

虾脊兰属植物 DNA 条形码的确立

任阳阳¹ 张梦婷¹ 张嘉丽^{1,2} 樊佳佳¹ 张晓存¹ 王俊^{1,2} 刘霞^{1,2}

(1 武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 武汉, 430070; 2 中国中医科学院中药研究所, 北京, 100700)

摘要 目的: 结合 ITS2、psbA-trnH 和 matK 序列对兰科虾脊兰属植物进行物种区分鉴定研究, 并确立能准确鉴别虾脊兰属植物的序列或者序列组合。方法: 采用试剂盒法对已收集的 6 种虾脊兰属植物进行总 DNA 的提取, 通过扩增及测序, 运用 codencodeV4.2 软件对所得序列进行拼接与剪切, 使用 MEGA5.0 对 ITS2、psbA-trnH 和 matK 序列 3 种序列分别进行比对分析, 计算种内及种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离, 构建 Neighbor-joining (NJ) 系统聚类树。结果: 实验共得到序列 56 条 (包含 GenBank 序列 17 条), ITS2 序列和 matK 序列其种内最大遗传距离小于种间最小遗传距离, 而该属 psbA-trnH 序列种内遗传距离范围和种间遗传距离范围有重合。结论: ITS2 序列和 matK 序列可以作为虾脊兰属部分植物的鉴定序列, 而 psbA-trnH 序列不能用于虾脊兰属植物的鉴定。

关键词 DNA 条形码; ITS2; psbA-trnH; matK; 虾脊兰属

Establishment of DNA barcode for the calanthe

Ren Yangyang¹, Zhang Mengting¹, Zhang Jiali^{1,2}, Fan Jiajia¹, Zhang Xiaocun¹, Wang Jun^{1,2}, Liu Xia^{1,2}

(1 School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China;

2 China Academy of Chinese Medical Sciences, Institute of Chinese Materia Medica, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: Combined with the ITS2 and psbA-trnH and matK sequence to identify the medicinal plant-calathea, and establish genus sequences which can accurately identify the calathea. **Methods:** Extracting total DNA from 6 species of calathea, which had been collected by the kit method, Then the sequences were amplified and sequenced, Using codencodeV4.2 software to of splic and shear the sequences, Comparing of all sequences of 6 species of the genus using MEGA5.0 software, The variable sites, the Kimura 2-Paramter (K2P) genetic distances and the Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree were computed by MEGA5.0. **Results:** 56 sequences (including 17 GenBank sequences) were obtained f. By analysis, ITS2 sequence and matK sequence of the intraspecific genetic distance is less than the inter species genetic distance, the intraspecific genetic distance and inter species genetic distance of psbA-trnH sequence was coincident. **Conclusion:** ITS2 sequence and matK sequence can be used as the identification sequence of the partial plants of the calathea, however psbA-trnH sequence could not be used for the identification of the calathea.

Key Words DNA barcode; ITS2; psbA-trnH; matK; Calathea

中图分类号: R282.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.11.058

虾脊兰属 (*Calathea* R. Br.) 为兰科地生草本植物, 据《中国植物志》中记载, 虾脊兰属植物全属约 150 种, 分布于亚洲热带和亚热带地区、新几内亚岛、澳大利亚、热带非洲以及中美洲等地。虾脊兰属植物有“兰中西施”的美称, 可见其具有极高的观赏价值, 而该属植物不仅外表绚丽还颇有药用价值, 在民间多做药用, 据文献记载, 虾脊兰属植物具有活血止痛、清热解毒等功效^[1], 据报道, 虾脊兰的酶水解产物为 tryptanthrin, indirubin 和 isatin, 这些水解产物在原植物中也存在, 它们均具有抗白血病的作用。从虾脊兰乙醇提取物中可提取到 1 个具有抗菌活性的二氢菲; 同时, 在虾脊兰属植物中还发现吡啶昔以

