

基于 ITS2 的竹节参及其近缘物种和混伪品鉴定评估

陈镜安¹, 杨璐², 李荣钊¹, 张家明³, 胡敏¹, 刘镛^{1,4*}

1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808

2. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

3. 广东医科大学第二临床医学院, 广东 东莞 523808

4. 广东医科大学 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023

摘要: 目的 对竹节参及其近缘物种和混伪品进行分子鉴定, 为竹节参现代化鉴定提供科学依据和保证临床疗效与用药准确性。方法 对竹节参样品进行 ITS2 基因片段扩增和正向测序, 并从 GenBank 数据库下载竹节参、近缘物种和混伪品的 ITS2 序列, 通过 ITS2 database 剪切最终共获得 24 个物种 102 条序列, 使用 DAMBE 软件进行序列替代饱和度检测, 利用 MEGA 6.06 软件进行比对、分析变异位点、计算 GC 含量、种内和种间遗传距离、构建 NJ 系统发育树, 并预测 ITS2 二级结构。结果 竹节参 ITS2 序列长度均为 230 bp, 平均 GC 含量 63.7%, ITS2 序列平均遗传距离分析、NJ 树、二级结构特征均显示竹节参与非同属混伪品和部分近缘物种(屏边三七、假人参、三叶参、野三七和越南人参)存在极大差异, 能有效区分, 而鉴定近缘物种西洋参、人参、三七、珠子参、羽叶三七、*Panax assamicus*、*Panax variabilis* 和狭叶竹节参序列分辨率较低, 具有一定局限性。结论 ITS2 序列可作为鉴定竹节参与非同属混伪品 DNA 条形码之一, 对非同属混伪品鉴定分辨率极高, 而对于鉴定其近缘物种的通用性仍有待考证, 这为后续竹节参及其近缘物种种间遗传关系和亲缘关系鉴定、非同属混伪品鉴别区分和临床安全用药提供重要参考。

关键词: 竹节参; 近缘物种和混伪品; 分子鉴定; DNA 条形码; ITS2 序列

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3672-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.029

Identification of *Panax japonicus* and its related species or adulterants using ITS2 sequence

CHEN Jing-an¹, YANG Lu², LI Rong-zhao¹, ZHANG Jia-ming³, HU Min¹, LIU Yong^{1,4}

1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

2. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

3. Second Clinical Medical College of Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

4. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

Abstract: Objective To provide a scientific basis for the modern identification of *Panax japonicus* and ensure the clinical efficacy and medication accuracy, the molecular identification of *P. japonicus* and its related species or adulterants was carried out. **Methods** ITS2 sequences of *P. japonicus* were amplified and sequenced directionally. ITS2 sequences of related species and adulterants were downloaded from GenBank. Cutting with ITS2 database, the final dataset consisted of 102 sequences from 24 species. DAMBE program was also implemented to detect substitution saturation of ITS2 sequences. MEGA 6.06 software was utilized for sequence alignment, calculating GC content, analyzing variation sites, estimating intra-specific and inter-specific genetic distances, and finally building NJ tree. Moreover, the secondary structure of ITS2 was predicted by using the ITS2 database. **Results** The length of ITS2 sequences from *P. japonicus* was 230 bp and GC content was 63.7%. The average genetic distance analysis, NJ tree, and secondary structure characteristics of the ITS2 sequences showed that there were great differences between *P. japonicus* and its non-identical adulterants or partial related species (*P. stipuleanatus*,

收稿日期: 2018-03-27

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20151264, 20161139); 广东医科大学面上培育项目 (M2015015, M2016002); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (201610571002); 省级大学生创新创业训练计划立项项目 (201710571075)

作者简介: 陈镜安 (1995—), 男, 在读本科生, 主要从事中药分子鉴定工作。

***通信作者** 刘镛 (1982—), 男, 药理学硕士, 广东医科大学药学院讲师, 主要从事药用植物分子生物学及分子药理学研究。

Tel: (0769)22896551 E-mail: liuyong0614@126.com

P. pseudoginseng, *P. trifolius*, *P. vietnamensis* var. *fuscidiscus*, and *P. vietnamensis*). However, the application of such method for the identification of *P. japonicus* and partial closely related species (*P. quinquefolius*, *P. ginseng*, *P. notoginseng*, *P. japonicus* var. *major*, *P. japonicus* var. *bipinnatifidus*, *P. assamicus*, *P. variabilis*, and *P. japonicus* var. *angustifolius*) had certain limitation. **Conclusion** The ITS2 sequence can be used as one of the DNA barcodings for the identification of *P. japonicus* and its non-identical adulterants at high identification rate, however, its versatility of identification between *P. japonicus* and related species needs to be further verified. Our study provides the basis for the identification of inter-specific genetic and affinity relationship of *P. japonicas* and its related species, the distinguishment between *P. japonicas* and non-identical adulterants, and the clinical safety of *P. japonicas*.

