

- 中草药, 2009, 40(7): 1172-附 2.
- [11] Napoleone E, Zurlo F, Latella M C, *et al.* Paclitaxel down-regulates tissue factor in cancer and host tumor-associated cells [J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(3): 470-477.
  - [12] Wang H J, Huang H, Chuang Y C, *et al.* Paclitaxel induces up-regulation of tissue factor in human aortic endothelial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2009, 9(1): 144-147.
  - [13] Stahli B E, Camici G G, Steffel J, *et al.* Paclitaxel enhances thrombin-induced endothelial tissue factor expression via c-Jun terminal NH<sub>2</sub> kinase activation [J]. *Circ Res*, 2006, 99(2): 149-155.
  - [14] Cho J Y, Yoo E S, Cha B C, *et al.* The inhibitory effect of triterpenoid glycosides originating from *Sanguisorba officinalis* on tissue factor activity and the production of TNF- $\alpha$  [J]. *Planta Med*, 2006, 72(14): 1279-1284.
  - [15] 王旋, 张慧灵, 顾振纶, 等. 银杏内酯药物作用的研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(11): 1741-1744.
  - [16] 刘伟, 朱自强, 祖淑玉, 等. 脐静脉内皮细胞组织因子及其抑制物表达中银杏内酯 B 的干预效应 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(6): 1053-1056.
  - [17] 程军, 李金平, 田卓, 等. 南蛇藤素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠主动脉壁 C 反应蛋白及组织因子表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(5): 341-344.
  - [18] Huang T H, Tran V H, Roufogalis B D, *et al.* Gypenoside XLIX, a naturally occurring gynosaponin, PPAR- $\alpha$  dependently inhibits LPS-induced tissue factor expression and activity in human THP-1 monocytic cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 218(1): 30-36.
  - [19] 谢薇, 夏凌辉, 方峻, 等. 人参皂苷 Rb1 对人脐静脉内皮细胞一氧化氮释放和 TGF $\beta$ 1 表达的影响及意义 [J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(9): 1225-1228.
  - [20] 谢薇, 夏凌辉, 方峻, 等. 人参皂苷 Rb1 对白消安诱导人脐静脉内皮细胞表达 PAI-1、TF 和 TGF $\beta$ 1 的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(9): 1856-1858.
  - [21] 中国药科大学. 麦冬皂苷 D 作为组织因子途径抑制剂的医药用途 [P]. 中国专利: CN200810022093. 2, 2008-12-24.
  - [22] 熊石龙, 文志斌, 王前, 等. 川芎嗪对肿瘤坏死因子致血管内皮细胞组织因子表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(19): 2330-2333.
  - [23] 熊石龙, 文志斌, 何晓凡, 等. 川芎嗪抑制肿瘤坏死因子  $\alpha$  诱导人脐静脉血管内皮细胞组织因子表达的机制研究 [J]. 广东医学, 2008, 29(4): 545-548.
  - [24] Holy E W, Akhmedov A, Lüscher T F, *et al.* Berberine, a natural lipid-lowering drug, exerts prothrombotic effects on vascular cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(2): 234-240.
  - [25] 中国药科大学. 异喹啉生物碱类作为组织因子抑制剂的医药用途 [P]. 中国专利: CN200810022092, 2008-12-24.
  - [26] 余美荣, 蒋福升, 丁志山. 姜黄素的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(5): 828-831.
  - [27] Guo W M, Ratnasari A, Li J, *et al.* Regulation of LPS-induced tissue factor expression in human monocytic THP-1 cells by curcumin [J]. *FASEB J*, 2009, 23: 717.
  - [28] Lee Y M, Hisiao G, Chang J W, *et al.* Scoparone inhibits tissue factor expression in lipopolysaccharide-activated human umbilical vein endothelial cells [J]. *J Biomed Sci*, 2003, 10(5): 518-525.
  - [29] Stahli B E, Breitenstein A, Akhmedov A, *et al.* Cardiac glycosides regulate endothelial tissue factor expression in culture [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(12): 2769-2776.
  - [30] Gebhard C, Stampfli S F, Gebhard C E, *et al.* Guggulsterone, an anti-inflammatory phytosterol, inhibits tissue factor and arterial thrombosis [J]. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104(3): 285-294.
  - [31] 刘思好, 信红亚, 肖坚, 等. 山酮抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞组织因子表达及机制研究 [J]. 医学临床研究, 2008, 25(3): 385-388.
  - [32] 欧明娥, 唐利文, 邓常清. 补阳还五汤有效组分对血管内皮细胞抗血栓功能及蛋白激酶 C 的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1514-1520.
  - [33] 何晓凡, 文志斌, 贺石林. 四物汤对脂多糖诱导乳鼠星形胶质细胞表达组织因子的影响 [J]. 血栓与止血学, 2004, 10(3): 104-106.
  - [34] 郑练, 方驰华. 益母草对人脐静脉内皮细胞组织因子转录及表达的影响 [J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(6): 805-808.
  - [35] 成春英, 文志斌, 何晓凡, 等. 灵芝合剂对乳鼠星形胶质细胞组织因子表达的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(5): 263-266.