及具有生理活性的生物碱, 这些生物碱的存在使虾脊兰在传统中药中有抗炎、抗菌、抗毒素等作用^[2]。然而虾脊兰属植物分类复杂, 因为不同种类植物特征性状不明显, 所以给虾脊兰属植物的鉴定带来很大的困难, 且兰科植物也是生物多样性保护的旗舰类群之一, 虾脊兰属作为兰科植物的一种, 在中国物种红色名录第一卷将其全部物种列为珍惜濒危物种^[3]。因此, 寻找一种快速有效鉴别虾脊兰属植物的方法对于虾脊兰属植物具有长远意义。迄今为止, 对于虾脊兰属植物的鉴定研究较少, 一般只有传统的鉴别方法, 而传统的鉴别对于虾脊兰属资源短缺现状来说是非常不利的。DNA 条形码技术为直

基金项目: 国家重大科技专项子课题“中药新药安全性检测技术与标准研究”——中药原料药混伪品分子基因鉴定技术与标准 (编号: 2014ZX09304-307-001-020)

作者简介: 任阳阳 (1992.09—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药资源鉴定

通信作者: 刘霞 (1973.02—), 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向: 中药资源与鉴定, E-mail: lrx1125@126.com

接利用 DNA 序列进行物种的鉴定,具有独一无二的可重复性,为药用植物鉴定带来了新的机遇。

DNA 条形码是指生物体内能够代表该物种的、标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段;DNA 条形码技术是 2003 年由加拿大动物学家 Hebert 首次提出,即利用基因组中一段公认的标准短序列鉴定物种的分子诊断新技术^[4-6]。其在生物分类和鉴定方面发展迅速,它能够不受本身性状和外界因素影响,从基因水平上提供一种鉴别依据。该技术不需要形态分类基础,具有操作简单、重复性高、样品用量少等特点,因此该技术在生物物种鉴定与分类、珍稀濒危和贵重生物资源保护、海关贸易监控、生物多样性保护和中药鉴定等领域得到广泛运用。尤其在中药鉴定中,陈士林课题组通过大量样本实验研究提出 ITS2 + psbA-trnH 为主体的植物类 DNA 条形码鉴定体系^[7-10],该体系具有良好的准确性与稳定性,但对于少数中药 ITS2 + psbA-trnH 序列还不足以对其进行准确的鉴定,因此需要结合其他片段来进行鉴定。matK 序列是编码成熟酶 K 蛋白的基因,是国际生物条形码联盟(CBOL)推荐的植物 DNA 条形码核心序列^[11-13]。我们利用 3 种不同的引物 ITS2、psbA-trnH、matK 对 6 种虾脊兰属的植物进行 DNA 提取、扩增、测序通过比较其种间和种内遗传距离从而确立能鉴别虾脊兰属植物的序列或者序列组合,为虾脊兰属植物的鉴别提供准确可靠的生物学方法,保障其用药安全,同时也为保护虾脊兰属濒危药用植物资源提供了新的鉴定技术。

1 材料与方法

1.1 材料 6 种虾脊兰属植物:棒距虾脊兰(*Calanthe clavata*)、肾唇虾脊兰(*Calanthe brevicornu*)、虾脊兰(*Calanthe discolor*)、剑叶虾脊兰(*Calanthe davidii*)、钩距虾脊兰(*Calanthe graciliflora*)、三褶虾脊兰(*Calanthe triplicata*)分别来自利川、广西、广州等不同地区,共计 25 份样品,材料信息详表见表 1。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 的提取 将实验样品用 75% 乙醇擦拭表面后,称量每个样品约 20 mg,加入钢珠,研磨粉碎。用 DNA 提取研磨仪(Retsch MM400, Germany)研磨 2 min 后,利用植物 DNA 提取试剂盒(Tiangen Biotech Co., China)提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增及测序 PCR 扩增引物见表 2。matK 分析序列全部从 GenBank 上下载,其详细信息见表 3。PCR 反应体系为 25,体系内包含 2 × Tag PCR Mix 12.5 (Tiangen Biotech 公司, China),引物

(2.5/L)各 1.0 (TaKa Ra Biotech 公司, China),模板 DNA2,双蒸水 8.5。PCR 扩增程序:95 ℃ 4 min,(94 ℃ 30 s,55 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s)循环 35 次,72 ℃ 延伸 10 min。将扩增后的样品使用 ABI3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co, USA)进行双向测序。