Key words: *Panax japonicus* C. A. Mey.; related species or adulterants; molecular identification; DNA barcoding; internal transcribed spacer 2 sequence

竹节参为五加科人参属植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥根茎^[1], 别名北三七、竹节三七等, 属于我国珍稀濒危中草药, 被称作“草药之王”。竹节参性温, 味甘、微苦, 归肝、脾、肺经^[1], 兼具北药人参补虚强壮、南药三七活血化瘀等功效, 主治病后虚弱、跌扑损伤等病症^[2-3]。现代药理学研究表明, 皂苷类、挥发油、糖类、氨基酸等是竹节参的药用成分, 其中皂苷类成分通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 和核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路发挥抗炎作用^[4], 对肿瘤、慢性综合征、人体大系统 (消化、中枢神经、心血管、免疫) 等均有明显的药理作用^[5-6]。由于竹节参在中医临床治疗、保健品、化妆品等领域的广泛应用, 人们对竹节参的需求量与日俱增。然而, 市场上常有狭叶竹节参、屏边三七、景天三七、八角莲、红毛七、麻布七等同科属或非同科属混伪品冒充或误当正品竹节参使用或售卖^[7-9]。混伪品扰乱了中药材市场的秩序, 影响了竹节参的疗效及用药安全。为保障中药材质量, 确保临床用药安全有效, 急需寻求一种精准可靠、高效、稳定的方法应用于鉴别区分竹节参及其同科属或非同科属的混伪品。

目前, 传统的中药材鉴定主要通过鉴别药材的颜色、形态、气味、切片等来鉴定药材的真伪与纯度, 常见有基于形态性状特点的基原、性状、显微及理化鉴定等。这 4 大传统中药鉴定方法要求鉴定员必须具有丰富而扎实的分类学知识和鉴别经验。新兴的分子鉴定技术由于具有准确性高、重现性好、不受样品形态限制等优势, 在中药鉴定领域应用越来越广泛^[10]。

DNA 条形码技术 (DNA barcoding) 是当前最先进的分子鉴定技术之一, 其在物种鉴定中比传统鉴定方法更具有显著优势, 越来越多的医药工作者和其他研究人员开始关注并运用该技术解决实际问题^[11-13], 其中 ITS2 (internal transcribed spacer

2) 序列由于序列短、易扩增、鉴定能力佳而备受关注。Chen 等^[14]将 7 种 DNA 条形码片段 (psbA-trnH、matK、rbcL、rpoC1、ycf5、ITS2、ITS) 应用于鉴别来自 753 个属 4 800 种超过 6 600 份植物样品, 比较结果发现 ITS2 在植物鉴定中的鉴定分辨率高达 92.7%, 并提出 ITS2 可作为鉴定植物类群的识别条形码。因此, 本研究利用 ITS2 序列对竹节参及其同科属近缘物种和非同科属、混伪品进行 DNA 分子鉴定, 为竹节参的快速准确鉴定及用药安全提供科学依据。

1 材料

竹节参样品采集于广东省, 经广州中医药大学中药鉴定学系吴文如副教授鉴定为竹节参 *Panax japonicus* C. A. Mey. 的干燥根茎。通过 DNA 提取、PCR 扩增、测序后得到 2 条 ITS2 序列 (编号 *Panax japonicus* X1, *Panax japonicus* X2), 同时, 通过 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 下载竹节参同属近缘物种和非同属混伪品的 ITS2 序列集。根据《中国植物志》分类, 序列集包括五加科人参属竹节参 9 条、珠子参 2 条、羽叶三七 2 条、三七 9 条、狭叶竹节参 2 条、人参 3 条、屏边三七 9 条、假人参 2 条、西洋参 6 条, 毛茛科乌头属麻布七 4 条, 小檗科红毛七属红毛七 3 条, 小檗科鬼臼属八角莲 4 条、六角莲 5 条、川八角莲 2 条、小八角莲 2 条、西藏八角莲 1 条和贵州八角莲 2 条, 小檗科山荷叶属金边七 6 条, 景天科景天属景天三七 4 条; 另外, 根据文献报道, 三叶参、*P. assamicus* Pan.、*P. variabilis* L.、野三七和越南人参亦属于五加科人参属物种^[15-18], 但并未收录于《中国植物志》, 为尽可能探索 ITS2 鉴定竹节参及其近缘物种的全面性, 本研究将三叶参 3 条、*P. assamicus* 4 条, *P. variabilis* 6 条、野三七 7 条和越南人参 5 条 ITS2 序列一并纳入。因此, 本研究最终纳入 24 个物种 102 条序列, 竹节参及其近缘物种和非同属混伪品 ITS2 序列来源信息见表 1。

表 1 竹节参及其近缘物种和混伪品 ITS2 序列来源信息

Table 1 Information of ITS2 sequences source of *P. japonicus* and its related species or adulterants