## 药用植物种质资源 ITS 序列研究进展

于华会<sup>1</sup>, 杨志玲<sup>1\*</sup>, 杨旭<sup>1</sup>, 谭梓峰<sup>1</sup>, 舒泉<sup>2</sup>, 刘若楠<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 云南农业大学, 云南 昆明 650201)

**摘要:** ITS(internal transcribed spacer) 序列分析已成为近年来国际上植物多样性研究的热点, 并在药用植物种质资源研究中得到广泛的应用。但由于相关研究成果众多, 一定程度上也阻碍了该方面的科研工作。针对这种情况, 对 ITS 序列分析的优缺点、技术流程、数据分析方法及其在药用植物品种鉴定、分类、亲缘关系确定、遗传多样性分析等方面的应用情况进行详细的综述, 同时对其未来的发展前景进行了展望, 以期能使国内药用植物学工作者对此有更多的了解和认识。

**关键词:** ITS 序列; 药用植物; 种质资源

中图分类号: R282. 2; Q789; Q946

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0491-06

## Advances in studies on ITS sequence of medicinal plants germplasm resources

YU Hua-hui<sup>1</sup>, YANG Zhi-ling<sup>1</sup>, YANG Xu<sup>1</sup>, TAN Zi-feng<sup>1</sup>, SHU Xiao<sup>2</sup>, LIU Ruo-nan<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry Sciences, Fuyang 311400, China; 2. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Key words:** ITS sequence; medicinal plant; germplasm resources

收稿日期: 2009-09-04

基金项目: 国家科技部项目 (200704022)

作者简介: 于华会 (1983—), 女, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子方面研究。

E-mail: yuhuahui1217@163.com

\*通讯作者 杨志玲 Tel: (0571) 63100410 E-mail: zlyang0002@126.com

药用植物种质资源是指一切可用于药物开发的植物资源,是所有药用植物物种的总和,也是进行中药材品种改良、新品种培育及遗传工程建设的物质基础。随着人们生活水平日益提高,对药用植物的利用不再局限于传统的入药治病,而广泛应用于饮食、保健、绿色农药、畜禽业等人类生活的各个方面,因而导致了药用植物资源的过度开发利用,已有相当一部分珍贵药用植物资源受到严重破坏或濒临灭绝。国内外学者对药用植物种质资源可持续利用进行了广泛的研究<sup>[1~3]</sup>。

分子生物学技术飞速发展,并渗透到生命科学的各个领域,为药用植物种质资源研究提供了新的借鉴方法。各种分子标记技术,如 AFLP (amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)<sup>[4]</sup>、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)<sup>[5]</sup>、内部简单重复序列标记 (inter simple sequence repeat, ISSR)<sup>[6]</sup>、内部转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS)<sup>[7]</sup> 等先后被借鉴和应用到药用植物种质资源研究。其中 ITS 序列分析技术因其准确、可靠、方便等优点备受人们的关注和推崇<sup>[8]</sup>,从诞生之初便被广泛应用于药用植物资源鉴定<sup>[9,10]</sup>、系统发育<sup>[11~13]</sup>、遗传多样性检测<sup>[7,14]</sup> 等研究领域,促使药用植物理论研究与实际应用以前所未有的速度结合起来。然而,随着该技术在药用植物研究中的不断深入,研究方向重叠、结果不一、操作流程不规范等一系列问题也随之产生,不但影响到该技术的发展,一定程度上也对科技工作者科研选题造成了影响,但鲜见有专业对其总结分类的文章。针对这种情况,本文综述了 ITS 技术常规操作流程和数据分析方法及其在药用植物种质资源研究中的最新进展和成果,以期能使国内药用植物学工作者对此有更多的了解和认识。

## 1 ITS 技术常规操作及数据分析

1.1 ITS 序列结构及优点:高等植物的 rDNA (ribosome DNA) 是由核糖体基因 (转录单位) 及与之相邻的间隔区组成的高度重复串联序列,并以外部转录间隔区 (external transcribed spacer, ETS)、18S rDNA、内部转录间隔区 1 (internal transcribed spacer, ITS1)、5.8S rDNA、内部转录间隔区 2 (ITS2)、26S rDNA 和非转录间隔区 (non transcribed, NTS) 的顺序排列在 DNA 上 (5' 到 3')<sup>[15]</sup>。其中,ITS1 和 ITS2 共同构成了 ITS 序列。介于 ITS1 和 ITS2 之间的 5.8S 序列长度非常保守 (被子植物中,一般 163~164 bp)<sup>[16]</sup>,物种间的碱基序列也极为相似,该片段的存在不会对 ITS1 和 ITS2 序列分析造成影响,因此,通常所说的 ITS 序列也将其包括在内,统称为 ITS 区域 (图 1)。

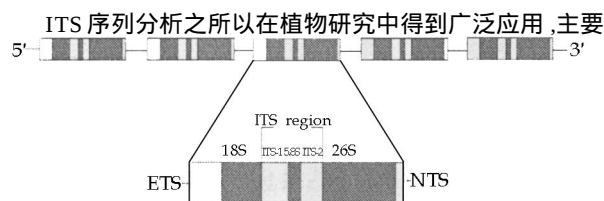


图 1 核糖体基因组及 ITS 区结构

Fig. 1 Nuclear ribosomal DNA and structure ITS region

取决于以下几个原因:1) 相对于 mtDNA (线粒体 DNA), rDNA 是核基因组序列,受到细胞核保护机制的保护,进化过程相对稳定,且同时具有多变区和保守区,可利用不同的区域特点进行独立研究,研究方向广泛;2) ITS1、ITS2 分别位于 18S~5.8S rDNA、5.8S~26S rDNA,而 18S、5.8S、26S rDNA 的序列又非常保守,这样就可以用与其序列互补的通用引物对 ITS 区进行 PCR 扩增<sup>[7]</sup>;3) ITS 在 rDNA 中是高度重复的,千万个拷贝以串联重复方式出现在一个或多个染色体基因位点上,且通过不等交换和基因转换,使得重复单位间发生了位点内或位点间的同步进化,即不同的 ITS 拷贝间的序列趋于相近或完全一致<sup>[17]</sup>,为 PCR 产物的直接测序奠定了理论基础<sup>[8]</sup>;4) ITS1 和 ITS2 作为非编码区,承受的选择压力较小,虽然长度比较保守,但是核苷酸序列变化大,可以提供详尽的遗传学信息<sup>[18]</sup>。除此之外,ITS 序列还具有样品用量少、精准鉴定等优点,这也为其成为药学研究中的重要标记奠定了基础。

