

不同产地西洋参种质遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析

魏晓雨, 田义新*, 赵智灵, 孙福仁

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要:目的 采用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术对我国 10 个产地的西洋参 *Panax quinquefolium* 的遗传多样性进行分析。方法 以人参及加拿大西洋参为对照, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 选取 13 个 RAPD 随机引物及 12 个 ISSR 引物对样品进行 PCR 扩增, 根据条带数目, 应用 NTSYS-pc2.10e 软件采用 UPGMA 方法进行聚类分析。结果 13 条 RAPD 引物共扩增出 97 条清晰条带, 多态性条带 81, 多态性百分率为 85.51%; 12 条 ISSR 引物共扩增出 99 条清晰条带, 多态性条带 64, 多态性百分率为 64.65%; 通过聚类分析, RAPD 及 RAPD+ISSR 综合将样品聚为 4 大类; ISSR 将样品聚为 2 大类。结论 RAPD 和 ISSR 标记构建的样品聚类树状图在分类上稍有差异, 但总体趋势一致。人参与西洋参被明显区分开来; 在 ISSR 上, 吉林兴参镇与北岗镇西洋参与人参聚为一大类; 在生长环境及种植条件影响下, 东北部分产地西洋参有加拿大西洋参相比在遗传多样性上有所改变。

关键词: 西洋参; RAPD; ISSR; 聚类分析; 遗传多样性

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)21-3153-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.021

RAPD and ISSR analyses of genetic diversity of American ginseng germplasm from different habitats in China

WEI Xiao-yu, TIAN Yi-xin, ZHAO Zhi-ling, SUN Fu-ren

College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To analyze the genetic diversity of American ginseng (*Panax quinquefolium*) produced in 10 regions of China by using RAPD and ISSR. **Methods** Genomic DNA was extracted by CTAB and the following two kinds of ginseng were used as controls which are ginseng (*P. ginseng*) produced in China and American ginseng produced in Canada. Thirteen RAPD primers and 12 ISSR primers were selected to perform PCR amplification. According to the band number, NTSYS-pc2.10e software was applied to the cluster analysis using UPGMA. **Results** Thirteen RAPD primers had amplified 97 clear bands, 81 polymorphic bands, and the percentage of polymorphism was 85.51%; Twelve ISSR primers had amplified 99 clear bands, 64 polymorphic bands, and the percentage of polymorphism was 64.65%; Through cluster analysis, the samples were clustered into four categories by RAPD and RAPD + ISSR and two categories by ISSR. **Conclusion** RAPD and ISSR markers are used to construct a dendrogram of samples, which is slightly different in classification, but the overall trend is consistent. Ginseng and American ginseng are clear distinction. On the ISSR, American ginseng from Xingshen Town and Beigang Town in Jilin province are gathered for a major categories with ginseng. In the growing environment and planting conditions, the genetic diversity of American ginseng has been changed in the part of northeast China compared with Canada.

Key words: American ginseng; RAPD; ISSR; cluster analysis; genetic diversity

西洋参原植物为五加科植物西洋参 *Panax quinquefolium* L., 以干燥根入药, 有多种功能^[1]; 原产于北美洲^[2], 中国后引种^[1], 并在 1980 年后开始大规模生产。我国西洋参栽培区主要分为东北、华北、西北^[3]。其中, 东北地区也是我国人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer 的主产区, 二者为同科同属植

物, 因此笔者认为西洋参在长时间环境改变及与人参相近种植的情况下, 可能与原产地西洋参在遗传多样性及亲缘关系上出现差别, 因此对我国引种的西洋参种质资源进行鉴定研究, 对更合理地开发和利用这一药材具有重要意义。

RAPD 是 1990 年美国的 Williams 与 Welsh 2

收稿日期: 2014-04-12

基金项目: 吉林省科技支撑计划重点项目 (20110905)

作者简介: 魏晓雨 (1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药生物技术。Tel: 13624473194 E-mail: weixiaoyu1547@163.com

*通信作者 田义新, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事中药材栽培。E-mail: y.x.tian2003@163.com

个研究小组同时提出的一种分子标记技术^[4-5]；ISSR则是Zietkeiwicz等^[6]于1994年发展起来的一种分子标记。该2种技术相结合已经成功地应用于虎杖^[7]、大麻^[8]、苦豆子^[9]、石斛^[10]等药用植物的亲缘关系和遗传多样性分析。目前，已有采用RAPD法对黄果及红果人参、西洋参的种源关系进行分析^[11]，采用ISSR法对人参属植物遗传关系进行研究^[12]，但是2种分子标记结合在西洋参种质资源遗传多样性的研究中还未见报道。因此，为了揭示西洋参在引种30