物种拉丁名	中文名	物种科属	样本编号或 Genbank 号 (采集地点)
<i>Panax japonicus</i> C. A. Mey.	竹节参	五加科人参属	<i>Panax japonicus</i> X1 (中国广东)、 <i>Panax japonicus</i> X2 (中国广东)、KJ559422.1 (中国贵州)、KJ559421.1 (中国山西)、KJ559420.1 (中国云南)、KJ559419.1 (中国四川)、KJ559418.1 (中国贵州)、KX674925.1 (日本)、KX674924.1 (日本)
<i>Panax japonicus</i> C. A. Mey. var. <i>major</i> (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng	珠子参	五加科人参属	JF421522.1、JF421521.1
<i>P. japonicus</i> var. <i>bipinnatifidus</i> (Seem.) Li	羽叶三七	五加科人参属	HQ112363.1 (中国四川)、HQ112364.1 (中国四川)
<i>P. trifolius</i> L.	三叶参	五加科人参属	HQ112446.1 (美国)、HQ112445.1 (美国)、GU054701.1 (美国)
<i>P. notoginseng</i> (Burk.) F. H. Chen	三七	五加科人参属	AY271919.1 (中国云南)、JF778863.1、JX680329.1、JX996143.1、KT285074.1、KT285075.1、KY120314.1、MG283276.1、MG283277.1
<i>P. japonicus</i> var. <i>angustifolius</i> (Burkill) Li	狭叶竹节参	五加科人参属	FJ872552.1 (尼泊尔)、FJ872548.1 (尼泊尔)
<i>P. ginseng</i> C. A. Mey.	人参	五加科人参属	EU592017.1 (中国吉林敦化)、EU592020.1 (中国吉林抚松)、EU592021.1 (中国辽宁新宾)
<i>P. stipuleanatus</i> H. T. Tsai & K. M. Feng	屏边三七	五加科人参属	KX768324.1 (越南)、KX768323.1 (越南)、KJ418197.1 (越南)、KJ418196.1 (越南)、AY271921.1 (中国云南)、AY271922.1 (中国云南)、JX680330.1 (越南)、HQ112444.1 (越南)、HQ112443.1 (越南)
<i>P. pseudoginseng</i> Wall.	假人参	五加科人参属	HQ112438.1 (尼泊尔)、HQ112437.1 (尼泊尔)
<i>P. quinquefolius</i> L.	西洋参	五加科人参属	MG217816.1 (加拿大)、MG218783.1 (加拿大)、MG217889.1 (加拿大)、KM036297.1 (韩国)、HQ112440.1 (美国)、MG219300.1 (加拿大)
<i>P. assamicus</i> R. N. Banerjee	无	五加科人参属	AY233320.1 (印度)、AY233321.1 (印度)、AY725135.1 (印度)、AY725136.1 (印度)
<i>P. variabilis</i> J. Wen.	无	五加科人参属	AY233329.1 (中国云南)、AY233330.1 (中国云南)、AY233331.1 (中国云南)、AY271923.1 (中国云南)、FJ872557.1 (印度)、FJ872554.1 (印度)
<i>P. vietnamensis</i> var. <i>fuscidiscus</i> Komatsu S. Zhu & S. Q. Cai	野三七	五加科人参属	KJ418182.1 (越南)、KJ418188.1 (越南)、KX768326.1 (越南)、KJ418192.1 (越南)、KJ418191.1 (越南)、KJ418183.1 (越南)、KJ418185.1 (越南)
<i>P. vietnamensis</i> Ha & Grushv	越南人参	五加科人参属	KX768325.1 (越南)、KT380922.1 (越南)、MG283290.11 (越南)、MG283291.11 (越南)、MG283292.11 (越南)
<i>Aconitum sinomontanum</i> Nakai	麻布七	毛茛科乌头属	KY417332.1 (中国四川)、KY417331.1 (中国湖北)、KY417330.1 (中国湖北)、AY150232.1
<i>Caulophyllum robustum</i> Maxim.	红毛七	小檗科 红毛七属	JX040540.1、EU592026.1 (中国安徽)、L77157.1 (韩国)
<i>Diphylleia sinensis</i> Li	金边七	小檗科 山荷叶属	KY746321.1、KY746322.1、KY746323.1、KY746324.1、KY746325.1、KY746326.1
<i>Dysosma versipellis</i> (Hance) M. Cheng	八角莲	小檗科鬼臼属	EU592023.1 (中国安徽)、KT290659.1、KY701310.1、KY701315.1
<i>D. delavayi</i> (Franch.) Hu	川八角莲	小檗科鬼臼属	KM980521.1、KM980520.1
<i>D. difformis</i> (Hemsl. & E. H. Wilson) T. H. Wang	小八角莲	小檗科鬼臼属	KT290665.1、KT290664.1
<i>D. majoensis</i> (Gagnep.) M. Hiroe	贵州八角莲	小檗科鬼臼属	KT290667.1、KT290666.1
<i>D. pleiantha</i> (Hance) Woods.	六角莲	小檗科鬼臼属	KT290663.1、KT290662.1、KT290661.1、KT290660.1、KM980518.1
<i>D. tsayuensis</i> T. S. Ying	西藏八角莲	小檗科鬼臼属	MF785662.1 (中国鲁朗)
<i>Phedimus aizoon</i> (L.) ^t Hart	景天三七	景天科景天属	MG236504.1 (加拿大)、MG236951.1 (加拿大)、EU592008.1 (中国江苏)、KX896732.1 (中国)

2 方法

2.1 DNA 提取

取干燥竹节参药材样品约 30 mg, 加入液氮充分碾磨并充分离心后, 利用植物组织 DNA 快速提取试剂盒 (植物基因组 DNA 提取试剂盒 DP305, 天根生化科技有限公司) 提取总 DNA。

2.2 PCR 扩增及测序

PCR 扩增采用 ITS2 通用引物 S2F: 5'-ATGC-GATACTTGGTGTGAAT-3' 和 S3R: 5'-GACGCTT-CTCCAGACTACAAT-3'。扩增反应采用 50 μ L 体系, 包括模板 DNA 4 μ L、正向引物和反向引物各 0.7 μ L, Prime STAR[®] HS Premix 25 μ L (购自 TAKARA 公司), ddH₂O 19.6 μ L。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 1 个循环; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 5 min, 进行 1 个循环, 4 $^{\circ}$ C 保存扩增产物。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测结果, 并送至华大基因进行正向测序, 最后经过 ITS2 database 剪切获得 2 条竹节参 ITS2 序列。