1.2 ITS 技术操作流程:与以往分子系统学方法相似,ITS 同样是基于 DNA 测序的分子标记技术,通过准确检测 DNA 序列中碱基替换、插入和缺失等变异信息,来研究个体或种群的遗传结构。因此,也具有相似的操作流程:1) 采集所需物种样品,提取基因组 DNA;2) 设计和合成引物;3) 进行 PCR 预选扩增,优化反应条件,筛选可用引物;4) 克隆测序;5) 序列编辑,人工校正;6) 结果分析,比对差异位点;7) 提交结果到相关数据库 (如 GenBank),获得登录号 (原理见图 2)。另外,利用 18S、5.8S、26S rDNA 序列在物种间的保守性特点,可通过已知物种的相关序列设计引物,或利用通用引物进行扩增<sup>[7,19]</sup>,大大缩短了实验时间和简化了实验步骤。

表 1 总结了一些已在药用植物 ITS 区域研究中扩增成功的通用引物,利用这些引物通过 PCR 反应可以扩增出需要的片段。

## 1.3 数据分析

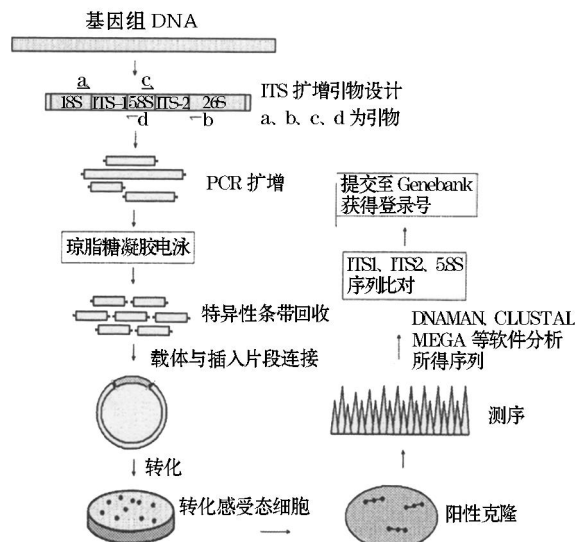


图 2 ITS 技术操作流程图示

Fig. 2 Flowchart of ITS technical operation

表 1 成功应用于药用植物 ITS-PCR 的引物序列

Table 1 Successful application of ITS-PCR primer sequence to medicinal plant

| 物 种                              | 引物名称      | 引物序列(5'→3')                | 位置 文献来源      |
|----------------------------------|-----------|----------------------------|--------------|
| 乌头属<br>( <i>Aconitum</i> )       | ITS4      | TCCTTCCGCTTATTGATATGC      | 18S 20~22    |
|                                  | ITS5      | GGAAAGGAAGATCGTAACAAAGG    | 26S          |
| 三叶草属<br>( <i>Trifolium</i> )     | ITS4      | TCGTAACAAAGTTTCCGTAAGGTG   | 18S 19       |
|                                  | ITS4      | TCCTCCGCTTATTGATATGC       | 26S          |
| 无花果属<br>( <i>Ficus</i> )         | ITS4      | TATGCTTAAACTCCAGCGGG       | 18S 7,23     |
|                                  | ITS5      | AAGGTTCCGTAGGTGAAC         | 26S          |
| 广义青蒿竹属<br>( <i>Arundinaria</i> ) | ITS-1     | AGAAATCGTAACAAAGTTTCCGTAGG | 18S 24,25    |
|                                  | ITS4      | TCCTCCGCTTATTGATATGC       | 26S          |
| 当归属<br>( <i>Angelica</i> )       | P1 (ITS5) | GGAAATAAAAATCGTAACAAAGG    | 18S 26~28    |
|                                  | P2        | TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC    | 26S          |
|                                  | ITS-4     | TCCTTCCGCTTATTGATATGC      | 26S          |
|                                  | 18SP1     | CGTAACAAAGTTTCCGTAGGTGAA   | 18S          |
|                                  | 26SP2     | TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGC | 26S          |
| 明党参属<br>( <i>Changium</i> )      | P1        | AGAAATCGTAACAAAGTTTCCGTAGG | 18S 29,30    |
|                                  | PA        | GATGCGAGAGCCGAGATATCCGTTG  | 5.8S         |
|                                  | P3        | GCATCGATGAAGAACGCAAC       | 5.8S         |
|                                  | P4        | TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC    | 26S          |
| 莲属( <i>Nelumbo</i> )             | C1        | GTTTCTTTTCCGCT             | 18S 10,31~33 |
|                                  | C2        | AGGAAGATCGTAACAAAG         | 26S          |
|                                  | ITS4      | TCCTCCGCTTATTGATATGC       | 18S          |
|                                  | ITS5      | GGAAATAAAAATCGTAACAAAGG    | 26S          |
| 五味子属<br>( <i>Schisandra</i> )    | P1        | AGAAATCGTAACAAAGTTTCCGTAGG | 18S 16,34    |
|                                  | P4        | TCCTCCTCCGCTTATTGATATGC    | 26S          |
| 石斛属( <i>Dendrobium</i> )         | P18S3'    | ATTGAATGGTCCGTTGAAGTGTTCG  | 18S 35~38    |
|                                  | P26S5'    | AATTCCTCCGCTTCGCTGCCGTTAC  | 26S          |
|                                  | ITS-P1    | CGTAACAAAGTTTCCGTAGGTGGAC  | 18S          |
|                                  | ITS-P2    | TTATTGATATGCTTAAACTCAGCGGG | 26S          |
| 柴胡属( <i>Bupleurum</i> )          | ITS4      | TCCTTCCGCTTATTGATATGC      | 18S 39,40    |
|                                  | ITS5      | GGAAAGGAAGATCGTAACAAAGG    | 26S          |

