒呈球形，直径 3 ~ 10 μm；复粒由 2 ~ 5 分粒组成，3 复粒最为常见。见图 3。



1. 未染色具缘纹孔导管 2. 未染色螺纹导管 3. 染色网纹导管 4. 草酸钙簇晶 5. 木栓细胞 6. 单粒淀粉粒 7-8. 复粒淀粉粒 9. 木薄壁细胞

图 3　高山大黄粉末特征图

2.4　*mat*K 序列特征分析　高山大黄 *mat*K 序列经排序后长度为 1 524 bp，通过将高山大黄与掌叶组和波叶组大黄的综合比对[10]，结果发现高山大黄与其他组大黄存在统计学意义，具体表现为：在基因上游 106、218、222、365、522、615、711、759、801、852 处存在十处碱基替换，依次为 T、A、G、A、T、G、G、A、A、G，而在 950 – 955 处存在 CAAGAA 6 个碱基插入。以上结果说明，高山大黄和其他组大黄在 *mat*K 基因序列上存在显著的差异，这些差异为进一步研究高山大黄 DNA 条形码奠定了基础。

3　讨论

高山大黄根横切面中皮层较宽，其间可见草酸钙簇晶散在，木质部宽广，占横切面 1/2 以上，木质部射线明显，导管木质化成束径向排列，近中心处单个散在；根茎横切面皮层较窄，韧皮部细胞小，排列紧密，射线明显，形成层整体成环状，髓部宽，无异形维管束存在；根及根茎粉末中草酸钙簇晶多，棱角大多短钝，导管木质化，多网纹，尚可见具缘纹孔及螺纹导管，木薄壁细胞排列整齐，淀粉粒小而多，单粒、复粒均有。以上特征可作为藏药高山大黄的鉴别特征。

对比同属药用植物大黄，主要可以通过观察根茎髓部是否有异型维管束，以及导管是否木质化来区分：大黄根茎髓部常有异型维管束散在，而高山大黄根茎髓部无异型维管束；大黄的导管非木质化，而高山大黄的导管木质化，间苯三酚 – 盐酸染色后呈粉红色。此外草酸钙簇晶大小亦可作为参考依据，大黄的草酸钙簇晶直径 20 ~ 160 μm，有的至 190 μm[11]，而高山大黄的草酸钙簇晶棱角大多短钝，直径 20 ~ 35 μm。

*mat*K 基因序列分析技术客观准确，通用性强，在序列校对完成后，对变异位点进行查找，以 950 – 955 处 CAAGAA6 个碱基插入作为高山大黄的主要特征，辅以基因上游 106、218、222、365、522、615、711、759、801、852 处存在的特异碱基 T、A、G、A、T、G、G、A、A、G，为高山大黄的分子鉴定研究提供了科学依据。

在本研究中，笔者发现高山大黄无论在显微鉴定还是分子鉴定层面都与同属药用植物表现出明显的差异。高山大黄类“锦毛植物”，根系粗壮，花序由苞片包裹[12]，有学者对其苞叶进行了研究，发现 CHS 重复基因在苞叶和基叶中表达分化，降低紫外线透射率[13]，光合作用相关的基因在苞叶中表达量显著下降，而另一些与植物胁迫响应相关的基因的表达量却显著升高，这些差异表达基因与其解剖特征和适应性功能密切相关[14]。研究还表明，高山大

黄具有较高的羟基自由基、DPPH · 清除率和良好的抗脂质过氧化能力，综合抗氧化能力接近 Vc[15]。笔者认为高山大黄导管的木质化，*mat*K 基因序列中 950 – 955 处 6 个碱基的插入，以及显著的抗氧化活性，亦与其长期生活在高原环境密不可分，其相关性还有待进一步研究。

参考文献

[1]国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 · 藏药卷[M]. 上海：上海科学技术出版社，1998：280.

[2]《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册)[M]. 2 版. 北京：人民卫生出版社，1996：742.

[3]江苏省植物研究所. 新华本草纲要[M]. 三册. 上海：上海科技出版社，1990：30.

