

· 基础研究 ·

基于 ITS2 序列的竹叶花椒及其近缘种药材鉴别[△]齐景梁¹, 高必兴^{1,2}, 苟琰^{1,2}, 耿昭¹, 卿艳¹, 周娟¹, 姜卫东^{1*}

1. 四川省药品检验研究院/国家药品监督管理局 中成药质量评价重点实验室, 四川 成都 611731;

2. 成都中医药大学, 四川 成都 611137

[摘要] 目的: 通过分析竹叶花椒及其近缘种药材的核糖体 DNA 内转录间隔区 2 (ITS2) 条形码序列, 探讨 DNA 条形码技术鉴别竹叶花椒及其近缘种药材的可行性。方法: 对样品进行 DNA 提取、扩增、测序, 并从 GenBank 数据库下载 ITS2 序列, 共获得竹叶花椒及其近缘种药材 ITS2 序列 43 条, 基于 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 法、邻接法 (NJ)、Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离和 ITS2 序列二级结构进行鉴定分析。结果: BLAST 结果与性状鉴定结果一致; 竹叶花椒种内平均 K2P 遗传距离小于其与花椒、青花椒、野花椒的种间平均 K2P 遗传距离; NJ 系统聚类树和 ITS2 二级结构可直观地区分竹叶花椒及其近缘种。结论: 应用 ITS2 条形码可以有效地鉴别竹叶花椒及其近缘种药材。

[关键词] 竹叶花椒; 内转录间隔区 2; DNA 条形码; 中药鉴定

[中图分类号] R282.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2021)05-0786-07

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20200520006

Identification of *Zanthoxylum armatum* and Its Closely Related Species Based on ITS2 SequenceQI Jing-liang¹, GAO Bi-xing^{1,2}, GOU Yan^{1,2}, GENG Zhao¹, QING Yan¹, ZHOU Juan¹, JIANG Wei-dong^{1*}

1. Sichuan Institute for Drug Control, Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicines,

NMPA, Chengdu 611731, China;

2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

[Abstract] **Objective:** To explore the feasibility of using DNA barcoding technology to identify *Zanthoxylum armatum* and its closely related species, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) barcoding sequences were analyzed. **Methods:** By DNA extraction, amplification and sequencing of experimental samples, and downloading the ITS2 sequences from GenBank, a total of 43 ITS2 sequences of *Z. armatum* and its closely related species were obtained. Identification was conducted based on BLAST method, Neighbor-Joining (NJ) phylogenetic tree method, Kimura 2-parameter (K2P) genetic distance method, and secondary structure of ITS2 sequence. **Results:** The results of BLAST were consistent with those of morphological identification. The average intraspecific K2P genetic distance of *Z. armatum* was smaller than the average interspecific K2P genetic distance between it and *Z. bungeanum*, and *Z. schinifolium*, and *Z. simulans*. Both NJ phylogenetic tree and ITS2 secondary structure can distinguish *Z. armatum* and its closely related species intuitively. **Conclusion:** The ITS2 barcoding method can be used to identify *Z. armatum* and its closely related species.

[Keywords] *Zanthoxylum armatum* DC.; ITS2; DNA barcoding; authentication of Chinese medicine

除历版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)记载的花椒品种外,芸香科花椒属植物竹叶花椒 *Zanthoxylum armatum* DC. 是记载标准最多的花椒属药材,药用部位多为果皮,具有温中止痛、杀虫止痒之功效^[14]。其主要分布于我国西南、

华南、华东和华中地区^[5],川渝地区多有栽培。竹叶花椒具有较长的药用历史,《证类本草》《本草纲目》《植物名实图考》等均有记载^[6-8]。竹叶花椒又被称作“青花椒”“藤椒”,常与《中国药典》2020年版收载的花椒来源之一青花椒 *Z. schinifolium*

[△] [基金项目] 四川省中医药管理局科学技术研究专项(2018YY002)

* [通信作者] 姜卫东,主任药师,研究方向:中药质量控制与评价;Tel:(028)87877181,E-mail:JWD-322@163.com

Sieb. et Zucc. 相混淆(花椒的另一来源为花椒 *Z. bungeanum* Maxim.)^[9-10]。《贵州省中药材、民族药材质量标准》2003 年版野花椒(山花椒)品种项下除竹叶花椒外还收录了野花椒 *Z. simulans* Hance^[1]。以上 3 种植物均为花椒属植物,其果皮与竹叶花椒相近,不易区分。