2.3 种内及种间序列分析

采用 ClustalW 方法进行多重序列比对, 然后利用 MEGA 6.06 软件^[19]分析比对后序列间变异位点, 计算 GC 含量差异, 并基于双参数模型 Kimura

two-parameter (K2P) 计算种内与种间最小、最大和平均遗传距离。

2.4 序列饱和度检测、构建系统发育树及预测二级结构

由于进化过程中碱基容易受到替代饱和效应的影响, 而这种效应较大影响系统发育分析结果的可信度^[20]。因此在构建 ITS2 序列的系统发育树前, 通过 DAMBE 软件^[21]计算 Iss、Iss.c、*P* 值来检测序列替代饱和度, 若 Iss < Iss.c 且 *P* = 0.000 0, 则表明所用序列数据集未受到替代饱和度影响, 可用于构建系统发育树。应用 MEGA 6.06 软件构建 NJ 系统发育树 (neighbor-joining tree), 利用 Bootstrap 法进行 1 000 次重复分析, 检验各系统发育枝的支持率, 分析各物种分支是否具有单系性, 根据 Xia 等^[20]建立的 ITS2 database (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de>) 预测 ITS2 二级结构。

3 结果与分析

3.1 序列变异程度分析

为检测竹节参种内及其近缘物种和混伪品种间遗传分化程度和差异大小, 本研究利用 MEGA 6.06 软件对纳入的 ITS2 序列进行变异分析, 分析结果见表 2。竹节参 ITS2 序列长度均为 230 bp, 平

表 2 竹节参及其近缘物种与混伪品 ITS2 片段的长度范围、平均碱基组成

Table 2 Length range and average base composition of ITS2 fragment of *P. japonicus* and its related species or adulterants

物种名	T/%	C/%	A/%	G/%	(G+C)/%	片段长度/bp
竹节参	19.7	34.2	16.7	29.5	63.7	230
珠子参	19.6	34.3	17.0	29.1	63.4	230
羽叶三七	18.5	34.8	17.2	29.6	64.4	233
三叶参	15.0	38.7	15.4	30.9	69.6	233~242
三七	20.4	34.3	16.1	29.1	63.4	230~233
狭叶竹节参	19.7	33.7	17.2	29.4	63.1	233
人参	20.7	33.0	16.9	29.4	62.4	224~225
屏边三七	19.5	34.7	16.5	29.3	64.0	203~232
假人参	20.3	33.3	18.2	28.1	61.4	231
西洋参	19.8	33.9	16.6	29.6	63.5	232~233
<i>Panax assamicus</i>	20.1	33.8	17.0	29.1	62.9	223~265
<i>Panax variabilis</i>	20.2	33.9	18.0	27.9	61.8	232~265
野三七	20.5	32.0	18.9	28.6	60.6	204~224
越南人参	19.7	34.1	17.8	28.3	62.4	224~233
麻布七	22.0	31.2	17.3	28.9	60.1	209~217
红毛七	16.2	36.9	17.8	30.1	67.0	229~238
八角莲	28.9	26.3	21.7	23.1	49.4	242~248
川八角莲	29.8	25.6	20.7	24.0	49.6	242
西藏八角莲	29.2	25.4	21.6	23.1	48.5	238
小八角莲	28.3	26.2	21.1	24.4	50.6	242
贵州八角莲	28.1	26.4	21.1	24.4	50.8	242
六角莲	29.3	26.0	21.6	23.1	49.1	242
金边七	30.6	24.7	20.7	24.0	48.7	245~246
景天三七	28.1	24.0	22.0	25.9	49.9	219~252

均 GC 含量为 63.7%，来自同一地区的样本序列并未发现变异位点，表明同一地区（中国广东、贵州、日本东京）相同生境的竹节参的遗传变异相对稳定，而来自不同地区的竹节参之间共存在 9 个变异位点，其中中国境内竹节参与日本东京的样本在 191 位点处为 C/A 颠换，不同地区竹节参种内差异较大，这可能与竹节参种植地生态环境或栽培用种种源不同有关。竹节参同科属近缘物种序列长度 203~265 bp，GC 含量为 60.8%~69.6%，这与竹节参种内平均 GC 含量相差并不明显。而非同科属混伪品序列长度 209~252 bp，GC 含量为 48.5%~67.0%，山荷叶属金边七和鬼臼属八角莲、西藏八角莲等混伪品与竹节参种内 GC 含量差异明显，相差大于 10%，其中西藏八角莲相差最大（48.5%）。因而，GC 含量可作为区分竹节参及其非同科属混伪品辅助指标之一。

3.2 序列遗传距离分析

为了消除因采样个体不同引起的偏差，本研究

计算了竹节参种内及其近缘物种和混伪品种间平均 K2P 距离，结果如图 1 所示。在同科属近缘物种中，假人参、三叶参、*P. variabilis*、*P. assamicus*、屏边三七、越南人参、野三七种间平均遗传距离与竹节参种内差异明显，可与竹节参明显区分，竹节参与三叶参距离最远（0.091）；而西洋参、人参、三七、珠子参、羽叶三七差异并不明显，暂不能通过遗传距离分析有效区分这些近缘物种。在非同属混伪品中，竹节参与红毛七距离最近（0.572），与麻布七距离最远（0.783）。由此可见，与同科属近缘物种相比，竹节参与非同科属物种种间平均遗传距离相差非常明显。

综上所述，除西洋参、人参、三七、珠子参、羽叶三七外，竹节参种内平均遗传距离（0.018）明显小于其与各混伪品种间平均遗传距离，表明 K2P 遗传距离在鉴别竹节参及其部分近缘物种和非同科属混伪品方面有一定应用价值。