年后遗传多样性的变化，本研究利用RAPD和ISSR标记对国内外西洋参的遗传多样性及亲缘关系进行鉴定，为综合利用西洋参资源提供科学依据。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品为2013年8~9月收集的参龄4年的人参 *Panax ginseng* C. A. Meyer、西洋参 *Panax quinquefolium* L. 的根，所有样品均由吉林农业大学中药材学院田义新教授鉴定，具体信息见表1。

表1 种质资源的收集

Table 1 Germplasm resources collection

编号	样品	产地	缩写	编号	样品	产地	缩写
X1	西洋参 <i>Panax quinquefolium</i>	加拿大 BC 省	CABC (西)	X9	西洋参	吉林集安	JA (西)
X2	西洋参	加拿大 安省 01	CA01 (西)	X10	西洋参	吉林靖宇	JY (西)
X3	西洋参	加拿大 安省 02	CA02 (西)	X11	西洋参	吉林珲春	HC (西)
X4	西洋参	北京怀柔	BJ (西)	X12	西洋参	吉林兴参镇	XCZ (西)
X5	西洋参	山东	SD (西)	X13	西洋参	吉林北岗镇	BG (西)
X6	西洋参	吉林长白县	CBX (西)	R1	人参 <i>Panax ginseng</i>	吉林长白县	CBX (人)
X7	西洋参	吉林长春	CC (西)	R2	人参	吉林抚松	FS (人)
X8	西洋参	吉林通化	TH (西)	R3	人参	吉林集安	JA (人)

1.2 仪器及试剂

TC—XP 型 PCR 扩增仪 (杭州博日科技有限公司); 数显恒温水浴锅 (上海申胜生物技术有限公司); TGL—16C 型高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); BIS910 凝胶成像系统 (北京东胜创新生物技术有限公司); DYY—2D 电泳仪电源、DYCP—31DN 电泳槽 (北京六一仪器厂); 超微量紫外可见分光光度计 (北京百泰克生物技术有限公司)。

2×Power Taq PCR MasterMix (北京百泰克生物技术有限公司); 100 bp DNA Maker (北京鼎国昌盛生物技术有限公司); RAPD 随机引物 (北京六合华大基因科技股份有限公司); ISSR 引物 (苏州金唯智生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 提取及质量检测

采用 CTAB 法^[13]提取基因组 DNA。

使用超微量紫外可见分光光度计测定 A_{260}/A_{280} 及 A_{260}/A_{230} 的紫外吸收值比值，检测 DNA 样品的纯度与浓度。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测质量，置于 -20℃ 保存备用。

2.2 PCR 扩增及电泳检测

2.2.1 RAPD-PCR 扩增反应体系 20 μL 2×Power

Taq PCR MasterMix 9 μL (2 mmol/L Mg^{2+}); 引物 1.5 μL (10 mmol/L); DNA 模板 1 μL (40 ng/μL); ddH₂O 补足 20 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 1 min, 38℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环; 72℃ 延伸 7 min。4℃ 保存。

2.2.2 ISSR-PCR 扩增反应体系 20 μL 2×Power Taq PCR MasterMix 9 μL (2 mmol/L Mg^{2+}); 引物 1 μL (10 mmol/L); DNA 模板 1 μL (40 ng/μL); ddH₂O 补足 20 μL。

2.2.3 PCR 扩增程序 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 1 min, 变性 1 min (退火温度根据各个引物), 72℃ 延伸 1 min 30 s, 38 个循环; 72℃ 延伸 10 min。4℃ 保存。

2.2.4 电泳检测 扩增后的产物使用含有 0.5 μg/mL EB 的 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离，电压 100 V，电泳 1 h，使用凝胶成像系统拍照，保存。

2.3 数据处理与分析

对所成图像的电泳条带进行人工读带，以 100 bp DNA Maker 为标准，对同一分子标记处有条带的记为“1”，无则为“0”，形成 0/1 矩阵。用 NTSYS-pc2.10e 软件采用 UPGMA 方法进行聚类分析，构建聚类图；用软件 POPGEN32 对样品进行遗传参数分析。