作为中药分子鉴定学上的创新,DNA 条形码技术可为动植物来源中药材的鉴定提供快捷方法^[11]。自 Hebert 等^[12]于 2003 年首次正式提出 DNA 条形码的概念以来,DNA 条形码技术发展迅速。《中国药典》2020 年版收录了中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则^[13]。陈士林团队^[14-15]通过比较研究多个候选 DNA 条形码序列,提出将内转录间隔区 2 (ITS2)作为药用植物鉴定的标准 DNA 条形码。目前,关于竹叶花椒的研究多集中于化学成分、药理作用等方面,而分子生物学方面的研究多以花椒为重点。本研究选取 ITS2 序列,对竹叶花椒及其近缘种进行鉴别,从分子生物学角度区分竹叶花椒及其近缘种,为合理开发竹叶花椒提供参考。

1 材料

C1000 型聚合酶链式反应(PCR)仪、PowerPac Basic 型电泳仪、Gel Doc XR⁺ 型全自动凝胶成像系统(Bio-Rad 公司);XP205 型电子分析天平(Mettler Toledo 公司);MM400 型球磨机(Retsch 公司);MiniSpin 型高速离心机(Eppendorf 公司);Milli-Q Advantage A10 型纯水仪(Millipore 公司);植物基因组 DNA 提取试剂盒、2 × M5 HiPer plus Taq HiFi PCR Mix、Gene Red 核酸染料(天根生化科技有限公司);Taq 酶 PCR 扩增试剂盒(北京聚合美生物科技有限公司);琼脂糖(Biowest 公司);ITS2 引物(ITS2F:5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3';ITS3R:5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3')由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

从四川、重庆、宁夏、安徽、辽宁等地收集了 13 批竹叶花椒、4 批花椒、4 批青花椒药材,均经四川省药品检验研究院黎跃成主任中药师进行性状鉴定,分别为竹叶花椒 *Zanthoxylum armatum* DC.、花椒 *Z. bungeanum* Maxim.、青花椒 *Z. schinifolium* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果皮,标本保存于四川省药品检验研究院标本馆。另从 GenBank 数据库下载 22 条 ITS2 序列(5 条竹叶花椒、7 条花椒、5 条青花椒、5 条野花椒)用于比较分析。样品信息见表 1,GenBank 下

载序列信息见表 2。

表 1 花椒属药材样品信息

名称	拉丁名	批号	产地
竹叶花椒	<i>Z. armatum</i>	HY1808ZA01	四川省洪雅县洪川镇
		HY1808ZA02	四川省洪雅县洪川镇
		JJ1809ZA03	重庆市江津区永兴镇
		ZG1809ZA04	四川省富顺县怀德镇
		ZG1809ZA05	四川省富顺县怀德镇
		JJ1809ZA06	重庆市江津区石门镇
		YY1810ZA07	四川省盐源县平川镇
		YY1810ZA08	四川省盐源县平川镇
		YY1810ZA09	四川省盐源县平川镇
		JY1810ZA10	四川省金阳县木府乡
		ST1810ZA11	四川省三台县芦溪镇
		ST1810ZA12	四川省三台县芦溪镇
		ST1810ZA13	四川省三台县潼川镇
花椒	<i>Z. bungeanum</i>	NX1803ZB01	宁夏回族自治区隆德县
		MX1805ZB02	四川省茂县
		GY1903ZB03	四川省广元市
		HA1904ZB04	四川省汉源县
青花椒	<i>Z. schinifolium</i>	BZ1804ZS01	安徽省亳州市
		WD1707ZS02	辽宁省瓦房店市
		WD1807ZS03	辽宁省瓦房店市
		DL1809ZS04	辽宁省大连市

表 2 花椒属药材样品 GenBank 下载序列信息

名称	拉丁名	GenBank 登录号
竹叶花椒	<i>Z. armatum</i>	KP642536、MF039508、MF039502、KP642541、JX393936
花椒	<i>Z. bungeanum</i>	KC898633、KP642606、MF039523、KP642552、KC898626、MF039492、MF096856
青花椒	<i>Z. schinifolium</i>	KP642635、MF096863、MF096866、KP642630、KP642624
野花椒	<i>Z. simulans</i>	MF039525、MF039526、MF039527、MF039528、MF039529

2 方法

2.1 提取 DNA

依次用 75% 乙醇 1 mL、灭菌超纯水 1 mL 清洗样品表面,晾干水分,用球磨机研磨成粉末;取粉末约 30 mg,按照 DNA 提取试剂盒说明书进行操作,提取 DNA, -20 ℃ 保存备用。

2.2 PCR 扩增及测序

扩增所用引物为通用引物^[16],扩增条件及参数参照文献[16-17]方法及扩增试剂盒的说明。PCR 反应体系为 25 μL,包含 2 × Taq MasterMix 缓冲液 12.5 μL、上下游引物各 0.6 μL、DNA 模板 1 μL,