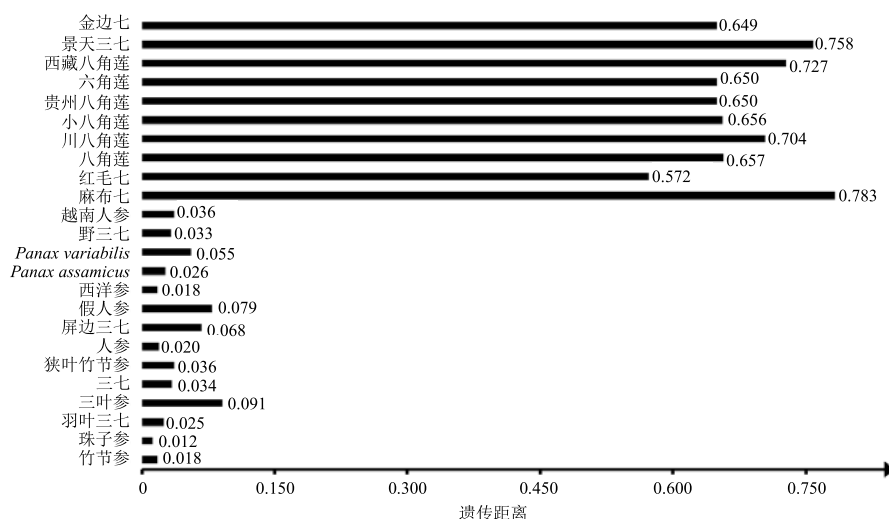


图 1 竹节参种内及其近缘物种和非同科属混伪品种间平均 K2P 距离

Fig. 1 Average K2P distance of *P. japonicus* and its related species or adulterants

3.3 序列饱和度检测与构建系统发育树（NJ 树）

序列饱和度检测结果显示，竹节参与其近缘物种和非同属混伪品序列集 Iss.cSym（对称进化树）和 Iss.cAsym（不对称进化树）值均明显大于 Iss 值，并且 $P=0.000\ 0$ ，表明序列替代未饱和，适合建树。基于 ITS2 序列构建竹节参及其近缘物种和非同属混伪品的 NJ 系统发育树见图 2。如图 2-A 所示，来自不同地区的竹节参并不严格地聚成同一进化枝，而在五加科人参属中被分化成 3 支进化枝，其中本实验克隆的竹节参单独聚为一支，支持率为 94%，来自贵州、山西、四川和云南的竹节参与变种珠子

参共同聚成一支，支持率 93%，东京竹节参聚成一支，支持率 88%；来自越南的野三七和越南人参聚成同一进化枝，显然二者在近缘物种中亲缘性最接近；除竹节参、珠子参、野三七和越南人参外，其余近缘物种独立聚成同一独立进化枝，表现出良好的单系性。如图 2-B 所示，来自不同地区的竹节参聚成同一独立进化枝，支持率 100%，单系性强，能有效区分于其他混伪品；在非同属混伪品中，景天科景天属景天三七、毛茛科乌头属麻布七以及小檗科鬼臼属八角莲、山荷叶属金边七、红毛七属红毛七各自形成独立进化枝，表现出良好的单系性。

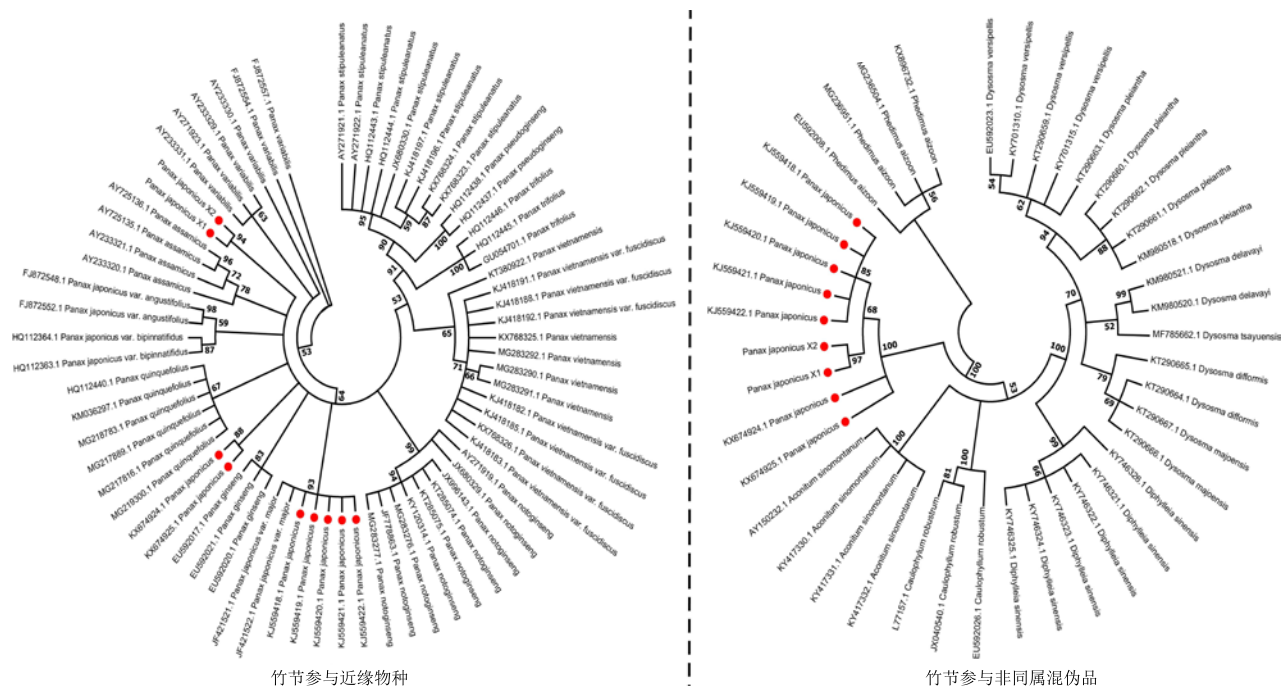


图 2 基于 ITS2 序列构建竹节参及其近缘物种和非同属混伪品的 NJ 树

Fig. 2 Construction of NJ tree of *P. japonicus* and its related species or adulterants based on ITS2 sequence