3 结果与分析

3.1 引物扩增结果

根据相关文献报道^[13]及随机选取的 30 条引物中共筛选出多态性好, 条带清晰的 13 条引物。且 13 条 RAPD 引物共扩增出 97 条带, 多态性条带 81 条, 多态性为 83.51%, 扩增条带的大小在 200~2 000 bp。其中引物 P3 扩增的条带最多, 为 11 条; 引物 P1 扩增的条带最少, 为 3 条; 引物 P4 与 P5 的多态性最高, 为 100%; 引物 P7 多态性最底, 为 60%。见表 2。引物扩增图见图 1。

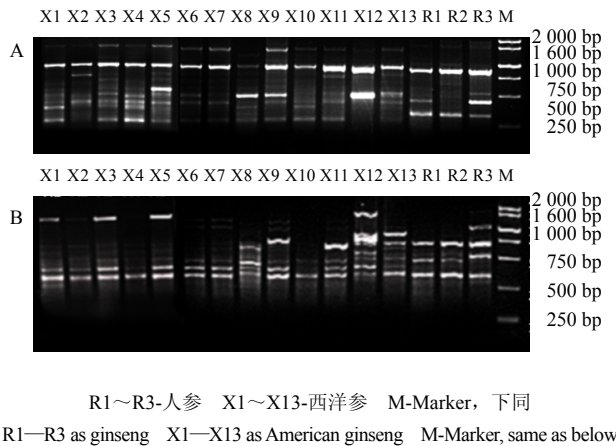


图 1 RAPD 引物 P3 (A) 和 P10 (B) 的扩增电泳图
Fig. 1 Amplification electrophorogram of RAPD Primers P3 (A) and P10 (B)

随机选取 20 条 ISSR 引物共筛选出 12 条多态性好, 条带清晰的引物。且 12 条 ISSR 引物共扩增出 99 条带, 多态性条带 64 条, 多态性为 64.65%, 扩增条带的大小在 200~2 000 bp。其中引物 UBC873 扩增的条带最多, 为 15 条; 引物 UBC835 扩增的条带最少, 为 4 条; 引物 UBC842 的多态性最高, 为 100%; 引物 UBC822 多态性最底, 为 20%。引物 UBC815 和 UBC73 扩增后的电泳图见图 2, 数据见表 2。

3.2 聚类分析

3.2.1 样品间遗传多样性的 RAPD 分析 通过对 13 个引物扩增出的 97 条 DNA 片段的遗传相似系数(G_S)

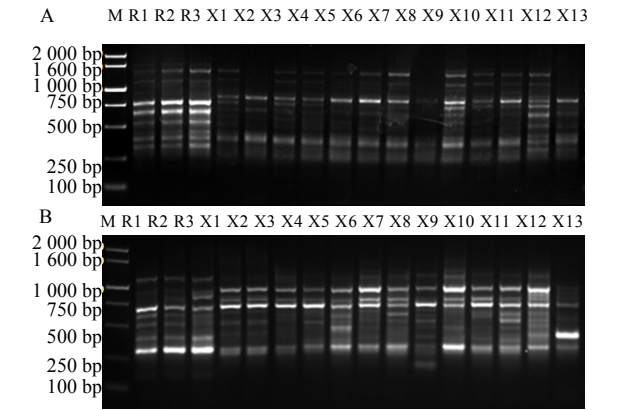


图 2 ISSR 引物 UBC815 (A)和 UBC873 (B) 的扩增电泳图
Fig. 2 Amplification electrophorogram of ISSR Primers UBC815 (A) and UBC873 (B)