加灭菌超纯水至 25 μL 。阴性对照为无模板 DNA 的反应体系。以 10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 (离心半径为 3 cm) 5 s 后, 置于 PCR 仪中。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测以确定目的条带片段大小, 扩增产物送 Thermo Fisher 公司进行测序。

2.3 数据分析

应用 Codon Code Aligner V7.0.1 对测序获得的数据进行校对拼接, 去除引物及低质量区, 基于隐马尔科夫模型的 Hmmer 注释方法去除 5.8S 和 28S 区段, 即可获得 ITS2 序列信息^[18]。

分别进入美国国家生物技术信息中心 (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和中药材 DNA 条形码鉴定系统 (<http://barcode.ndctcm.org/china/>), 应用相似性搜索法对实验样品的不同单倍型序列进行 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 鉴定分析。

采用 MEGA 7.0 软件对 ITS2 序列进行比对, 计算种内、种间 Kimura 2-parameter (K2P) 遗传距离, 利用邻接法 (NJ) 构建系统聚类树, 同时以 Bootstrap 自展支持率 (1000 次) 重复检验各分支的支持率^[19-20]。

登录 Internal Transcribed Spacer 2 Ribosomal RNA Database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>), 对不同物种的主导单倍型进行 ITS2 二级结构的预测^[21-23], 并采用 Pseudoviewer (http://pseudoviewer.inha.ac.kr/WSPV_quickSender.asp?) 查看预测所得二级结构。

3 结果与分析

3.1 ITS2 序列分析

不同来源的 18 条竹叶花椒 ITS2 序列比对后长度为 227 ~ 228 bp, 鸟嘌呤和胞嘧啶 (GC) 占比为 70.0% ~ 70.9%, 种内变异位点 6 个, 分别为 68 位点的 C-T 变异、96 位点的 C-T 变异、125 位点的 A-T 变异、167 位点的 C-T 变异、180 位点的 C-T 变异、181 位点的 C-T 变异, 形成 5 个单倍型。主导单倍型 A1 有 9 条序列, 其中实验样品单倍型为 A1 ~ A3。不同来源的 11 条花椒 ITS2 序列比对后长度为 223 ~ 224 bp, GC 占比为 66.1% ~ 67.3%, 种内变异位点 10 个, 形成 5 个单倍型, 主导单倍型 B1 有 7 条序列, 其中实验样品单倍型为 B1、B2、B4、B5。不同

来源的 9 条青花花椒 ITS2 序列比对后长度为 224 bp, GC 占比为 71.0%, 无种内变异位点, 全为单倍型 C1。5 条野花椒 ITS2 序列比对后长度为 224 bp, GC 占比为 68.8%, 无种内变异位点, 全为单倍型 D1。竹叶花椒与其近缘种间的变异位点见图 1, 种间变异程度较为丰富。

		11111111	11111111	11222222
1222234468	9901225556	6667778889	9900011112	
5568963584	6754051340	3672460130	1703504761	
ACTCGCTGCC	CTCGAGTCT	TCCCTCCGT	GACTAACC	
#HY1808ZA01-Zanthoxylum_armatum				
#HY1808ZA02-Zanthoxylum_armatum				
#JJ1809ZA06-Zanthoxylum_armatum				
#ZG1809ZA04-Zanthoxylum_armatum				
#ZG1809ZA05-Zanthoxylum_armatum				
#ST1810ZA11-Zanthoxylum_armatum				
#ST1810ZA12-Zanthoxylum_armatum				
#ST1810ZA13-Zanthoxylum_armatum				
#KP642536-Zanthoxylum_armatum				
#JJ1809ZA03-Zanthoxylum_armatum				
#JY1810ZA10-Zanthoxylum_armatum				
#KP642531-Zanthoxylum_armatum				
#MF039508-Zanthoxylum_armatum				
#YY1810ZA07-Zanthoxylum_armatum				
#YY1810ZA08-Zanthoxylum_armatum				
#YY1810ZA09-Zanthoxylum_armatum				
#MF039502-Zanthoxylum_armatum				
#KP642541-Zanthoxylum_armatum				
#HA1904ZB04-Zanthoxylum_bungeanum				
#MF039492-Zanthoxylum_bungeanum				
#MF039523-Zanthoxylum_bungeanum				
#KP642606-Zanthoxylum_bungeanum				
#KC898633-Zanthoxylum_bungeanum				
#KP642552-Zanthoxylum_bungeanum				
#KC898626-Zanthoxylum_bungeanum				
#GY1903ZB03-Zanthoxylum_bungeanum				
#MF098556-Zanthoxylum_bungeanum				
#WX1805ZB02-Zanthoxylum_bungeanum				
#NX1803ZB01-Zanthoxylum_bungeanum				
#KP642630-Zanthoxylum_schinifolium				
#KP642624-Zanthoxylum_schinifolium				
#KP642635-Zanthoxylum_schinifolium				
#MF098686-Zanthoxylum_schinifolium				
#MF098683-Zanthoxylum_schinifolium				
#BZ1804ZS01-Zanthoxylum_schinifolium				
#DL1809ZS04-Zanthoxylum_schinifolium				
#WD1707ZS02-Zanthoxylum_schinifolium				
#WD1807ZS03-Zanthoxylum_schinifolium				
#MF039526-Zanthoxylum_simulans				
#MF039525-Zanthoxylum_simulans				
#MF039527-Zanthoxylum_simulans				
#MF039529-Zanthoxylum_simulans				
#MF039528-Zanthoxylum_simulans				