表 1 样品信息表

样品名	拉丁名	样品编号	样品来源
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	LRGZ111-1	广州
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	LRGZ111-2	广州
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	LRGZ111-3	广州
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	LRGZ111-4	广州
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	LRGZ111-5	广州
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	LRGZ111-6	广州
三褶虾脊兰	<i>Calanthe triplicata</i>	GX1005-1	广西
三褶虾脊兰	<i>Calanthe triplicata</i>	GX1005-2	广西
三褶虾脊兰	<i>Calanthe triplicata</i>	GX1005-3	广西
三褶虾脊兰	<i>Calanthe triplicata</i>	GX1005-4	广西
肾唇虾脊兰	<i>Calanthe brevicornu</i>	LC922-1	利川
肾唇虾脊兰	<i>Calanthe brevicornu</i>	LC922-2	利川
肾唇虾脊兰	<i>Calanthe brevicornu</i>	LC922-3	利川
肾唇虾脊兰	<i>Calanthe brevicornu</i>	LC922-4	利川
肾唇虾脊兰	<i>Calanthe brevicornu</i>	LC922-5	利川
肾唇虾脊兰	<i>Calanthe brevicornu</i>	LC922-6	利川
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	SZ574-1	深圳
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	SZ574-2	深圳
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	SZ574-3	深圳
钩距虾脊兰	<i>Calanthe graciliflora</i>	GZ021-1	广州
钩距虾脊兰	<i>Calanthe graciliflora</i>	GZ021-2	广州
钩距虾脊兰	<i>Calanthe graciliflora</i>	GZ021-3	广州
剑叶虾脊兰	<i>Calanthe davidii</i>	LC1025-1	利川
剑叶虾脊兰	<i>Calanthe davidii</i>	LC1025-2	利川
剑叶虾脊兰	<i>Calanthe davidii</i>	LC1025-3	利川

表 2 PCR 扩增引物

基因	引物	5'-3'
ITS2	P3	YGACTCTCGGCAACGGATA
	E4	RGTTTCTTTCTCTCGCTTA
psbA-trnH	rc-PA	GAGCATTACGTTTCATGCATAAC
	rc-TH	GGATTGTGAATCCACCATGCGCG

1.2.3 数据处理 应用 CodonCode Aligner V4.2 (CodonCode 公司, USA)对测序峰图进行校对拼接,除去载体及引物区获得相应序列。利用 MEGA5.0 对所有序列进行分析对比,并基于 K2P 模型对虾脊兰属植物进行种内和种间遗传距离分析,用邻接 (NJ)法构建系统聚类树。

2 结果与分析

2.1 虾脊兰属植物不同序列种内变异分析

2.1.1 虾脊兰属植物 ITS2 序列种内变异分析 棒距虾脊兰共 6 条序列,长度 263 bp。钩距虾脊兰共 3 条序列,长度为 258 bp,无变异位点。剑叶虾脊兰共

3 条序列,长度 265 bp,无变异位点。肾唇虾脊兰共 6 条序列,长度为 258 bp,无变异位点。

表 3 GenBank 所下载序列

样品名	拉丁名	CenBank 登录号
三褶虾脊兰	<i>Calanthe triplicata</i>	AY882614
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	KC704336
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	KC704337
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	KF262178
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	KC704600
虾脊兰	<i>Calanthe discolor</i>	KF262056
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	KF673795
棒距虾脊兰	<i>Calanthe clavata</i>	KF852694
剑叶虾脊兰	<i>Calanthe davidii</i>	KF673796
剑叶虾脊兰	<i>Calanthe davidii</i>	KF673797
剑叶虾脊兰	<i>Calanthe davidii</i>	KF852695
钩距虾脊兰	<i>Calanthe graciliflora</i>	KF673800
钩距虾脊兰	<i>Calanthe graciliflora</i>	KF673801
钩距虾脊兰	<i>Calanthe graciliflora</i>	KF852698
三褶虾脊兰	<i>Calanthe triplicata</i>	KF673822
三褶虾脊兰	<i>Calanthe triplicata</i>	KF852713
肾唇虾脊兰	<i>Calanthe brevicornu</i>	KF852693