表 2 RAPD 引物及 ISSR 引物的扩增结果

Table 2 Amplification results of RAPD and ISSR primers

引物	RAPD				引物	ISSR				
	序列	总条带数	多态性条带数	多态性 / %		序列	总条带数	多态性条带数	多态性 / %	退火温度 / °C
P1	5'-CAGGCCCTTC-3'	3	2	66.67	UBC815	(CT) ₈ G	11	9	81.81	48.0
P2	5'-TGCGCCCTTC-3'	8	7	87.50	UBC818	(CA) ₈ G	7	5	71.42	57.0
P3	5'-GTCCACACGG-3'	11	10	90.90	UBC822	(TC) ₈ A	5	1	20.00	49.0
P4	5'-GTCCCGACGA-3'	10	10	100.00	UBC823	(TC) ₈ C	6	5	83.33	50.0
P5	5'-AGCGCCATTG-3'	10	10	100.00	UBC824	(TC) ₈ G	6	2	33.33	50.0
P6	5'-CTGAGACGGA-3'	7	5	71.42	UBC826	(AC) ₈ C	7	3	42.86	51.5
P7	5'-GGCTCATGTG-3'	5	3	60.00	UBC835	(AG) ₈ YC	4	2	50.00	57.0
P8	5'-GGCTGCGACA-3'	7	6	85.71	UBC842	(GA) ₈ YG	10	10	100.00	51.5
P9	5'-CCCGCTACAC-3'	7	5	71.42	UBC844	(CT) ₈ RC	10	6	60.00	48.0
P10	5'-CCCAGCTGTG-3'	9	8	88.89	UBC856	(AC) ₈ YA	11	6	54.55	51.0
P11	5'-GACAGGAGGT-3'	8	5	62.50	UBC861	(ACC) ₆	7	3	42.86	58.0
P12	5'-AGCCGTGGAA-3'	6	5	83.33	UBC873	(GACA) ₄	15	12	80.00	51.5
P13	5'-CATTCGAGCC-3'	6	5	83.33	Y=(C, T; R=(A, G)					
总计		97	81		总计		99	64		
平均值		7.46	6.23	83.51	平均值		8.25	5.33	64.65	

进行计算,得出16个样品间 G_S 在 0.536 1~0.948 5。13个西洋参种质两两间 G_S 值在 0.577 3~0.948 5,其中加拿大 BC 省与北京怀柔的 G_S 值最大,为 0.948 5,说明二者之间的亲缘关系最近,遗传相似度最高;通化与兴参镇的 G_S 最小,为 0.577 3,说明二者间的遗传距离最远,遗传相似度最低。

根据 RAPD 标记计算的遗传相似系数矩阵,按 UPGMA 法建立样品间的遗传关系聚类树状图,见图 3-A。以遗传系数 0.682 3 为分类点,可以将 16 个种质资源划分为 4 大类群。

第 I 类群均为人参样品,来源产地包括吉林长白、抚松及集安。

第 II~IV 类群均为西洋参样品,第 II 类群来源只有 1 个产地,即吉林通化。

第 III 类群样品来源包括吉林兴参镇和北岗镇 2 地。

第 IV 类群包括 10 个产地,该类群在遗传系数 0.825 6 处,又可分为 2 个亚种群:第 i 类包括加拿大 BC 省、安省 01、安省 02、北京怀柔及山东文登的西洋参样品;第 ii 类包括吉林长白、长春、集安、靖宇及琿春的西洋参样品。

3.2.2 样品间遗传多样性的 ISSR 分析 通过对 12 个引物扩增出的 99 条 DNA 片段的遗传相似系数进行计算,得出 16 个样品间 G_S 在 0.505 1~1.000 0。13 个产地西洋参种质两两间 G_S 值在 0.555 6~1.000 0,其中吉林琿春与吉林兴参镇的 G_S 值最大,为 1.000 0,说明二者之间的亲缘关系最近,遗传相似度最高;吉林琿春、兴参镇、北岗镇 3 个产地西洋参与加拿大安省 01、02,北京怀柔,山东文登及吉林长白县

4 个产地西洋参两两之间 G_S 值最小,为 0.555 6,说明两两间的遗传距离最远,遗传相似度最低。

根据 ISSR 标记计算的遗传相似系数矩阵,按 UPGMA 法建立样品间的遗传关系聚类树状图(图 3-B)。以遗传系数 0.682 3 为分类点,可以将 16 个种质资源划分为 2 大类群。

第 I 类群包括人参及吉林北岗镇、兴参镇西洋参。

第 II 类群包括剩下的 11 个产地的西洋参,该类群在遗传系数为 0.865 6 处,同样又可分为 3 个亚种群:第 i 类包括加拿大 BC 省、安省 01、安省 02、北京怀柔的西洋参样品,与 RAPD 结果不同的是山东的西洋参样品被归为下一类;第 ii 类包括山东文登、吉林长白、长春、集安、靖宇及琿春的西洋参样品;第 iii 类只有吉林通化西洋参样品。

3.2.3 整合 RAPD 与 ISSR 对样品的聚类分析 通过将 RAPD 与 ISSR 的 0/1 矩阵结合,按 UPGMA 法建立样品间的遗传关系聚类树状图。以相似系数 0.682 3 为分类点,可以将 16 个种质资源划分为 4 大类群,见图 3-C。