图 1 竹叶花椒及其近缘种 ITS2 序列的种内、种间变异位点

3.2 相似性搜索法分析

基于 NCBI 和中药材 DNA 条形码鉴定系统的 BLAST 鉴定结果见表 3。BLAST 结果与性状鉴定结果一致。

3.3 遗传距离分析

竹叶花椒种内平均 K2P 遗传距离为 0.005, 小于其与花椒 (0.042)、青花花椒 (0.113)、野花椒 (0.024) 的种间平均 K2P 遗传距离。竹叶花椒种内最大 K2P 遗传距离 (0.018) 小于其与花椒的种间最小 K2P 遗传距离 (0.033); 小于其与青花花椒的种间最小 K2P 遗传距离 (0.108); 接近其与野花椒的种间最小 K2P 遗传距离 (0.018), 见表 4。

3.4 NJ 系统聚类树分析

从 NJ 系统聚类树可以看出, 各物种均能以大于 50% 的自展支持率各自聚为 1 支, 表现出了良好的单系性。其中青花花椒单独聚为 1 支, 与竹叶花椒、野花椒、花椒相区分, 见图 2。

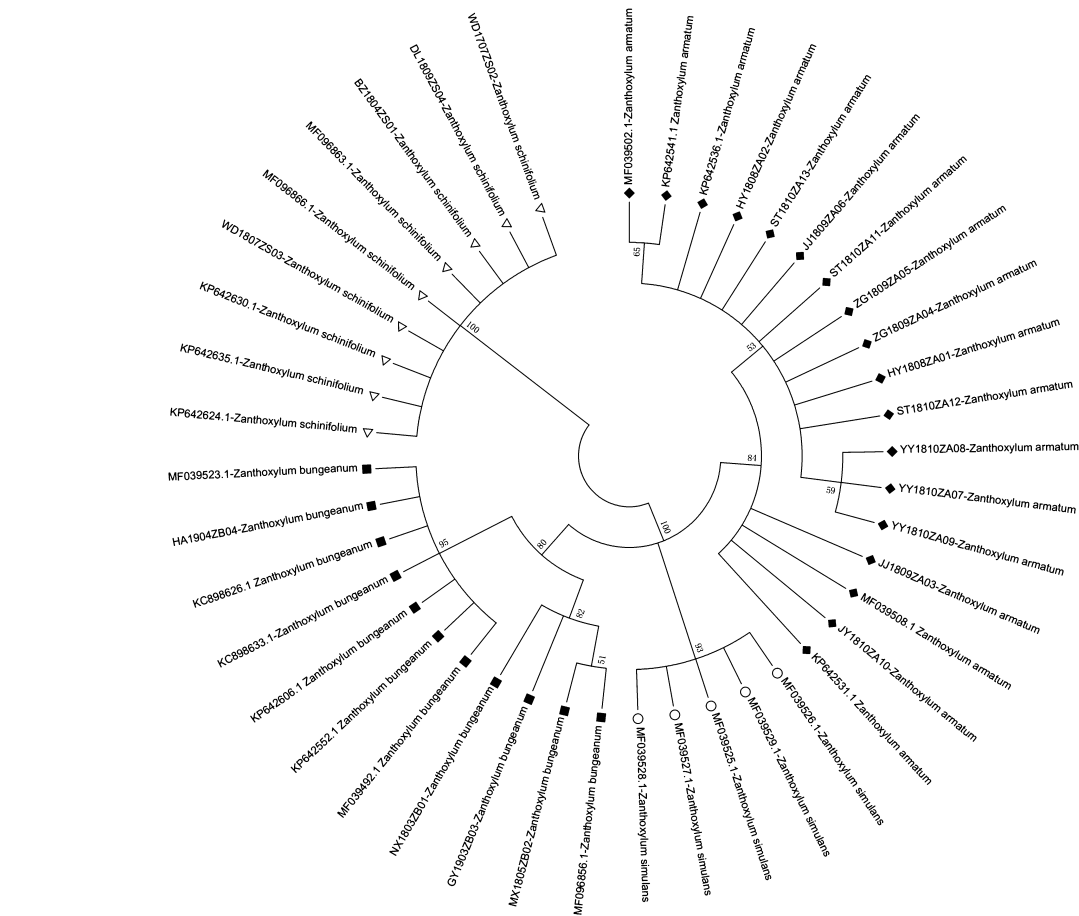
表 3 竹叶花椒及其近缘种 BLAST 鉴定结果

单倍型	NCBI			中药材 DNA 条形码鉴定系统		
	与序列最接近的物种	序列相似度/%	登录号	与序列最接近的物种	序列相似性/%	编号
A1	竹叶花椒	100.00	MF039543	竹叶花椒	99.6	DQ016546
A2	竹叶花椒	100.00	MF039512	竹叶花椒	99.1	DQ016546
A3	竹叶花椒	100.00	KP642535	竹叶花椒	99.1	DQ016546
B1	花椒	100.00	MF039544	花椒	100.0	YD01
B2	花椒	100.00	KP642579	花椒	99.6	M12
B4	花椒	100.00	MF096859	花椒	100.0	MX01
B5	花椒	99.11	MF096860	花椒	99.1	J2
C1	青花椒	100.00	MF096866	青花椒	100.0	SN063-3