1.3.1 ITS 序列测定:测序虽作为 ITS 序列分析前的最后步骤,但也是其最重要部分。现在常采用双脱氧终止法来完成测序工作,测序条件一般为:95℃、20 s,50℃、20 s,60℃、1 min,30 个循环;测序对象:PCR 产物直接测序。

1.3.2 ITS 序列分析:利用 CLUSTAL-X、DNAMAN、DNASTAR、MEGA(version4.0) 等软件对测序所得序列进行对位排列,经手工校正,剪去序列两端不可靠的碱基序列后,便可获得目的片段。ITS1 和 ITS2 的边界可根据已发表的植物 18S、5.8S 和 26S rDNA 序列,以及近缘类群的 ITS1、ITS2 序列来确定。

通过已获得 ITS 序列,可进行多方面研究:1) 遗传距离计算。种间距离常采用 pairwise uncorrected p-distance<sup>[41]</sup> 或 Kimura-2-parameter distance (K2P)<sup>[42]</sup> 模型计算;种内距离常采用 K2P 距离、平均  $\theta$  值和平均溯祖度 3 重参数来表示<sup>[42]</sup>。其中平均  $\theta$  值是指每个物种内不同个体间的平均 K2P 距离,目的是消除不同物种因采样个体数不均引起的偏差;平均溯祖度是指物种内所有个体间最大的 K2P 距离,用以反映种内最大变异范围<sup>[43]</sup>。2) 系统学分析。采用标准的分子系统学方法(如 NJ、UPGMA、ML) 建立多种系统树<sup>[43]</sup>,通过检验每个物种的单系性,即同一物种的不同个体能否紧密聚类到一起,来判断其系统发生关系。建树过程中,各种核苷酸替代同等加权,并进行自展分析(bootstrap,一般重复 1 000 次),以检验树拓扑结构的可靠性。3) 混淆品种分析。

在 GenBank 中检索混淆品种的 ITS 序列信息,排列后经 PAUP 分析,通过碱基差异比对和建树,分析待检测品种间的差异。4) 遗传多样性、物种分类等分析原理与系统学分析相似。

## 2 ITS 序列分析在药用植物种质资源研究中的应用

药用植物种质资源是中药生产的源头,尤其是野生近缘植物和古老的地方种是长期自然选择和人工选择的产物,具有独特的优良性状和抵御自然灾害的特性。但药用植物种质资源作为一个庞大的家族体系,其发展更是受到气候、环境及自身遗传等多种因素综合作用的影响。有的药用植物在不同产地种系与区系的发展过程中,虽表现出种内或种间药用功效的差异,但其外部形态、组织特征甚至化学成分却极其相似,传统方法很难达到鉴别分离的目的。ITS 序列分析通过比较 DNA 分子中 4 种碱基序列排列的变化,反映生物体在遗传上的变异,从分子水平理清其遗传背景<sup>[9]</sup>,克服了传统研究方法的弱点,提高了药用植物种质资源研究的水平,为确定科学有效的保护策略和恢复措施提供依据。

2.1 药用植物品种鉴定:药材品种的鉴定是中药研究的重要组成部分,长期以来我国中药材处于品种混乱和质量难以保证的不利局面,很大程度上制约了中医药的安全有效及其向现代化、标准化和国际化的发展。因此,采取科学的方法对混淆生药品种及近缘生药品种进行鉴定具有重要的现实意义。

张宏意等<sup>[10]</sup>研究不同产地何首乌的 ITS 片段遗传差异性,分析该片段在何首乌道地性的 DNA 分子鉴别和野生资源品种的鉴定及种质资源研究中的意义,序列间共有 17 个变异位点,ITS 序列可对何首乌的道地性做出鉴别,对野生资源品种的鉴定具有较好的分辨性。张婷等<sup>[37]</sup>采用限制性片段长度 (PCR-RFLP) 方法获得部分石斛属植物 ITS 片段的限制性图谱,并用 ClaI 和 ApaI 酶切束花石斛 *Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl. 及其形态相似种的 PCR 扩增产物, SphI 酶切流苏石斛 *D. fimbriatum* var. *oculatum* Hook. 及其形态相似种的 PCR 扩增产物。结果表明, rDNA ITS 的 PCR-RFLP 可用于鉴别药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种,并用此方法鉴定了市场上收集的 25 件商品束花石斛、流苏石斛新药材的原植物。Yang 等<sup>[9]</sup>利用 PCR 技术对柴胡属的北柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 和南柴胡 *B. scorzoneri-folium* Willd. 2 种道地药材及其 9 种混淆品种的 ITS 序列(约 600 bp) 进行扩增分析,发现 ITS 序列能够对收集到的所有材料进行准确识别。Xue 等<sup>[44]</sup>利用 ITS 序列标签分析技术,创立了 DNA 条形码在线快速鉴定方法,并对中国传统药用植物地锦草 *Euphorbia humifusa* Willd. 和斑地锦美洲地锦 *E. maculata* L. 成功进行了鉴定。

除此之外,ITS 序列分析还在巴戟天 *Morinda officinalis* How. 鼠尾草属 (*Salvia* L.)、钩藤属 (*Unvaria* Schred.) 等药用植物品种鉴定中得到应用<sup>[45~47]</sup>。