2.1.2 虾脊兰属植物 psbA-trnH 序列种内变异分析
棒距虾脊兰、钩距虾脊兰、剑叶虾脊兰、肾唇虾脊兰、三褶虾脊兰、虾脊兰 psbA 序列长度、种内变异位点数等信息见表 5。棒距虾脊兰共 5 条序列,长度为 746 bp,以 LRGZ111-1 为主导单倍型,在 3 位点存在 A-C 变异。钩距虾脊兰共 3 条序列,长度为 780 bp,以 GZ032-1 为主导单倍型序列,存在 20 个种内变异位点。剑叶虾脊兰共 3 条序列,长度为 683 bp,以 LC1025-1 为主导单倍型序列,存在 12 个种内变异位点。肾唇虾脊兰共 6 条序列,长度为 858 bp,以 LC922-1 为主导单倍型序列,存在 58 个种内变异位点。三褶虾脊兰共 4 条序列,长度为 598 bp,以 GX1005-1 为主导单倍型序列,在 596 位存在 A-C 变异、597 位存在 C-T 变异。虾脊兰有来自 GenBank 的 3 条序列(序列号见表 3),长度为 757 bp,以 KC704336 为主导单倍型序列,存在 33 个种内变异位点。

表 5 虾脊兰属不同基因序列种内和种间 K2P 遗传距离汇总

遗传距离	ITS2	psbA-trnH	matk
棒距虾脊兰种内遗传距离	0	0.000 ~ 0.003 (0.0009 *)	0.004
钩距虾脊兰种内遗传距离	0	0.000 ~ 0.029 (0.019 *)	0.000 ~ 0.001 (0.0007 *)
剑叶虾脊兰种内遗传距离	0	0.009 ~ 0.015 (0.012 *)	0.002 ~ 0.004 (0.003 *)
肾唇虾脊兰种内遗传距离	0	0.010 ~ 0.055 (0.032 *)	
三褶虾脊兰种内遗传距离		0.000 ~ 0.003 (0.002 *)	0
虾脊兰种内遗传距离			0
虾脊兰属种间遗传距离	0.032 ~ 0.166 (0.0830 *)	0.002 ~ 0.148 (0.048 *)	0.009 ~ 0.430 (0.150 *)

注: * :平均值

2.1.3 虾脊兰属植物 matK 序列种内变异分析
此处所用的 matK 序列全部从 GenBank 上下载得到(序列号见表 3),棒距虾脊兰共 2 条序列,长度为 1 662 bp,以 KF67379 为主导单倍型,存在 6 个种内变异位点。钩距虾脊兰共 3 条序列,长度为 1 690 bp,以 KF673800 为主导单倍型序列,在 481 位点存在 A-G 变异。剑叶虾脊兰共 3 条序列,长度为 1 692 bp,以 KF673796 为主导单倍型序列,存在 8 个种内变异位点。三褶虾脊兰共 3 条序列,长度为 1 690 bp,以 KF673822 为主导单倍型序列,存在 101 个种内变异位点。虾脊兰共 2 条序列,长度为 666 bp,无变异位点。

2.2 虾脊兰属植物不同序列种间变异分析
棒距虾脊兰、钩距虾脊兰、剑叶虾脊兰、肾唇虾脊兰、三褶虾脊兰、虾脊兰 3 种不同序列长度范围、种间变异位点数等信息见表 4。

表 4 虾脊兰属种间不同序列特征

序列特征	ITS2	psbA-trnH	matk
总样品数	19	24	14
基因型	5	21	13
序列长度/bp	258 ~ 265	598 ~ 858	666 ~ 1764
变异位点数	43	147	352