表 4 竹叶花椒与其近缘种的种内、种间 K2P 遗传距离

物种名	竹叶花椒	花椒	青花椒	野花椒
竹叶花椒	0 ~ 0.018 (0.005)			
花椒	0.033 ~ 0.067 (0.042)	0 ~ 0.032 (0.014)		
青花椒	0.108 ~ 0.130 (0.113)	0.108 ~ 0.124 (0.117)	0 (0)	
野花椒	0.018 ~ 0.037 (0.024)	0.032 ~ 0.047 (0.035)	0.108 ~ 0.108 (0.108)	0 (0)

注：括号内为平均遗传距离。



注：支上数值仅显示自展支持率≥50%。

图 2 基于 ITS2 序列构建的竹叶花椒及其近缘种的 NJ 树

3.5 ITS2 二级结构分析

在进行 ITS2 二级结构预测时, 数据库网站有与青花椒、野花椒主导单倍型相同的或高度相似的二级结构模型; 竹叶花椒、花椒主导单倍型可直接生成二级结构。竹叶花椒及其近缘种 ITS2 二级结构见图 3。其二级结构均为典型的 1 环 4 臂结构, 即 1 个大的多分支环和 4 个螺旋(helix), 每个螺旋上有数目不等的茎环, 其中螺旋Ⅲ最长; 基序(sequence motifs)为 U-U mismatch (Ⅱ, left) U-U mismatch (Ⅱ, right) with AAA (btw. Ⅱ, Ⅲ) UGGU (Ⅲ, 5' side)。竹叶花椒螺旋Ⅰ有 3 个凸环、1 个发卡环; 螺旋Ⅱ有 2 个内环、1 个发卡环; 螺旋Ⅲ有 5 个凸环、2 个内环、1 个发卡环; 螺旋Ⅳ有 3 个凸环、1 个发卡环。竹叶花椒近缘种可以从每个螺旋的长度、螺旋之间的反转角度及螺旋上的茎环数目等方面与竹叶花椒进行区分。花椒、野花椒螺旋Ⅳ比竹叶花椒短, 少 1 个茎环; 青花椒螺旋Ⅲ比竹叶花椒多 2 个茎环; 花椒、青花椒、野花椒螺旋Ⅰ与螺旋Ⅲ间的反转角度与竹叶花椒均不相同。ITS2 二级结构可以直观地对竹叶花椒及其近缘种进行区分。