2.2 药用植物亲缘关系确定:亲缘关系相近的药用植物有相似或相同的药效成分,这是寻找新药源植物的重要方式。

药用植物亲缘关系的鉴定一直是药用植物领域研究的热点。

赵海光等<sup>[13]</sup>同时利用 ITS 和 trnL-F 2 种序列对繁缕 *Stellaria media* (L.) Cyr. 及其近缘种和鹅肠菜 *Myosoton aquaticum* Moench 的亲缘关系进行了研究, 结果发现两者均可用于繁缕及其近缘种的鉴别, 且 ITS 是更为适宜的分子标记。Artyukova 等<sup>[48]</sup>通过对生长于俄罗斯远东地区的 8 种五加科植物进行 ITS 序列分析, 建立了远东地区种及科内其他种植物间的系统发生关系。Zeng 等<sup>[49]</sup>对以礼草属 (*Kengyilia* Yen et J. L. Yang) 17 种植物和拟鹅观草属 [*Pseudoroegneria* (Nevski) A. Love]、冰草属 (*Agropyron* Gaertn.)、鹅观草属 (*Roegneria* C. Koch)、杜威草属 (*Douglasdeweya* C. Yen) 18 种植物进行了 ITS 序列测定, 发现以礼草属与杜威草属和冰草属具有更近的亲缘关系, 并且以礼草属植物在地理分布上分为 2 个小种群, 也与其系统发育关系相符, 证实 ITS 序列分析是研究近缘种发生关系的有效手段。Sudheer Pamidimarri 等<sup>[50]</sup>利用 ITS 序列分析对大戟科麻风树属 *Jatropha curcas* L. 植物的系统发育关系和遗传分化等问题进行了研究。大量的研究都显示出, ITS 序列分析在药用植物亲缘关系的研究中具有无可替代的先进性和可靠性, 必将成为今后研究的趋势。

2.3 药用植物分类: 药用植物种类繁多, 各物种所含有的化学成分复杂, 运用传统研究方法很难达到对其精确分类, 存在较多弊端和争议。为解决以上问题, 国内外学者纷纷采用 ITS 序列分析对有争议的分类重新进行研究, 以期得到更合理的解释。

刘春生等<sup>[27]</sup>利用 ITS 序列分析, 对紫花前胡 *Peucedanum decursivum* Maxim. 分类位置进行了探讨, 发现紫花前胡并不属于前胡属 (*Peucedanum* L.), 应为当归属植物, 紫花前胡和白花前胡 *P. praeruptorum* Dunn 应分别入药。Luo 等<sup>[21]</sup>对来自亚洲东部、美洲北部和欧洲的 51 种乌头属植物和 1 个亚属植物进行了 ITS 序列分析, 研究了乌头亚属 (Subgen. *Aconitum*) 的分类地位。结果显示, ITS 拓扑结构与乌头亚属的子群划分一致, 确立毛茛科乌头亚属的分类地位, 并且也得到种子和花瓣等形态学特征的支持, 纠正了传统分类的错误。Bekel 等<sup>[51]</sup>也通过测定 ITS 全序列长度, 分析菊科小葵子属 (*Guizotia* Cass.) 5 种植物的系统发育关系及分类地位。结果发现, *G. scabra* ssp. *scabra*、*G. scabra* ssp. *schimperi* 和 *G. villosa* Sch. Bip. ex A. Rich. 与栽培种 *G. abyssinica* Cass. 具有相同的起源, 现行的小葵子属及其亚属的分类关系应该被重新定义。

五味子科 (Schisandraceae) 是被形态和分子证据证明的被子植物中最基部的分支之一, 而在传统的分类系统中, 五味子科一直被认为是木兰亚纲中较特化的类群。两种截然不同的观点导致五味子科的系统位置和在被子植物起源演化上的意义也截然不同, 使得该类群成为目前被子植物系统学研究中的关键类群之一而备受关注。刘忠等<sup>[16]</sup>利用 ITS 序列分析重新研究了五味子科的分类关系, 发现基于 ITS 序列分析得到的分子证据与形态学、孢粉学证据是相吻合的,

为五味子科植物系统发育关系及分类关系的界定提供了新的佐证。

当归属一直以来存在狭义当归属 (*Angelica* s. s.) 和广义当归属 (*Angelica* s. l.) 之争, 各属之间的关系非常混乱。薛华杰等<sup>[26]</sup>采用 PCR 直接测序法, 测定了东亚地区狭义当归属及其近缘共 7 属 40 种代表植物的核糖体 DNA ITS 序列, 并结合 GenBank 中相关植物的 ITS 序列 (含外类群 3 种), 对上述问题进行了探讨。结果表明, 东亚当归属中, ITS 序列分析支持狭义当归属不是单起源的自然分类群, 而应该被分成若干组的观点<sup>[52]</sup>, 同时对广义当归属划分提出了质疑, 建议将山芹属 (*Ostericum* Hoffm.) 作为一个相对独立的分类群处理, 而不是合并到广义当归属。

2.4 药用植物遗传多样性分析: 遗传多样性的高低是物种生存能力的具体体现, 物种 (或居群) 的遗传多样性越高或遗传变异越丰富, 对环境变化的适应能力就越强, 越容易扩展其分布范围和开拓新的环境。

张富民等<sup>[20]</sup>通过测定 nrDNA 的 ITS 序列, 对我国横断山地区紫乌头复合体 (*Aconitum delavayi* complex) 进行遗传多样性和系统发育的研究, 认为紫乌头复合体不是一个单系类群, 可能经历了 3 次不同的起源。石志刚等<sup>[53]</sup>利用 nrDNA ITS 序列分析, 探讨 18 份宁夏枸杞资源的遗传多样性, 获得了 18 种宁夏枸杞 nrDNA ITS 区碱基序列。结果显示, ITS 序列在宁夏枸杞中具有较多的变异位点, 能够直观展示 18 份宁夏枸杞的遗传变异和遗传多样性差异, 为目前较为混乱的枸杞资源的整理及分类提供了一定的参考。Tsai 等<sup>[54]</sup>根据 ITS 的序列差异确定了 12 种台湾石斛的遗传关系, 完整地分析了 12 种石斛及 2 种非石斛属植物的 ITS 序列, 发现了 684 个特征, 并依次分析了其遗传距离和构建了系统发育树。Singh 等<sup>[55]</sup>也利用 ITS 序列分析, 检测了鹰嘴豆 *Cicer arietinum* L. 野生种与栽培种的遗传多样性水平, 并进一步评价了它们系统发育关系。