2.3 虾脊兰属植物不同序列种内、种间遗传距离分析
基于 K2P 遗传距离,对虾脊兰属 3 条不同的 DNA 条形码候选序列的种内变异和种间变异结果进行分析。见表 5。虾脊兰属 ITS2 序列种间变异(0.032 ~ 0.166)大于其种内遗传距离(0),但是钩距虾脊兰和肾唇虾脊兰其种间遗传距离过小,表示此 2 种植物利用 ITS2 序列不能分开,但是通过分析其 matK 种间距离结果发现通过 matK 序列是可以将其分开。虾脊兰属 matK 序列种间变异(0.009 ~ 0.430)大于其种内遗传距离(0 ~ 0.004),但是虾脊兰和棒距虾脊兰以及虾脊兰和剑叶虾脊兰遗传距离过小表示 2 种植物利用 matK 序列不能分开,但是通过分析其 ITS2 种间距离结果发现,通过 ITS2 序列

是可以将其分开。因此,综上所述,ITS2 序列和 matK 序列可以作为鉴别虾脊兰属植物分子鉴定的序列组合。虾脊兰属 psbA-trnH 序列种间遗传距离(0.002~0.148)和种内遗传距离(0~0.055)有重叠区,所以 psbA-trnH 序列不适用于虾脊兰属植物的鉴定。

2.4 虾脊兰属植物不同序列的 NJ 树的建立

2.4.1 本研究基于 ITS2 序列构建虾脊兰属各个种间的 NJ 树(图 1)结果表明,除了钩距虾脊兰和肾唇虾脊兰被分在一枝,其他各个种都能通过 ITS2 序列被很好的区分开来。

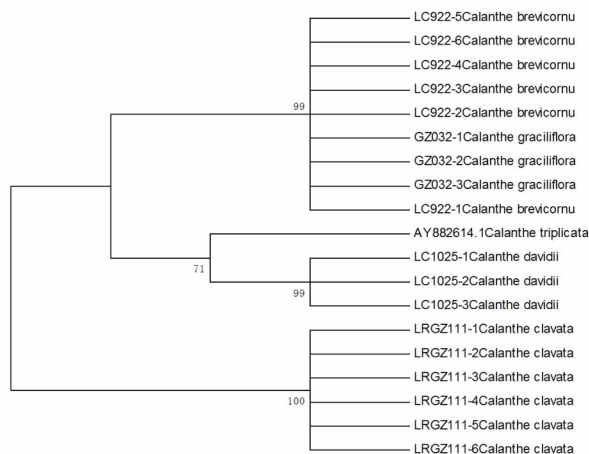


图 1 基于 ITS2 序列构建虾脊兰属各个种间的 NJ 树

注:Bootstrap1000 次重复,支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。

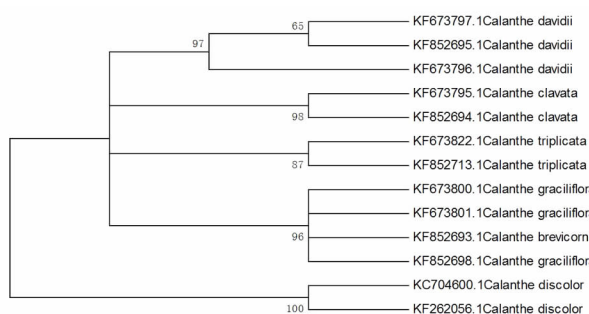


图 2 基于 matK 序列构建虾脊兰属各个种间的 NJ 树

注:Bootstrap1000 次重复,支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。

2.4.2 本研究基于 matK 序列构建虾脊兰属各个种间的 NJ 树(图 2)结果表明除了钩距虾脊兰和肾唇虾脊兰外其他物种都能通过 matK 序列被很好的区分开。但是在前面种间遗传距离的分析中得知,钩距虾脊兰和肾唇虾脊兰种间遗传距离是大于其种内遗传距离的,而在 NJ 树上其却合为一枝,但是肾唇虾脊兰的 matK 序列网上只有一条,所以在此并不具有说服力,综上所述可以得出,将 matK 序列作为 ITS2

序列的互补序列用来鉴别虾脊兰属植物,其鉴别效率具有很高参考价值。

2.4.3 本研究基于 psbA-trnH 序列构建虾脊兰属各个种间的 NJ 树(图 3)结果表明,大多数虾脊兰属植物的 psbA-trnH NJ 树都汇到一起,其分离效率很差,所以 psbA-trnH 序列不适用于虾脊兰属植物的鉴定。