综上所述，基于 ITS2 序列构建 NJ 树能有效区分竹节参与非同属混伪品，而在鉴定竹节参及其近缘物种具有一定局限性。

3.4 竹节参及其混伪品 ITS2 序列二级结构分析

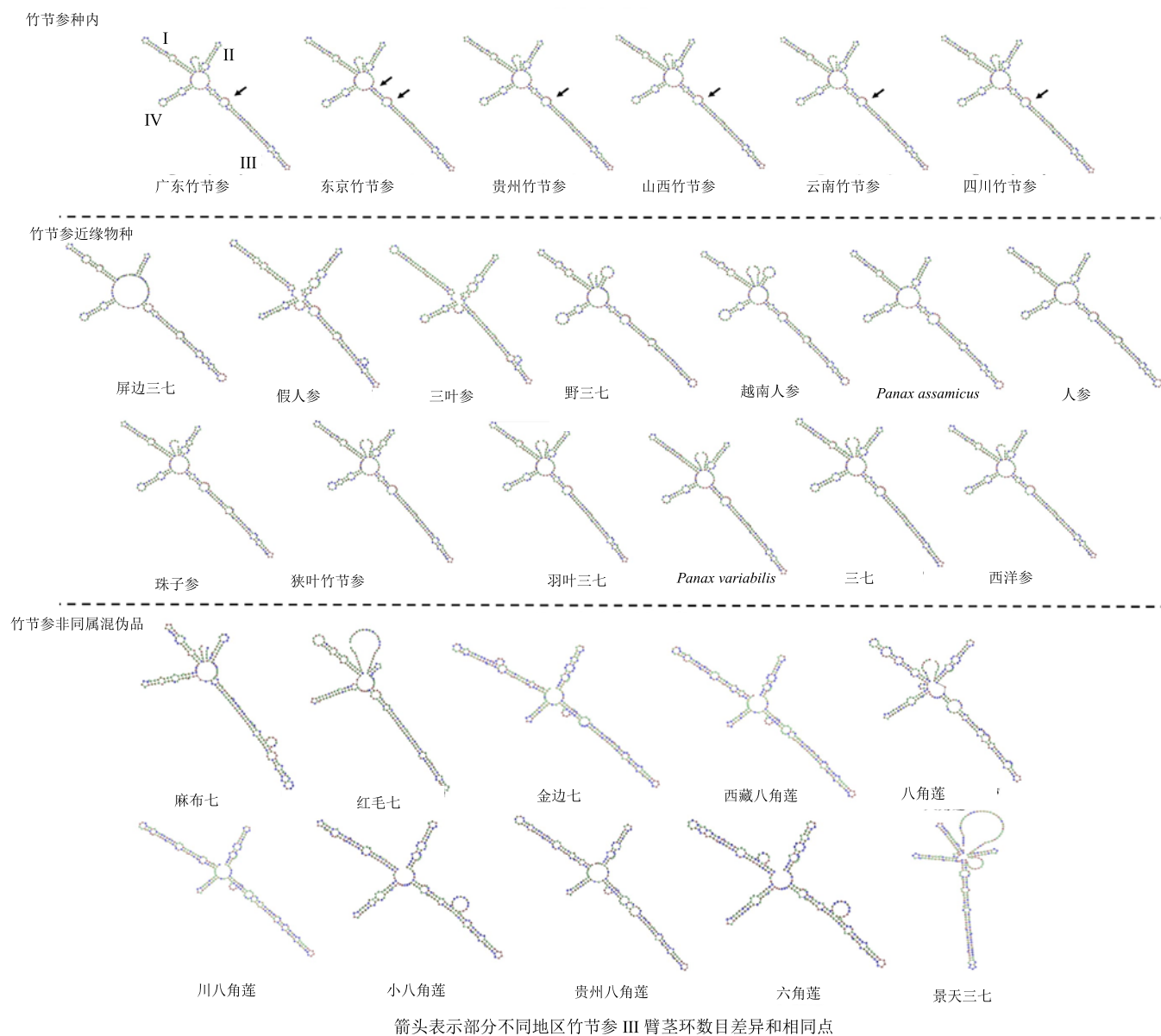
通过 ITS2 database 使用基于 Hidden Markov Models (HMM) 的方法注释竹节参及其近缘物种和混伪品序列，并根据多个模板结构进行同源建模进而预测较优 ITS2 二级结构， E 值小于 1×10^{-16} ，结果如图 3。竹节参及其近缘物种和混伪品的 ITS2 二级结构均以一个大的多分枝环为中心（中心环），四周延长出 4 个臂，按顺时针方向标记为 I、II、III、IV 臂，臂上一侧未配对碱基突出形成凸环，各臂顶端未配对碱基形成发夹环，各臂茎环数有所差异，臂与臂之间未配对碱基形成外环。如图 3，来自不同地区的竹节参 ITS2 结构基本一致，但是，其 III 臂的茎环数目和分布不全相同。例如，广东竹节参含 6 个茎环，东京竹节参含 4 个茎环，来自贵州、山西、云南和四川的竹节参含 5 个茎环；广东竹节参 III 臂近端有 2 个茎环并形成双连环，东京竹节参 III 臂近端缺乏一小茎环。而来自不同地区的竹节参各臂茎环分布、外环、发夹环和中央环完全一致。