总体来看, 目前仅就常用的一些药用植物资源开展了遗传检测, 而绝大多数药用植物遗传背景还未开展研究, 因此该方面的研究课题还相对较多, 有兴趣的研究者可以投入到该领域的研究中。

### 3 问题与展望

3.1 ITS 分析存在的问题: ITS 序列分析在药用植物种质资源研究中取得的成果已得到国内外学者的肯定<sup>[7, 13]</sup>, 也为解决一些长期存在的分类争议提供了令人信服的证据<sup>[26]</sup>, 但在现有的技术条件下, 仍然存在一些缺点和不足。首先, ITS 片段不仅可能来自种间或亚种间, 也可能来自同一个种中不同的个体, 甚至来自同一个体的不同的操纵子, 动植物个体的基因组中含有许多个 rDNA 拷贝, 其中的 ITS 长度可能不同, 即使 ITS 片段长度一致, 其序列也有一定的差异, 这样就更增加了复杂性<sup>[56]</sup>。其次, ITS 序列长度变异大, 多数物种扩增片段长度超过 1 100 bp, 需要使用中间引物才能扩增获得整个基因, 并且序列中还存在的 poly-G、poly-C 和 poly-A 等基团, 也导致测序和序列分析困难<sup>[57]</sup>。最后, 由于

在进化过程中 ITS 承受的选择压力小,因此,发生突变的概率大大增加,其片段的插入、缺失和替换是常见的,这些有利于获得变异信息来分析物种的遗传多样性,但同时也不可避免地增大了分析的误差<sup>[58]</sup>。另外,现在大多数研究工作还只是初步的尝试,许多研究在样品的取样数量和代表性方面也存在不同程度的缺陷,如我国一些特有的优良药物植物种质资源青蒿 *Artemisia annua* L.、药用菟丝子等都还未引起人们广泛关注。因此,不管是 ITS 技术方面还是研究内容方面,都有待进一步深入和完善。

3.2 ITS 分析应用展望:尽管 ITS 序列分析存在着上述缺陷和不足,在许多方面都还有待改进,但不可否认其在药用植物研究中已取得了一系列成果。近年来又有较多学者将该技术应用于药用植物致病菌和内生菌的检测中<sup>[59,60]</sup>,为 ITS 序列分析在药用植物研究领域又开辟了新的思路和方向;并且,ITS 序列分析技术与其他分子标记技术的相互结合,也弥补了 ITS 序列测定和位点特异性 PCR 鉴别的不足<sup>[37]</sup>,尤其是 Kress 等<sup>[61]</sup>将 nrITS 列为植物条形码候选片段,更是肯定了其在植物研究中的重要性,也为其发展和应用注入了新的活力。相信现代分子生物学技术的迅速发展,试验技术的突破及药用植物 DNA 序列数据的不断积累,必将促进 ITS 序列分析在药用植物研究领域得到更广泛的应用。

