

基于 ITS2 条形码鉴定藏柴胡及其易混品

夏召弟, 刘霞*, 冯玛莉, 席啸虎, 仝立国

山西省中医药研究院, 山西 太原 030012

摘要:目的 采用 DNA 条形码分子鉴定技术鉴定藏柴胡(又名窄竹叶柴胡) *Bupleurum marginatum* 及其易混品, 以确保柴胡药材质量及临床用药安全。**方法** 收集柴胡药材共 50 份, 对其 ITS2 序列进行 PCR 扩增并双向测序, 所得序列用 CodonCode Aligner 软件校对拼接后, 利用 MEGA 6.0 对序列进行分析比对, 计算种内、种间遗传距离, 利用邻接法(NJ)构建系统聚类树, 并应用 ITS2 数据库网站预测其 ITS2 二级结构。**结果** 藏柴胡种内遗传距离明显小于它与其同属的种间遗传距离, 基于 ITS2 建立的 NJ 树和网站预测的 ITS2 二级结构, 均能准确将藏柴胡药材与其易混药材区分。**结论** 基于 ITS2 序列可以科学准确地鉴别藏柴胡药材及其易混品, 为确保临床用药安全提供更多先进可靠的技术手段。

关键词: 藏柴胡; DNA 条形码; ITS2; 易混品; 物种鉴定

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)23-6062-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.23.020

Identification of *Bupleurum marginatum* var. Wall. ex DC *stenophyllum* (Wolff) Shan et Li and its analogues based on ITS2 barcode

XIA Zhao-di, LIU Xia, FENG Ma-li, XI Xiao-hu, TONG Li-guo

Institute of Traditional Chinese Medicine of Shanxi Province, Taiyuan 030012, China

Abstract: Objective DNA barcoding technology, a molecular identification method, is applied to distinguish *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* from its analogues in order to ensure the quality and clinical curative effect. **Methods** In this study, the internal transcribed spacer 2 (ITS2) regions of 50 samples were amplified by PCR and sequenced bi-directionally. Obtained sequences were assembled using CodonCode Aligner. The genetic distances were computed by MEGA 6.0 in accordance with the kimura 2-parameter (K2P) model and the phylogenetic tree was constructed by Neighbor-joining (NJ) method. Moreover, the secondary structure of ITS2 was predicted using ITS2 database websites. **Results** The intra-specific genetic distances were smaller than inter-specific ones in ITS2 regions of *B. marginatum* var. *stenophyllum*. The NJ tree and secondary structure results could distinctly differentiate *B. marginatum* var. *stenophyllum* and its analogues. **Conclusion** ITS2 sequence can scientifically and reliably identify the authenticity of *B. marginatum* var. *stenophyllum* and could provide more new and reliable techniques to ensure clinical safety of this traditional Chinese medicine.

Key words: *Bupleurum marginatum* var. Wall. ex DC *stenophyllum* (Wolff) Shan et Li; DNA barcoding; ITS2; analogues; species identification

自 2019 年 12 月新型冠状病毒肺炎(COVID-19)在国际上蔓延以来, 其传染性强, 传播速度快, 影响范围广, 引起了国内外各界人士的高度关注。而中医药在防治此次疫情的过程中, 体现出了其独特的优势, 发挥了举足轻重的作用^[1-5]。目前在各地区发布的中医药防治 COVID-19 方案中发现很多方药、经典名方和中

成药中都涉及到柴胡这一传统中药^[6-9]。因此要更加严格确保柴胡药材质量以保障临床用药安全、合理、有效, 为积极发挥中医药特色和加强中西医结合打下更坚实的基础, 对抗击疫情具有重要意义。

柴胡始载于《神农本草经》, 原名茈胡, 列为上品, 至《本草图经》改名为柴胡, 其性寒, 味微

收稿日期: 2020-04-06

基金项目: 山西省卫生健康委员会科研项目(2018081); 山西省应用基础研究计划资助项目(201901D211528)

作者简介: 夏召弟, 在读硕士, 从事中药材及中药饮片道地性研究。Tel: 18993242744 E-mail: 2721820367@qq.com

*通信作者 刘霞, 硕士生导师, 主任药师, 从事中药材及中药饮片道地性研究。Tel: (0351)4668091 E-mail: 770191058@qq.com

苦，归肝、胆经，距今已有 2 000 多年的应用历史。《本草纲目》载柴胡可治阳气下陷，平肝、胆三焦，包络相火以及头痛、眩晕、目昏诸疾，及妇人热入血室、经血不调、小儿痘疹余热、五疳羸热等症，可见柴胡具有和解表里、疏肝解郁之功效，现临床上常用于治疗感冒发热、寒热往来、胸胁胀痛等症^[10-12]。现代药理研究证明柴胡在神经系统方面具有抗抑郁、镇静、镇痛作用^[13-15]；在免疫调节方面具有抗炎和抗病毒、抗细菌内毒素和提高免疫力的功效^[16-18]；还具有保肝护肾、抗肿瘤和保护心血管的药用价值^[19-21]。