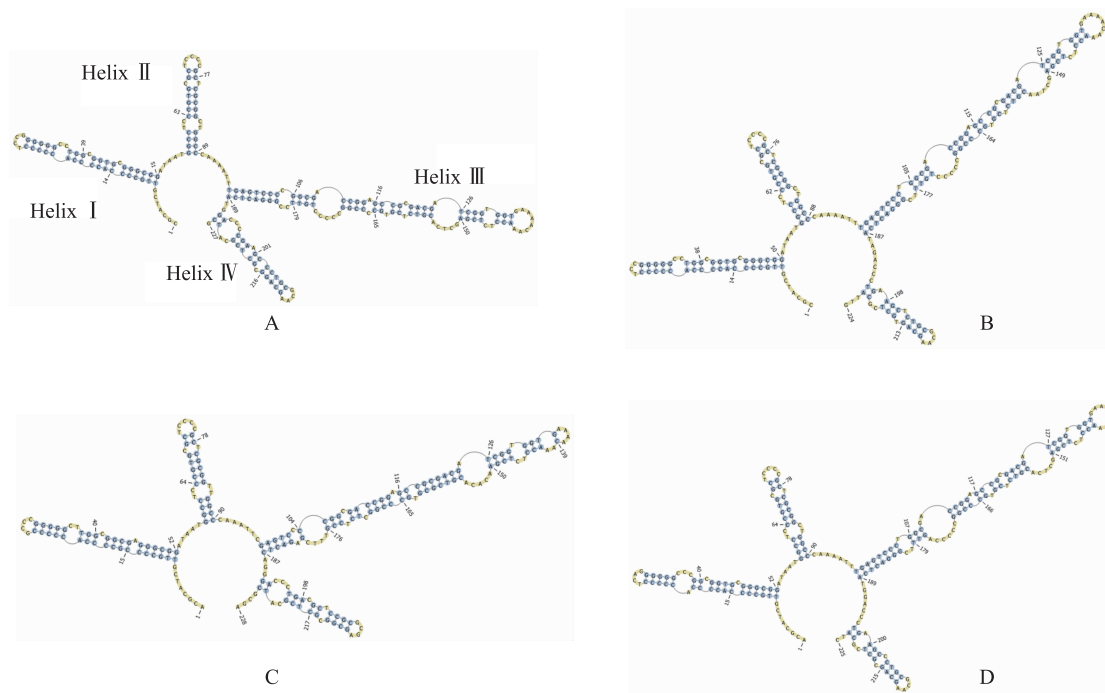
4 讨论

中药鉴定往往是多个方法的综合运用和相互验证。中药材原植(动)物鉴定、性状鉴定、显微鉴定

和理化鉴定的传统方法存在一定局限性, 而 DNA 条形码技术不受个体形态特征和完整性的影响, 方法易于统一、标准化, 是传统鉴定方法的有效补充^[17,24]。但同时, DNA 条形码鉴定实验取材极少, 取样误差对实验结果影响较大。加之市售中药材情况较复杂, 可能存在混杂甚至掺伪情况。因此, 如何从量较大的中药材中取样, 特别是从掺伪的样品中取样十分关键。这就需要借助性状鉴别、显微鉴别等手段对实验样品进行甄别, 判断样品是否掺伪。若存在掺伪, 就需分别进行取样、实验。本研究中的样品均经过性状鉴定, 确定了样品的单一性及其基原。最终 ITS2 条形码鉴定结果与性状鉴定结果一致。

与侯典云等^[25]研究结果比较, 本研究获得了竹叶花椒、花椒 ITS2 序列的新单倍型; 获得的青椒单倍型与文献中 GU247238 单倍型相同。但本研究中样品批次及代表性仍有局限, 各品种所获得的单倍型还无法囊括自然界的所有单倍型。

花椒的最大种内遗传距离为 0.032, 接近其与竹叶花椒的最小种间遗传距离 0.033; 竹叶花椒最大种内遗传距离为 0.018, 接近其与野花椒的最小种间遗传距离 0.018。花椒与竹叶花椒间、竹叶花椒与野花椒间不存在较宽的“barcoding gap”, 即遗传变异没有形成明显的间隔区。Meyer 等^[26]的研究也表明,



注: A. 竹叶花椒; B. 花椒; C. 青花椒; D. 野花椒。

图3 竹叶花椒及其近缘种的 ITS2 二级结构

理想的“barcoding gap”并不会经常出现。但通过比较种间平均遗传距离,同时结合 BLAST 结果、NJ 系统聚类树及 ITS2 二级结构也可以对其进行区分。