第 I 类群为人参组,来源同前。

第 II~IV 类群均为西洋参样品,第 II 类群包括吉林兴参镇及北岗镇的西洋参样品。

第 III 类群只有吉林通化的西洋参样品。

第 IV 类群包括 10 个产地种质,在遗传系数为 0.825 6 处,又将其分为 2 个亚种群:第 i 类包括加拿大 BC 省、安省 01、安省 02、北京怀柔及山东文登西洋参样品;第 ii 类包括吉林长白、长春、集安、靖宇及琿春西洋参样品。

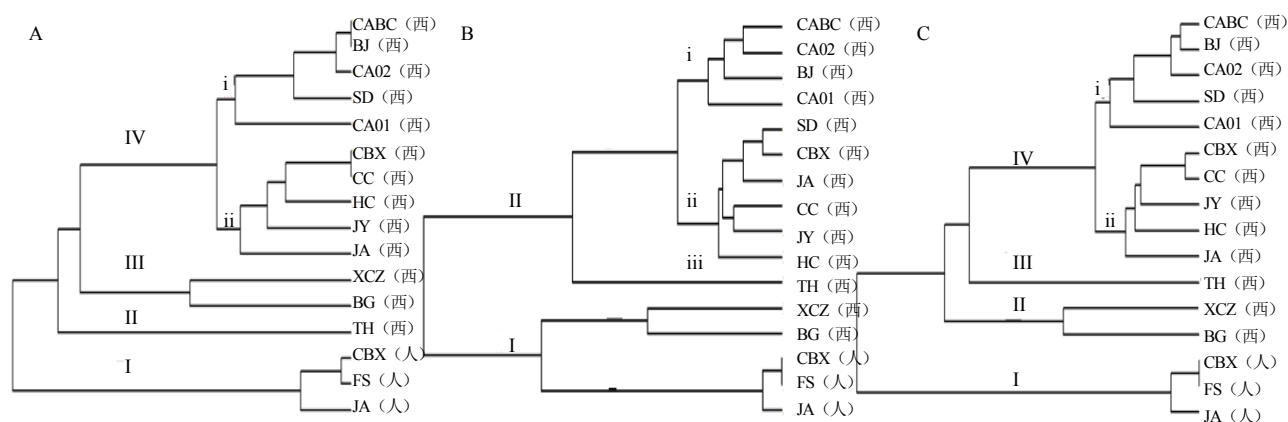


图 3 RAPD (A)、ISSR (B)、RAPD+ISSR (C) 标记的树状聚类图

Fig. 3 Phylogenetic tree based on RAPD (A), ISSR (B), and RAPD + ISSR (C) markers

4 讨论

RAPD 和 ISSR 分子标记技术以其高度多样性在物种间遗传多样性研究已经得到了广泛的应用。本研究利用 13 条 RAPD 引物和 12 条 ISSR 引物分别对西洋参种质资源进行了总 DNA 的基因扩增,且 2 种分子标记技术均能扩增出清晰、稳定的条带。但 2 种分子标记技术所表现出的物种的遗传信息不尽相同,这反映了西洋参种质存在丰富的遗传多样性。从研究结果可以看出,RAPD 和 ISSR 2 种标记方法获得的每条引物多态性条带的平均值分别为 6.23 条和 5.33 条,多态性条带百分率平均值分别为 83.51%和 64.61%。这表明 2 种标记技术均能得到自己的多态性条带,但是所呈现的多态性和检测水平各不相同,说明结合 2 种标记技术会使实验结果更加全面和客观^[14]。

本研究中样品聚类结果相似,但又不完全相同。在大类分析上:RAPD 及 RAPD+ISSR 综合将 16 个产地的人参及西洋参样品分为 4 大类,其中,人参与西洋参被明显地区分开来,这与杨天天^[15]采用 SSR 与 RAPD 2 种标记法分析的结果相一致。从图 3 可以看出,在亚种分类上,RAPD 分子标记及 RAPD+ISSR 综合标记法将第 IV 大类中山东的西洋参与 3 个原产地及北京的归为一类。而在 ISSR 标记上,将 16 个样品分为 2 大类,其中在第 II 大类中,山东与吉林省 5 个产地的西洋参样品归为一类(图 3)。造成这种现象的原因可能是与 2 种标记方法所检测到的基因位点不同造成的,也可能是由于 2 种方法使用的引物不同造成的,引物的不同,所检测到的物种的多态性不同,这也就导致了物种间遗传距离的变化^[16-19]。