《中国药典》1985—2015 年版均只规定柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *B. scoronerifolium* Willd. 的干燥根，习称为“北柴胡”和“南柴胡”。但是法定柴胡药材的供应能力有限，而且由于不合理的采挖、育林等原因导致野生柴胡资源明显减少，目前南柴胡在市场已很少见^[22]。然而柴胡属约有 150 种，我国分布就有 42 种、17 变种、7 变型^[23]，植物资源非常丰富，导致目前市场上柴胡药材种类繁多。现在市场流通的主流柴胡药材是北柴胡 *B. chinense* DC.、竹叶柴胡 *B. marginatum* Wall. ex DC. 和藏柴胡（又名窄竹叶柴胡）*B. marginatum* var. *Wall. ex DC. stenophyllum* (Wolff) Shan et Li^[24]。此外，还有多数种类在产地有作柴胡药用的习惯，如《甘肃省中药材标准》^[25] 记载的黑柴胡 *B. smithii* Wolff *B. longicaule* auct. non Wall. ex DC. 和红柴胡 *B. scoronerifolium* Willd. Enum. Hort. Berol. DC.，《四川省中药材标准》^[26] 记载的马尾柴胡 *B. microcephalum* Diels. 或马尔康柴胡 *B. malconense* Shan et Y. Li。再加上还有掺杂伪混品的现象，以上因素在一定程度上造成了柴胡属药用植物的品种混乱和质量的良莠不齐，使得柴胡临床用药的安全性和有效性受到很大的威胁。利用传统的鉴别手段鉴别中药材对操作人员的专业能力要求较高，而且对准确鉴别药材基源有一定局限性，因此需要一种更科学、更准确、更稳定的方法来作为补充鉴别方法。

因此，本实验采用目前应用很广泛的 DNA 条形码作为鉴别手段，它是利用基因组中一段公认标准的 DNA 片段鉴定物种的分子诊断新技术，作为传统形态鉴别方法的辅助手段和有效补充^[27]。自 Chen 等^[28-29] 和 Yao 等^[30] 提出以 ITS2 作为鉴别植物的通用序列以来，近年来有很多文献基于 ITS2 条形码可迅速准确对多种植物进行物种鉴定，验证了其

条形码的适用性和稳定性^[31-35]，随着中药材 DNA 条形码分子鉴定方法研究的深入与普及，国家药典委员会在《中国药典》2010 年版增补本中列入中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则，建立了以 ITS2 为核心，psbA-trnH 为辅的植物类药材 DNA 条形码鉴定体系和以 COI 为主、ITS2 为辅的动物类药材 DNA 条形码鉴定体系。本实验利用 ITS2 片段，对从甘肃和山西收集的野生或栽培藏柴胡和其易混药材共 50 份进行物种鉴别，目前藏柴胡种植范围广、产量高、在市场上大量流通，但有关藏柴胡基源鉴定未见系统研究和报道，为藏柴胡基源鉴别提供科学依据，为规范中药材市场以及保障柴胡的临床用药提供实验基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

本研究 50 份藏柴胡及其易混品的样品主要来源于柴胡的主产地甘肃和山西，2019 年的样品为实地采集。新鲜叶片采用硅胶干燥法于 -80 ℃ 冰箱保存备用，药材干根于 20 ℃ 保存备用，样品经山西省食品药品检验所高天爱教授（前期样品）和崔宇宏教授鉴定为藏柴胡 *B. marginatum* var. *Wall. ex DC. stenophyllum* (Wolff) Shan et Li、红柴胡 *B. scoronerifolium* Willd. Enum. Hort. Berol. DC.、北柴胡 *B. chinense* DC.、黑柴胡 *B. smithii* Wolff *B. longicaule* auct. non Wall. ex DC.、锥叶柴胡 *B. bicaule* Helm、银州柴胡 *B. yinchowense* Shan et Y. Li。从外观性状上看，有部分样品无法确定其基源，故用 DNA 条形码进行鉴定。标本凭证保存在山西省食品药品检验所，样品信息见表 1。

1.2 仪器

Verity 96well 型 PCR 仪（美国 ABI 公司）、FR-980A 型凝胶成像仪（上海复日科技有限公司）、3730XL 型测序仪（美国 ABI 公司）、HC-2518R 型冷冻离心机（安徽中科中佳科学仪器有限公司）、TD5A-WS 台式高速离心机（湖南湘仪实验仪器开发有限公司）、DYY-6C 型电泳仪（北京六一仪器厂）、DYCP-32B 型电泳槽（北京六一仪器厂）、WH-3 型微型旋涡混合仪（上海沪西分析仪器厂有限公司）、HS-800D 型数显恒温水浴锅（太仓市科教器材厂）、SW-CJ-1D 洁净工作台（江苏苏洁净化设备厂）、F619703-05BP 系列精密单道可调移液器（加拿大 BBI 公司）、SMA4000UV-Vis Spectrophotometer（Merinton 公司）、BCD-256KT 型冰箱（青岛海尔股