#### 参考文献:

- [1] 陈士林,魏建和,黄林芳,等. 中药材野生抚育的理论与实践探讨[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(12): 1123-1126.
- [2] Bhattacharyya R, Bhattacharya S, Chaudhuri S. Conservation and documentation of the medicinal plant resources of India [J]. *Biodiv Conserv*, 2006, 15: 2705-2517.
- [3] 蒋桂华,马逾英,侯嘉,等. 川芎种质资源的调查收集与保存研究[J]. 中草药, 2008, 39(4): 601-604.
- [4] Elameen A, Klemsdal S S, Dragland S, et al. Genetic diversity in a germplasm collection of roseroot (*Rhodiola rosea*) in Norway studied by AFLP [J]. *Biochem System Ecol*, 2008, 36(9): 706-715.
- [5] Irhad S, Singh J, Kakkar P, et al. Molecular characterization of *Desmodium* species-an important ingredient of 'Dashmoola' by RAPD analysis [J]. *Fitoterapia*, 2009, 80(2): 115-118.
- [6] Wang H Z, Feng S G, Lu J J, et al. Phylogenetic study and molecular identification of 31 *Dendrobium* species using inter-simple sequence repeat (ISSR) markers [J]. *Sci Horticult*, 2009, 122(3): 440-447.
- [7] Baraket G, Saddoud O, Chatti K, et al. Sequence analysis of the internal transcribed spacers (ITSs) region of the nuclear ribosomal DNA (nrDNA) in fig cultivars (*Ficus carica* L.) [J]. *Sci Horticult*, 2009, 120(1): 34-40.
- [8] Ainoune M L, Bayer R. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Genome*, 1997, 40(5): 730-743.
- [9] Yang Z Y, Chao Z, Huo K K, et al. ITS sequence analysis used for molecular identification of the *Bupleurum* species from northwestern China [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(6): 416-423.
- [10] 张宏意,石祥刚. 不同产地何首乌的 ITS 序列研究[J]. 中草药, 2007, 38(6): 911-914.
- [11] Yamaji H, Fukuda T, Yokoyama J, et al. Reticulate evolution and phylogeography in *Asarum* sect. *Asiarum* (Anisotolochiaceae) documented in internal transcribed spacer sequences (ITS) of nuclear ribosomal [J]. *Mole Phylogen Evol*, 2007, 44(2): 863-884.
- [12] 蒋玲艳,郭志刚,王翀,等. 中国不同地区绞股蓝 ITS 序列分析[J]. 中草药, 2009, 40(7): 1123-1127.
- [13] 赵海光,周建建,曹珊珊,等. 基 ITS 和 *trnL-F* 序列碱基差异的繁缕与其近缘关系分析[J]. 植物资源与环境学报, 2009, 18(1): 1-5.
- [14] 郝剑瑾,程舟,梁洪卉,等. 基于 rDNA ITS 序列探讨我国冬虫夏草的遗传分化及分布格局[J]. 中草药, 2009, 40(1): 112-116.
- [15] García-Martínez J, Acinas S G, Anton A I, et al. Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity [J]. *Microbial Methods*, 1999, 36: 55-64.
- [16] 刘忠,汪小全,陈之端. 五味子科的系统发育:核糖体 DNA ITS 区序列证据[J]. 植物学报, 2004, 42(7): 758-761.
- [17] Elder J R, Turner B J. Concetred evolution of repetitive DNA sequence in eukaryotes [J]. *Quart Rev Biol*, 1995, 70: 297-319.
- [18] Schmidt G J, Schilling E E. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data [J]. *Amer J Bot*, 2000, 87: 716-726.
- [19] Vizintin L, Javomik B, Bohanec B. Genetic characterization of selected *Trifolium* species as revealed by nuclear DNA content and ITS rDNA region analysis [J]. *Plant Sci*, 2006, 170(4): 859-866.
- [20] 张富民,葛颂,陈文俐. 紫乌头复合体 nrDNA 的 ITS 序列与系统发育分析[J]. 植物分类学报, 2003, 41(3): 220-228.
- [21] Luo Y, Zhang F M, Yang Q E. Phylogeny of *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae) inferred from ITS sequences [J]. *Plant System Evol*, 2005, 252: 11-25.
- [22] 罗艳,杨亲二. 川乌与草乌的 ITS 序列分析[J]. 中国药杂志, 2008, 43(11): 820-823.
- [23] Weiblen G D. Phylogenetic relationships of functionally dioecious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology [J]. *Am J Bot*, 2000, 87(9): 1342-1357.
- [24] 诸葛强,丁雨龙,续晨,等. 广义青蒿竹属 (*Arundinaria*) 核糖体 DNA ITS 序列及亲缘关系研究[J]. 遗传学报, 2004, 31(4): 349-356.
- [25] Zhuge Q, Ding Y L, Xu C, et al. A preliminary analysis of phylogenetic relationships of *Arundinaria* and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (*trnL-F* intergenic spacer) [J]. *J Forest Res*, 2005, 16(1): 5-8.
- [26] 薛华杰,闫茂华,陆长梅,等. 基于 ITS 序列的东亚当归属植物的分类学研究[J]. 植物分类学报, 2007, 45(6): 783-795.
- [27] 刘春生,王朋义,陈自泓,等. 紫花前胡分类位置修订的分子基础研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(18): 1488-1490.
- [28] 赵国平,新关松,石川隆二,等. 中日当归属药用植物 ITS 序列分析[J]. 中草药, 2006, 37(7): 1072-1076.
- [29] 余永邦,秦民坚,梁之桃,等. 不同产区太子参的 rDNA ITS 区序列的比较[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(4): 1-5.
- [30] 陶晓瑜,桂先群,傅承新,等. 明党参和川明参种间遗传分化和系统关系的分子标记和 ITS 序列分析[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2008, 34(5): 473-481.
- [31] Wen J, Zimmer E. Phyogeny and biogeograph of *Panax* L. (the Ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Mol Phylogen Evol*, 1996, 6: 167-177.
- [32] 刘艳玲,徐立铭,倪学明,等. 基于 ITS 序列探讨睡莲属植物的系统发育[J]. 武汉大学学报:理学版, 2005a, 51(2): 258-262.
- [33] 刘艳玲,徐立铭,倪学明,等. 睡莲科的系统发育:核糖体 DNA ITS 区序列证据[J]. 植物分类学报, 2005b, 43(1): 22-30.
- [34] 高建平,王彦涵,乔春峰,等. 中药南五味子及其混淆品绿五味子果实的 ITS 序列分析[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(8): 706-710.
- [35] 徐红,李晓波,丁小余,等. 中药黄草石斛 rDNA ITS 序列分析[J]. 药学报, 2001, 36(10): 777-783.
- [36] 丁小余,王峰涛,徐红,等. 枫斗类石斛 rDNA ITS 区的全序列数据库及其序列分析鉴别[J]. 药学报, 2002, 37(7): 567-573.
- [37] 张婷,徐路珊,王峰涛,等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 药学报, 2005, 40(8): 728-733.
- [38] Xu H, Wang Z T, Ding X Y, et al. Differentiation of *Dendrobium* species used as "Huangcao Shihu" by rDNA ITS sequence analysis [J]. *Planta Med*, 2006, 72(1): 89-92.
- [39] 谢晖,晁志,霍克克,等. 9 种柴胡属植物的核糖体 ITS 序列及其在药材鉴定中的应用[J]. 南方医科大学学报, 2006, 26(10): 1460-1463.
- [40] Wang Z Q, He X J, Zhou S D, et al. Phylogenetic inference of the genus *Bupleurum* (Apiaceae) in Hengduan Mountains