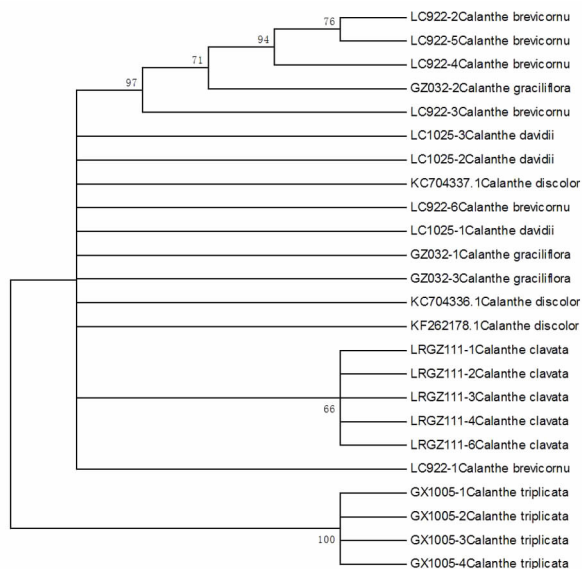


图 3 基于 psbA-trnH 序列构建虾脊兰属各个种间的 NJ 树

注:Bootstrap1000 次重复,支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。

3 结论

近年来,DNA 条形码技术在生物分类和鉴定方面发展迅速,它能够不受本身性状和外界因素影响,从基因水平上提供一种鉴别依据。我们在本文是通过对比分析,从而确定能鉴定虾脊兰属植物的序列或序列组合,为保证其用药安全以及保护濒危物种提供一种快速简便的鉴定方法。

本研究收集了来自广州、广西、利川等地的 6 个虾脊兰属样品,选用 ITS2 序列、psbA-trnH 序列和 matK 序列,对其变异位点进行分析,应用基于 K2P 计算的遗传距离分别对 3 种序列的种内和种间距离进行比较分析结果表明,ITS2 序列和 matK 序列其种内遗传距离小于种间遗传距离,可以将其作为基因组序列用于虾脊兰属植物的鉴定,而 psbA-trnH 序列种内遗传距离范围和种间遗传距离范围有重合,所以 psbA-trnH 序列不能用作虾脊兰属植物的鉴定。之后利用 3 种片段分别构建 NJ 树可以看出,ITS2 和 matK 序列除了钩距虾脊兰和肾唇虾脊兰聚为一枝外,其他各个物种都能很明显的区别开来,表

现出很好的单系性,而肾唇虾脊兰的 matK 序列只有网上一条,在此并不能否定 matK 序列对虾脊兰属植物的鉴定效率,所以利用 ITS2 + matK 基因组序列能够对虾脊兰属植物进行快速鉴别。而 psbA-trnH 序列 NJ 树的表明,虾脊兰属大部分植物不能被区分,其鉴定准确率太低,不适于虾脊兰属植物的鉴定。