每一物种需具有一定的遗传多样性才能适应自然界的各种环境,才能继续发展下去^[20]。从 3 种标记方法聚类结果可以看出,吉林省兴参镇与北岗镇的西洋参聚为一类,且在 ISSR 中与 3 个产地人参在遗传系数为 0.858 8 聚为一类,在遗传距离上相比于其他西洋参与人参相近,同时 2 个西洋参产地均为人参与西洋参共同种植的基地,这说明在 ISSR 标记所检测的该基因位点上,2 个产地的西洋参与人参基因排序相近,使 2 个产地的西洋参可能在长时间与人参共同种植的影响下,形成了与人参相近的遗传多样性,使其与原产地的西洋参相比出现了遗传上的差别,导致种质有所变化。通化西洋参可能也是由于长时间生长的环境与原产地环境不同,

形成了独自的遗传特点。从图 3 中还可看出,我国吉林省的西洋参参与原产地西洋参在遗传距离上与北京、山东两地相比,相距较远,这可能是在各自种植环境的影响下,丰富了其遗传基础,使其保持较大的变异度和丰富的多样性。

西洋参是我国常用的珍贵药材,野生的西洋参资源正在逐渐枯竭,我国西洋参均属于栽培种,已成为我国东北三省的支柱性产业。目前,许多研究者^[21-23]对西洋参的有效成分做了系统的鉴定,通过其有效的药效成分来确定其种质的变化,为了更加全面分析种质资源的变化,也应该从其遗传基础方面对其鉴定,因此通过分子水平的遗传多样性分析,揭示西洋参品种的亲缘关系,为西洋参种质资源的引种栽培及育种奠定一定的理论基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [2] 王林娣. 西洋参的历史溯源以及种类特征 [J]. 中成药, 1999, 21(2): 44-45.
- [3] 刘铁城. 中国西洋参 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1995.
- [4] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucl Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [5] Welsh J, Honeycutt R J, McClelland M, *et al.* Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR) [J]. *Theor Appl Genet*, 1991, 82: 473-476.
- [6] Zietkiewica E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplified [J]. *Genomics*, 1994, 20(2): 176-183.
- [7] 马云桐, 万德光, 陈新, 等. 虎杖种质资源的分子标记研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 395-399.
- [8] 黄艳梅, 杨志军, 李娜, 等. RAPD 和 ISSR 分子标记检测大麻的遗传多样性初探 [J]. 中国法医学杂志, 2013, 28(2): 100-103.
- [9] 卢家仕, 卜朝阳, 吕维莉, 等. 不同产地石斛属种质资源的 ISSR 遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 96-100.
- [10] 阳翠, 刘萍, 刘姣蓉, 等. 苦豆子 ISSR 标记的遗传多样性分析 [J]. 中草药, 2013, 44(10): 1323-1327.
- [11] 任跃英, 高巍, 郭影, 等. 黄果及红果人参、西洋参基因组的 RAPD 分子标记研究 [J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27(1): 39-42.
- [12] 许永华, 张爱华, 金慧, 等. 人参种源遗传关系的

- ISSR 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1164-1167.
- [13] 朱苏文, 刘伟. 石斛干品基因组 DNA 的提取与 RAPD 分析 [J]. 激光生物学报, 2005, 14(3): 205-207.
- [14] 陈涛, 杨祥燕, 蔡元保, 等. 8 份剑麻种质亲缘关系的 ISSR 和 RAPD 分析 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(21): 86-91.
- [15] 杨天天. 栽培人参和西洋参种质资源遗传多样性研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [16] Fang D Q, Roose M L. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 408-417.
- [17] Kojima T, Nagaoka T, Noda K, *et al*. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 37-45.
- [18] 安泽伟, 孙爱花, 程汉, 等. 用 RAPD 和 ISSR 检测的橡胶树野生种质和栽培品种的遗传多样性 [J]. 热带亚热带植物学报, 2005, 13(3): 246-252.
- [19] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, *et al*. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers [J]. *Sci Hort*, 2008, 116: 240-247.
- [20] Avise J C, Hamrick J L. *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* [M]. New York: Chapman & Hall, 1996.
- [21] 陈军辉, 谢明勇, 章志明, 等. 12 种西洋参中总皂苷及人参皂苷 Rb₁ 的测定比较 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(9): 845-847.
- [22] 苏华丽, 谭梅英, 罗文汇, 等. 不同产地西洋参人参总皂苷含量比较 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(7): 56-58.
- [23] 曲正义, 刘宏群, 赵景辉, 等. 吉林省不同产地西洋参中人参总皂苷含量的测定 [J]. 天津药学, 2012, 24(3): 10-11.