ITS2 二级结构是由 RNA 中的核苷酸在氢键作用下发生碱基互补配对,导致自身回折形成的茎环结构,是实现细胞功能的结构基础,包含着额外的系统发育信息^[27-29]。因此,ITS2 二级结构可以作为 DNA 条形码鉴别中药材的辅助手段。目前基于 ITS2 二级结构对中药材进行的鉴别研究已见报道,如刘新星等^[30]采用 ITS2 二级结构能将当归与其混伪品和近缘属药材区分开,特别是在 NJ 聚类树中独活与当归聚为一大支的情况下,通过分析两者的 ITS2 二级结构能够将其进行区分。高婷等^[31]的研究表明,黄芪属 4 个物种的 ITS2 二级结构在细节上存在差异。杨烁等^[32]通过研究茄属药用植物的 ITS2 二级结构,表明 ITS2 二级结构可以提高鉴定效率。邵婧等^[33]通过比较 ITS2 二级结构可以将茅苍术与菊科近缘种药材区分开来。本研究构建并比较了竹叶花椒及其近缘种药材的 ITS2 二级结构,通过比较其茎环结构的细节差异可以将竹叶花椒及其近缘种进行区分。

通过 K2P 遗传距离和 NJ 聚类树可以看出,竹叶花椒、花椒、野花椒三者之间的遗传关系较接近,而青花椒与三者间的遗传关系较远。这与植物形态分类学的观点是一致的:竹叶花椒、花椒、野花椒同属花椒亚属(Subgen. *Zanthoxylum*),而青花椒属崖椒亚属(Subgen. *Fagara*)。结果表明,DNA 条形码技术也可以为植物形态分类学服务。

参考文献

- [1] 贵州省药品监督管理局. 贵州省中药材、民族药材质量标准[M]. 贵阳:贵州科技出版社,2003:335.
- [2] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[M]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:45-46.
- [3] 湖南省食品药品监督管理局. 湖南省中药材标准[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,2010:374.
- [4] 四川省食品药品监督管理局. 四川省药品监督管理局中药材及饮片标准——竹叶花椒(藤椒):SCYCBZ2019-001[S]. 成都:四川省食品药品监督管理局,2019.
- [5] 《中国高等植物彩色图鉴》编委会. 中国高等植物彩色图鉴:第4卷[M]. 北京:科学出版社,2016:467.
- [6] 唐慎微. 证类本草[M]. 尚志钧,校点. 北京:华夏出版社,1993:402.
- [7] 李时珍. 本草纲目[M]. 张守康,校注. 北京:中国中医药出版社,1998:465.
- [8] 吴其濬. 植物名实图考[M]. 侯士良,校注. 郑州:河南科学技术出版社,2015:818.
- [9] 祝磊,陈茜,黎江华,等. 藤椒来源的考证与定义的思考[J]. 中草药,2018,49(4):987-992.
- [10] 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,2020:166-167.
- [11] 陈士林,姚辉,宋经元,等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2007,9(3):7-12.
- [12] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond B,2003,270(1512):313-321.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:490-492.
- [14] 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.
- [15] GAO T, YAO H, SONG J Y, et al. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2[J]. J Ethnopharmacol,2010,130(1):116-121.
- [16] 陈士林,姚辉,韩建萍,等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):141-148.
- [17] 陈士林. 中国药典中药材 DNA 条形码标准序列[M]. 北京:科学出版社,2015:25.
- [18] KELLER A, SCHLEICHER T, SCHULTZ J, et al. 5S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation[J]. Gene,2009,430(1/2):50-57.
- [19] KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. J Mol Evol,1980,16(2):111-120.
- [20] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7. 0 for bigger datasets[J]. Mol Biol Evol,2016,33(7):1870-1874.
- [21] SCHULTZ J, MÜLLER T, ACHTZIGER M, et al. The internal transcribed spacer 2 database: A web server for (not only) low level phylogenetic analyses[J]. Nucleic Acids Res,2006,34(web server issue):W704-W707.
- [22] SELIG C, WOLF M, MÜLLER T, et al. The ITS2 Database II: Homology modelling RNA structure for molecular systematics[J]. Nucleic Acids Res,2008,36(database issue):D377-D380.

(下转第814页)