由图 3 和表 3 可见，在五加科近缘物种中，屏边三七、假人参、三叶参、野三七和越南人参 ITS2 二级结构与竹节参差异最明显，它们各臂茎环分布

和数目种间差异明显大于竹节参种内差异。另外，屏边三七中央环在近缘物种中最大，与竹节参中央环形状差异明显，假人参和三叶参不存在中央环，外环处于 III 臂与 IV 臂之间，并且 III 臂上远端都有凸环，而野三七和越南人参 II 臂、IV 臂顶端发夹环较大，这些差异特征都提高二级结构在鉴定屏边三七、假人参、三叶参、野三七、越南人参竹节参的分辨率。西洋参二级结构与来自贵州、云南、山西和四川竹节参非常相似；珠子参、羽叶三七、三七、狭叶竹节参、人参、*P. assamicus*、*P. variabilis*、珠子参二级结构外环形状与竹节参不同，除此以外，其余结构与竹节参差异不明显。

与竹节参相比，非同科属混伪品二级结构外观形状、外环、各臂茎环数、茎环分布均与竹节参差异明显（图 3 和表 3）。例如红毛七和景天三七 I 臂和 II 臂之间外环较大且差异最明显，景天三七含 2 个外环，麻布七、小八角莲和六角莲 III 臂都存在明显凸环，金边七、西藏八角莲、川八角莲、小八角莲、贵州八角莲和六角莲均不存在外环且 I 臂明显长于竹节参。

综上所述，ITS2 二级结构特点可作为区分竹节参及其非同属混伪品的辅助指标之一，可为准确、有效地鉴别中药材竹节参及其混淆物种提供重要参考。



The arrows indicate the difference and similarities of the stems of *P. japonicus* in different regions.

图 3 竹节参及其近缘物种和非同属混伪品 ITS2 二级结构

Fig. 3 ITS2 secondary structure of *P. japonicus* and its related species or adulterants

4 讨论

中药经历了几千年的传承，疗效是长期临床中医学实践证明的，中药的真伪鉴定是保证其疗效和安全性的基础。然而中药市场同名异物的混淆品或代用品极多，约束了中医药的现代化发展。DNA 条形码技术是当前备受推崇的中药现代化鉴定方法，其具有操作方便、重复性高、专业技术要求低和适用性强等优点，是连接中药资源传统形态鉴别与基于大数据的分子信息研究的桥梁，满足种类繁多的中药材的鉴别需求。

五加科人参属竹节参作为“草药之王”，药用

和商用价值较高。在市场上和民间中，竹节参混伪品较多，误服误用、以次充好、以假乱真的现象常见。在竹节参混伪品中，有的是近缘物种，如狭叶竹节参、西洋参、三七等^[7-8]，有的是加工后形状与竹节参相似，但药材内在质量和成分却极大不同，如八角莲、红毛七、麻布七、景天三七等^[8-9,23]。其中八角莲曾被报道因形似竹节参而被掺杂在竹节参中作药用，因八角莲含有有毒成分鬼臼毒素，病人误用八角莲后易发生消化、神经和心血管系统中毒，甚至死亡^[9,24]。孙涛等^[25]曾报道 ITS2 基因可有效区分人参属物种，这为本研究进一步鉴定竹节

表 3 竹节参及其近缘物种和非同属混伪品 ITS2 二级结构 I、II、III、IV 臂茎环数

Table 3 Number of I, II, III and IV loops in secondary structure of *P. japonicus* and its related species or adulterants

物种名	臂茎环数			
	I 臂	II 臂	III 臂	IV 臂
广东竹节参	2	2	6	2
东京竹节参	2	2	4	2
(贵州、山西、云南、四川) 竹节参	2	2	5	2
珠子参	2	2	5	2
羽叶三七	2	2	5	2
三叶参	2	4	4	2
三七	2	2	4	2
狭叶竹节参	2	3	5	3
人参	2	2	6	2
屏边三七	3	1	7	2
假人参	4	4	5	2
西洋参	2	2	5	2
<i>P. assamicus</i>	2	2	6	2
<i>P. variabilis</i>	1	2	4	2
野三七	3	1	4	2
越南人参	3	1	6	2
金边七	5	4	5	1
麻布七	3	1	7	3
红毛七	3	1	5	2
八角莲	4	3	7	2
川八角莲	4	3	8	1
西藏八角莲	5	3	6	1
小八角莲	3	3	6	3
贵州八角莲	5	3	7	1
六角莲	5	4	6	2
景天三七	1	1	5	1

参与变种羽叶三七、狭叶竹节参以及非同种属混伪品提供重要支撑。为提高竹节参临床用药的安全性和有效性,本研究应用 DNA 条形码 ITS2 序列对竹节参及其近缘物种和混伪品进行分子鉴定。

序列变异分析、系统发育分析和二级结构分析综合结果表明 ITS2 序列可应用于鉴别竹节参及其非同属混伪品和部分近缘物种(屏边三七、假人参、三叶参、野三七和越南人参)。越南人参为人参属物种并起源于越南中部,并且在中国云南境内发育形成新的变种野三七^[16],三叶参源于美国北部^[18],*P. assamicus* 和 *P. variabilis* 均源于印度^[15],这 5 个

源于国外地区的人参属物种至今未收录于《中国植物志》,这影响着人参属物种鉴定的全面性和准确性。笔者认为需进一步探讨越南人参、野三七、三叶参、*P. assamicus* 和 *P. variabilis* 等物种的分类,并建议纳入《中国植物志》。