[4]李安仁. 中国植物志[M]. 第 25 卷. 北京：科学出版社，1998：207.

[5]宋波，孙航. 神奇的塔黄[J]. 大自然，2013，1：36 – 39.

[6]Tuskasa Iwashina, Yuji Omori, Junichi Kitajima, et al. Flavonoids in translucent bracts of the Himalayan Rheum nobile (Polygonaceae) as ultraviolet shields[J]. J Plant Res, 2004, 117: 101 – 107.

[7]阿召. 浅论藏医“黄水证”[J]. 西藏中医药，2011，24(8)：63 – 64.

[8]Dongyuan Zhang, Bingbing Liu, Changming Zhao, et al. Ecological functions and differentially expressed transcripts of translucent bracts in an alpine ‘glasshouse’ plant Rheum nobile (Polygonaceae)[J]. Planta, 2010, 231: 1505 – 1511.

[9]雷忠萍，贺道华，曹翠兰. 中药显微鉴定常见的几种制片方法[J]. 安徽农业科学，2011，39(4)：1922 – 1924.

[10]张小芹，刘春生，闫兴丽，等. 多基原药材大黄叶绿体 *mat*K 基因序列分析及鉴定研究[J]. 药学学报，2013，48(11)：1722 – 1728.

[11]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 2010 年版. 北京：中国医药科技出版社，2010：22.

[12]杨扬，孙航. 高山和极地功能生态学研究进展[J]. 云南植物研究，2006，28(1)：43 – 53.

[13]大黄属 CHS 类基因的基因重复及适应性进化[D]. 兰州：兰州大学，2010.

[14]刘兵兵. 温室植物苞叶大黄和塔黄“苞叶”平行进化的分子证据[D]. 兰州：兰州大学，2012.

[15]杨丽花，兰小中，罗由萍，等. 22 中藏药材抗氧化活性研究[J]. 中药材，2012，35(12)：2007 – 2009.

(2014 – 05 – 12 收稿　责任编辑：王明)

世界中联第六届肝病国际学术大会暨换届大会(2015 · 南宁)征文通知

由世界中医药学会联合会肝病专业委员会主办，北京中医药大学东直门医院、广西中医药大学第一附属医院、广西中医药大学附属瑞康医院联合承办的世界中联第六届肝病国际学术大会暨换届大会(2015 · 南宁)拟于 2015 年 5 月 29 – 30 日在广西南宁召开，内容包括专题讲座和会议交流，现将会议征文的相关事项通知如下：

1、征文内容：①肝脏疾病的中医及中西医结合研究进展综述，国内外肝病诊疗标准、防治指南的最新动态及解读；②肝脏疾病研究方法学、思路和发展战略；③中医肝病标准、生存质量量表的研究现状及研究方法；④中医药、中西医结合防治病毒性肝炎、自身免疫性肝病、非酒精性脂肪性肝病、酒精性肝病、肝硬化及其并发症、肝癌前病变、肝癌等疾病的临床试验研究及经验总结；⑤中医药改善肝功能、抗病毒、抗肝纤维化、调节免疫、抗肝脏肿瘤的治疗经验、临床和基础研究；⑥非药物疗法(治疗手法、中医诊疗设备)、多种给药途径(栓剂、保留灌肠、皮肤给药、腧穴给药等)在治疗肝病中的应用研究；⑦肝脏疾病病生理机制、动物模型、实验方法学领域的新理论、新技术、新方法。

2、征文要求：①稿件要求在 5000 字以内，未经正式发表，并提供 500 字以内的中英文摘要，注明作者姓名、单位名称、地址及邮编或 E – mail 地址。稿件需 word 格式电子版。②以电子邮件形式发至：sjzlgbdh@126.com。

注：邮件主题注明“会议征文(作者姓名)”字样。

3、截稿日期：2015 年 4 月 30 日

4、联系人：甘大楠(13811370013)、李小科(13810622664)，传真：010 – 64010817 转甘大楠。

世界中医药学会联合会肝病专业委员会

2015 年 1 月