- 中国现代药物应用,2008,2(2):92-93.
- [10] 马凤君,颜晓,潘亚辉,等.近十年中医药抗衰老疗法研究概况[J].山东中医杂志,2020,39(4):407-412.
- [11] 徐舜,崔红晶,赵炜,等.细胞衰老分子机制的研究进展[J].广东医科大学学报,2020,38(1):1-10.
- [12] 陈江锋,林芝娴,韩孙亚,等.基于网络药理学结合分子对接方法探讨绞股蓝治疗非小细胞肺癌的作用机制[J].广州中医药大学学报,2020,37(3):501-509.
- [13] 孔艺,吴红卫,陈永,等.基于网络药理学和分子对接探讨痰热清注射液治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的机制[J].中草药,2020,51(7):1785-1794.
- [14] 陈晶,邵先明,侯志涛.基于网络药理学的黄芪-山药药对治疗2型糖尿病作用机制研究[J].中国中医药信息杂志,2020,27(6):89-95.
- [15] 胡妮娜,张晓娟.黄芪的化学成分及药理作用研究进展[J].中医药信息,2021,38(1):76-82.
- [16] 杨柳,张王宁,刘月涛,等.基于网络药理学的黄芪治疗肾病综合征的机制研究[J].中草药,2019,50(8):1828-1837.
- [17] 张瑞,曹庆伟,李爱平,等.基于网络药理学的黄芪抗疲劳作用机制研究[J].中草药,2019,50(8):1880-1889.
- [18] 梁玉华,李亦聪,邓太平,等.基于网络药理学的黄芪治疗重症肌无力的机制研究[J].广东药科大学学报,2020,36(2):242-248.
- [19] 朱嘉欢,黄小平,邓常清.黄芪和当归的主要活性成分配伍促进衰老造血干细胞增殖作用的研究[J].中草药,2019,50(1):111-119.
- [20] 顾艺婧,傅稼耀,武文婧,等.槲皮素通过抗骨相关细胞衰老作用治疗雌激素缺乏骨质疏松症的初步研究[J].同济大学学报(医学版),2019,40(3):274-280.
- [21] 章诗迪.环黄芪醇提取物的制备及其抗衰老活性研究[D].杭州:浙江工业大学,2016.
- [22] 张兰. Akt2 是 Akt 家族中抗氧化应激的主要激酶并通过多条信号途径抑制过氧化氢诱导的细胞凋亡[D].长沙:湖南师范大学,2011.
- [23] 关凯方.乳源 MFG-E8 介导 MAPK 信号通路调控及对衰老大鼠肌肉再生作用[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2019.
- [24] 周小平,司晓伟,徐武清,等.补益营卫方、TGF β 1 及 bFGF 对衰老皮肤成纤维细胞 c-Jun 基因表达的影响[J].中国美容医学,2015,24(17):28-33.
- [25] 张铁辉. IL-6 在垂体瘤细胞衰老中表达调控和作用机制研究[D].苏州:苏州大学,2014.
- [26] 张健.基于 AGEs/RAGE 通路探讨桃红四物汤对光损伤 HDMEC 细胞氧化应激的保护机制[D].沈阳:辽宁中医药大学,2018.
- [27] 安静.人巨细胞病毒慢性感染参与免疫衰老的相关机制研究[D].哈尔滨:哈尔滨医科大学,2014.
- [28] 李苑,王宇彤,徐越,等.细胞衰老与肿瘤发生[J].同济大学学报(医学版),2019,40(3):388-391.

(收稿日期:2020-06-11 编辑:田苗)

(上接第 791 页)

- [23] KOETSCHAN C, FÖRSTER F, KELLER A, et al. The ITS2 database III: Sequences and structures for phylogeny [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38 (database issue): D275-D279.
- [24] 陈士林.中药 DNA 条形码分子鉴定[M].北京:人民卫生出版社,2012:6-8.
- [25] 侯典云,宋经元,杨培,等. ITS/ITS2 条形码序列在花椒药材鉴定中的应用[J].中国药理学杂志,2014,49(7):534-538.
- [26] MEYER C P, PAULAY G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling [J]. PLoS Biol, 2005, 3(12):e422.
- [27] LEONTIS N B, WESTHOF E. Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs [J]. RNA, 2001, 7(4):499-512.
- [28] CÔTÉ C A, GREER C L, PECULIS B A. Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast [J]. RNA, 2002, 8(6):786-797.
- [29] KELLER A, FÖRSTER F, MÜLLER T, et al. Including RNA secondary structures improves accuracy and robustness in reconstruction of phylogenetic trees [J]. Biol Direct, 2010, 5:4.
- [30] 刘新星,欧巧明,石有太,等.基于 ITS2 序列鉴别道地药材岷县当归及其混伪品[J].中草药,2018,49(20):4877-4883.
- [31] 高婷,姚辉,马新业,等.中国黄芪属药用植物 DNA 条形码(ITS2)鉴定[J].世界科学技术—中医药现代化,2010,12(2):222-227.
- [32] 杨烁,薛渊元,李美慧,等. ITS2 二级结构系统发育信息在茄属药用植物 DNA 条形码鉴定中的应用价值[J].中国中药杂志,2017,42(3):456-464.
- [33] 邵婧,谷巍,巢建国,等.基于 ITS2 序列的茅苍术及其近缘种 DNA 分子鉴定[J].中草药,2015,46(8):1209-1215.

(收稿日期:2020-05-20 编辑:田苗)