在本研究中,越南人参、野三七、三叶参、*P. assamicus* 和 *P. variabilis* 独立形成进化枝(图 2),与竹节参明显分开。五加科中假人参、三叶参平均种间遗传距离大,分别为 0.079 和 0.091,独立聚成进化枝并与竹节参分开,其 ITS2 结构与竹节参差异也最明显,不具有中心环,III 臂有凸环并且外环处于 III 臂与 IV 臂之间,这些结果表明三叶参、假人参在近缘物种中与竹节参差异程度最大。在本研究中,茎环、中央环、凸环、外环的存在、形状、分布以及数量极大方便鉴别竹节参及其混伪品(图 3);另外,ITS2 二级结构除了具有保守性和臂环差异性,也能在一定程度上反映近缘物种之间的亲缘性。例如,在五加科中,羽叶三七和三七、假人参和三叶参、越南人参和越南人参、人参与 *P. assamicus* 等结构外形相似,在小檗科中,川八角莲、小八角莲和六角莲结构相似,III 臂上都含有凸环。

综上所述,通过 ITS2 序列变异分析、遗传距离的计算、系统发育树的构建以及 ITS2 二级结构的分辨等多方面相互验证鉴别,ITS2 序列可准确、有效地区分竹节参及其非同属混伪品,为后续鉴定竹节参及其新近缘物种和混伪品提供参考;可有效鉴定竹节参及其部分近缘物种(屏边三七、假人参、三叶参、野三七和越南人参);对于西洋参、人参、三七、珠子参、羽叶三七、*P. assamicus*、*P. variabilis* 和狭叶竹节参,ITS2 序列分辨率较低,并未有效与竹节参区分,存在局限性,因而区分竹节参与这些近缘物种需要综合其他 DNA 条形码或鉴定方法。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 武秋爽,陈平,张庆文. 竹节参化学成分、药理活性及分析方法研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2016, 12(6): 46-54.
- [3] 鲁道旺,朱国豪. 土家族珍稀药材神参(竹节参)的研究概况 [J]. 中国民族医药杂志, 2008, 14(5): 64-67.
- [4] Dun Y, Liu M, Chen J. *et al.* Regulatory effects of saponins from *Panax japonicus* on colonic epithelial tight junctions in aging rats [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(1), 50-56.
- [5] 鲁文杰,袁德培,曾楚华. 竹节参作用的研究进展 [J].

- 生物技术世界, 2016, 13(5): 236.
- [6] 欧阳丽娜, 向大位, 吴雪, 等. 竹节参化学成分及药理活性研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 1023-1027.
- [7] 许成, 张长城, 李菁, 等. 基于 RAPD 标记竹节参及其近缘植物的品种鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(1): 101-104.
- [8] 朱永红, 王红. 土家“七”药的鉴别与应用 [J]. 中国民族民间医药, 2010, 19(3): 8.
- [9] 朱应辉, 李芹. 竹节三七与易混品八角莲的鉴别 [J]. 时珍国医国药, 2002, 13(2): 78.
- [10] 时圣明, 潘明佳, 王洁, 等. 分子鉴定技术在中药中的应用 [J]. 中草药, 2016, 47(17): 3121-3126.
- [11] 张彩云, 黄珊珊, 颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展 [J]. 中草药, 2017, 48(11): 2306-2312.
- [12] Yang J, Dong L L, Wei G F, *et al.* Identification and quality analysis of *Panax notoginseng* and *Panax vietnamensis* var. *fuscidicus* through integrated DNA barcoding and HPLC [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(2): 176-182.
- [13] Gao Z T, Wang L L, Wang X Y, *et al.* Authenticity survey of *Cuscutae Semen* on markets using DNA barcoding [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(3): 218-225.
- [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] Pandey A K, Ali M A. Phylogeography of Indian populations of *Panax bipinnatifidus* Seem. (Araliaceae) based on internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Phytomorphol Inter J Plant Morphol*, 2010, 60(3): 110-118.
- [16] Shu Z, Cai H F, Chen H, *et al.* A new variety of the genus *Panax* from southern yunnan, China and its nucleotide sequences of 18S ribosomal RNA gene and matK gene [J]. *J Jap Bot*, 2003, 78(2): 86-94.
- [17] Komatsu K, Zhu S, Fushimi H, *et al.* Phylogenetic analysis based on 18S rRNA gene and matK gene sequences of *Panax vietnamensis* and five related species [J]. *Planta Med*, 2001, 67(5): 461-465.
- [18] Wen J, Zimmer E A. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Mol Phylogenetics & Evolution*, 1996, 6(2): 167-177.
- [19] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [20] Xia X, Xie Z, Salemi M, *et al.* An index of substitution saturation and its application [J]. *Mol Phyl Evol*, 2003, 26(1): 1-7.
- [21] Xia X. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Molecular Biol Evol*, 2013, 30(7): 1720-1728.
- [22] Ankenbrand M J, Keller A, Wolf M, *et al.* ITS2 database V: Twice as much [J]. *Molecular Biol Evol*, 2015, 32(11): 3030-3032.
- [23] 夏黎, 梁永枢, 李绍林, 等. 竹节参及其混淆品景天三七的比较鉴别 [J]. 中药材, 2014, 37(5): 797-800.
- [24] 徐祥, 郦小平. 八角莲的毒理学研究现状 [J]. 亚太传统医药, 2011, 7(8): 158-160.
- [25] 孙涛, 孔德英, 滕少娜, 等. 基于 ITS2 条形码的人参属物种鉴定研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(19): 5072-5074.