- based on chromosome counts and nuclear ribosomal DNA ITS sequences [J]. *J System Evol*, 2008, 46(2): 142-154.
- [41] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D, *et al*. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae [J]. *Molec Ecol Resour*, 2008, 8, 480-490.
- [42] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, *et al*. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2008, 105: 2923-2928.
- [43] 宁淑萍, 颜海飞, 郝刚, 等. 植物 DNA 条形码研究进展 [J]. *生物多样性*, 2008, 16(5): 417-425.
- [44] Xue H G, Zhou S D, Deng X Y, *et al*. Molecular authentication of the traditional Chinese medicinal plant *Euphorbia humifusa* and *E. maculate* [J]. *Planta Med*, 2007, 73(1): 91-93.
- [45] 丁平, 方琴, 巴戟天与常见混伪品的 rDNA-ITS 序列分析及其分子鉴定 [J]. *中草药*, 2005, 36(6): 114-117.
- [46] 汪红, 王强. 丹参及鼠尾草属植物的 rDNA ITS 序列分析 [J]. *中草药*, 2005, 36(9): 105-109.
- [47] 陶刚, 刘涛, 朱英, 等. 贵州中药材钩藤属植物的分子鉴定 [J]. *中药材*, 2008, 31(6): 825-828.
- [48] Artyukova E V, Gontcharov A A, Kozyrenko M M, *et al*. Phylogenetic relationships of the far Eastern Araliaceae inferred from ITS sequences of nuclear rDNA [J]. *Russ J Gene*, 2005, 41(6): 649-658.
- [49] Zeng J, Zhang L, Fan X, *et al*. Phylogenetic analysis of *Kengyilia* species based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences [J]. *Biol Plant*, 2008, 52(2): 231-236.
- [50] Sudheer Pamidimarri D V N, Chattopadhyay B, Reddy M P. Genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence [J]. *Mole Biol Rep*, 2009, 36(7): 1929-1935.
- [51] Bekele E, Geleta M, Dagne K, *et al*. Molecular phylogeny of genus *Guizotia* (Asteraceae) using DNA sequences derived from ITS [J]. *Gene Resour Crop Evol*, 2007, 54(7): 1419-1427.
- [52] Sun F J, Downie S R, Hartman R L. An ITS-based phylogenetic analysis of the perennial, endemic Apiaceae subfamily Apioideae of Western North America [J]. *System Bot*, 2004, 29: 419-431.
- [53] 石志刚, 安巍, 焦恩宁, 等. 基于 nrDNA ITS 序列的 18 份宁夏枸杞资源的遗传多样性 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(24): 10379-10380.
- [54] Tsai C C, Peng C I, Huang S C, *et al*. Determination of the genetic relationship of *Dendrobium* species (Orchidaceae) in Taiwan based on the sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA [J]. *Sci Hort*, 2004, 101(3): 315-325.
- [55] Singh A, Devarumth R M, Rama Rao S, *et al*. Assessment of genetic diversity, and phylogenetic relationships based on ribosomal DNA repeat unit length variation and Internal Transcribed Spacer (ITS) sequences in chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars and its wild species [J]. *Gene Resour Crop Evol*, 2008, 55(1): 65-79.
- [56] Kress W J, Erickson D L. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): 1-10.
- [57] Sass C, Little D P, Stevenson D W, *et al*. DNA barcoding in the cycadales: testing the potential of proposed barcoding markers for species identification of cycads [J]. *PLoS One*, 2007, 2(11): e1154.
- [58] 徐田军, 刘楚吾, 刘丽, 等. 基因间隔序列 (ITS) 在水产动物种质鉴定和遗传多样性分析中的应用 [J]. *湛江海洋大学学报*, 2006, 26(1): 84-88.
- [59] 朱桂宁, 蔡健和, 胡春锦, 等. 广西山药炭疽病原菌的鉴定与 ITS 序列分析 [J]. *植物病理学报*, 2007, 37(6): 572-577.
- [60] 李璐滨, 胡陶, 唐征, 等. 我国部分兰属植物菌根真菌 rDNA ITS 序列分析 [J]. *林业科学*, 2008, 44(2): 160-164.
- [61] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, *et al*. Use of DNA barcodes to identify flowering plants [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102(23): 8369-8374.

## 热熔压敏胶应用于中药贴剂的研究进展

王承潇<sup>1</sup>, 汤秀珍<sup>2\*</sup>, 沈平孃<sup>2</sup>, 韩伟<sup>1\*</sup>

(1. 华东理工大学 中药现代化工程中心, 上海 200237; 2. 国家中药制药工程技术研究中心, 上海 201203)

**摘要:** 热熔压敏胶是一种运用广泛的胶粘剂, 以热熔压敏胶作为基质的贴剂成为近年经皮给药系统研究热点。我国已把热熔胶粘剂的研究做为“十一五”发展的重点。从热熔胶贴剂的基质处方研究和贴剂的制剂评价两方面入手, 对热熔胶在中药贴剂中的应用进展进行全面和系统的论述, 重点探讨了当前热熔胶在中药贴剂应用方面存在的若干问题, 并对今后热熔胶贴剂的研发方向做出了展望。

**关键词:** 热熔压敏胶; 中药; 贴剂

中图分类号: R283.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)03-0496-04

## Advances in studies on hot melt pressure sensitive adhesive applied in patches of Chinese materia medica

WANG Cheng-xiao<sup>1</sup>, TANG Xiur-zhen<sup>2</sup>, SHEN Ping-niang<sup>2</sup>, HAN Wei<sup>1</sup>

(1. Engineering Center for Traditional Chinese Medicine Modernization, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. National Engineering Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Key words:** hot melt pressure sensitive adhesive; Chinese materia medica; patch

收稿日期: 2009-08-23

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划课题 (2008BAI53B075)

\*通讯作者: 汤秀珍, 女, 高级工程师, 研究方向为中药新型给药系统。Tel: (021) 50805522-4025 Fax: (021) 38953204  
E-mail: xztang@nercmcm.com