参考文献

- [1] 龙波,龙春林,李苏梅. 兰科药用植物[A]. 亚太地区民族植物学论坛,2006.
- [2] 苏文君,龙波,刘飞虎. 虾脊兰属植物研究现状[J]. 北方园艺,2012(16):190-193.
- [3] 黄卫昌,周翔宇,倪子轶,等. 基于标本和分布信息评估中国虾脊兰属植物的濒危状况[J]. 生物多样性,2015,23(4):493-498.
- [4] 程新玮,赵焕新,宁康,等. DNA 条形码技术在中药质量评价中的研究进展[J]. 食品与药品,2013,15(14):295-299.
- [5] Coghlan M L,Haile J,Houston J,et al. Deep sequencing of plant and animal DNA contained within Traditional Chinese Medicines reveals legality issues and health safety concerns[J]. PLoS Genet,2012,8(4):436-446.
- [6] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京:科学技术出版社,2015.
- [7] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[S]. 中国中药杂志,2013,38(2):141-147.
- [8] Wong KL,But PP,Shaw PC. Evaluation of seven DNA barcodes for differentiating closely related medicinal Gentiana species and their adulterants[J]. Chin Med,2013,8(1):16.
- [9] 胡伟毅,邵套喜. matK 序列作为 DNA 条形码在苍耳属中的应用[J]. 杂草科学,2013,31(4):13-16.
- [10] 姬生国,潘胜利,王峻,等. 基于叶绿体 matK 基因序列探讨 10 种石杉科石杉属植物的系统关系及分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2007,32(19):1971-1974.
- [11] 滕艳芬,吴晓俊,徐红,等. 石斛及其常见混淆品的 matK 基因序列比较[J]. 中国药科大学学报,2002,33(4):280-283.
- [12] 王果平,樊丛照,朱军,等. 基于形态特征和 DNA 条形码技术的维吾尔药材沙枣基原鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2216-2221.
- [13] 余亚东,石林春,马晓冲,等. 白术与苍术及其混伪品 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2194-2198.
- [14] 石林春,陈俊,向丽,等. 基于 ITS2 条形码的中药材天南星及其混伪品 DNA 分子鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2176-2179.
- [15] 吴劲松,张宇思,刘薇,等. 白及属药用植物 DNA 条形码的确立及其应用[J]. 药学报,2014,49(10):1466-1474.
- [16] 马孝熙,任伟超,向丽,等. 蒲黄、松花粉等花粉类药材及其混伪品的 DNA 条形码鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2189-2193.
- [17] 于俊林,赵莎,任明波,等. 基于 ITS2 条形码鉴定柴胡与大叶柴胡[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2160-2163.
- [18] 张雅琴,石钺,宋明,等. 蕨类药材石韦及其混伪品的 psbA-trnH 序列鉴定[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2222-2226.
- [19] SUN ZY,GAO T,YAO H,et al. Identification of *Lonicera japonica* and its related species using the DNA barcoding method[J]. Planta Med,2011,77:301-306.
- [20] 宋明,张雅琴,林韵涵,等. 基于 ITS2 和 psbA-trnH 序列对细小种子类药材车前子的鉴定比较[J]. 中国中药杂志,2014,39(12):2227-2232.
- (2016-03-31 收稿 责任编辑:洪志强)
- (上接第 2424 页)
- [5] 杜宇琼,车念聪,赵晖,等. 黄芪对肝纤维化大鼠肝组织 TIMP-1 及 MMP-1 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2013,36(11):775-778.
- [6] 杜宇琼,赵晖,张秋云,等. 水红花子对免疫肝纤维化大鼠肝功能及血清肝纤维化标志物的影响[J]. 中国中医急症,2011,20(9):1433-1434.
- [7] 张晨,黄进,詹菲,等. 黄芪多糖对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化的保护作用[J]. 世界中医药,2015,10(6):887-890.
- [8] 刘畅,刘平,慕永平,等. 黄芪汤治疗慢性肝病研究进展[J]. 世界中医药,2015,10(2):157-161.
- [9] 包永睿,王帅,孟宪生,等. 水红花子黄酮类成分对入肝癌细胞株 SMMC-7721 的影响[J]. 中药材,2013,36(2):255-259.
- [10] 盛华刚. 水红花子的化学成分和药理作用研究进展[J]. 化工时刊,2013,27(2):44-46.
- [11] 秦佩,雷志明,吴双,等. 槲皮素对 Con A 诱导自身免疫性肝损伤作用[J]. 中国公共卫生,2015,31(6):757-759.
- [12] 翟延君,佟苗苗,程飞,等. 花旗松素和 3,3'-二甲氧基鞣花酸-4-O-β-D-吡喃葡萄糖苷对肿瘤细胞的增殖抑制作用[J]. 中成药,2012,34(2):217-220.
- [13] 沈钦海,秦召敏,刘丽,等. 槲皮素对肝细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 天津医药,2015,43(10):1100-1103.
- [14] 刘英娟,申玉金,杜金梁,等. 槲皮素对四氯化碳致鲤肝细胞损伤的保护作用[J]. 农业生物技术学报,2015,23(3):369-379.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 一部. 北京:中国医药科技出版社,2015:83.
- (2016-05-05 收稿 责任编辑:王明)