表 1 药材样品 DNA 分子鉴定信息

Table 1 DNA molecular identification information table of *Bupleuri Radix*

编号	中文名	时间	来源	培养方式	部位	采集方式
S1~S3	藏柴胡	2019-09	甘肃临洮三十铺村上	栽培	叶片	实地采集
S4~S6	藏柴胡	2019-09	甘肃临洮三十铺村下	栽培	叶片	实地采集
S7~S9	藏柴胡	2019-09	甘肃临洮窑店上	栽培	叶片	实地采集
S10~S12	藏柴胡	2019-09	甘肃临洮窑店下	栽培	叶片	实地采集
S13~S15	藏柴胡	2019-09	甘肃临夏康乐	栽培	叶片	实地采集
S16~S18	藏柴胡	2019-09	甘肃临夏八龙村	栽培	叶片	实地采集
S19~S21	藏柴胡	2019-09	甘肃临夏上湾乡	栽培	叶片	实地采集
S22~S24	藏柴胡	2019-09	甘肃陇西首阳	栽培	叶片	实地采集
S25~S26	红柴胡	2019-09	甘肃陇西通安	栽培	叶片	实地采集
S27~S29	北柴胡	2017-07	甘肃陇南	栽培	干燥根	市售
S30~S32	北柴胡	2017-08	山西万荣	栽培	干燥根	市售
S33~S35	北柴胡	2019-09	甘肃临夏	栽培	叶片	实地采集
S36~S38	北柴胡	2018-07	山西万荣	野生	干燥根	市售
S39~S41	北柴胡	2018-07	山西	栽培	干燥根	市售
S42~S43	锥叶柴胡	2018-10	内蒙古	野生	干燥根	市售
S44~S45	银州柴胡	2018-10	甘肃定西	栽培	干燥根	市售
S46~S47	黑柴胡	2019-07	山西神池	栽培	干燥根	市售
S48~S50	北柴胡	2019-10	山西闻喜	栽培	叶片	实地采集

份有限公司)。

2 方法

2.1 样品准备

用 75%乙醇擦拭叶片和根的表面,自然晾干后置于 2 mL 离心管中,以 50 Hz 的频率研磨成细粉,称取约 50 mg 粉末。

2.2 DNA 提取及质检

利用 Ezup 柱式植物组织基因组 DNA 抽提试剂盒 (B518261) 提取样品总 DNA。取 5 μ L DNA 溶液 1%琼脂糖、1 $\times$ TAE 缓冲溶液电泳 (电压 120~180 V) 检测 DNA 质量。

2.3 PCR 扩增

PCR 扩增选用通用引物, ITS2F (5'-ATGCGA TACTTGGTGAAT-3')、ITS3R (5'-GACCCTT CTCCAGACTACAAT-3')。PCR 扩增体系为 25 μ L, 包含模板 DNA (20~50 ng/ μ L) 2 μ L, Taq Buffer (10 mmol/L) 2.5 μ L, Dntp (10 mmol/L) 1 μ L, 正、反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L), 加 ddH₂O 至 25 μ L, 以上组分均来自上海生工生物工程股份有限公司。PCR 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C、5 min; 94 $^{\circ}$ C、30 s, 58 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、60 s, 循环 2~4 次, 每次 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C、10 min。PCR 产物取 5 μ L 1%琼脂糖凝胶电泳,电泳参数: 150 V, 100 mA, 10~

20 min 电泳检测结果,然后进行 DNA 双向测序。

2.4 数据处理

应用 CodonCode Aligner 软件对测序峰图进行校对拼接,基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法^[36],手动查找并去除两端 5.8 S 和 28 S 区段 (图 1),获得 ITS2 间隔区序列。登陆 GenBank 的 Nucleotide 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) 下载相关柴胡序列 (下载信息见表 2)。利用 MEGA (molecular evolutionary genetics analysis) 6.0 进行序列比对,计算 GC 含量及种内、种间 K2P (Kimura 2-parameter) 遗传距离,采用邻接法 (neighbour-joining, NJ) 构建系统聚类树,同时以 bootstrap (自展支持率 1 000 次) 重复检验各分支的支持率。根据 Koetschan 等^[37-38]建立的 ITS2 数据库及其网站预测 ITS2 的二级结构。

3 结果与分析

3.1 柴胡样品 DNA 提取和质检结果

柴胡药材样品提取 DNA 后,对 S1~S15 样品进行抽样检测,发现样品呈现单一条带,说明 DNA 完整无降解,有明显条带说明浓度可以满足 PCR 要求,如图 2 所示。在完成 50 个样本总 DNA 提取后,发现 32、40、42 号样本的 DNA 未成功提取,故后续分析样本总数为 47 份。

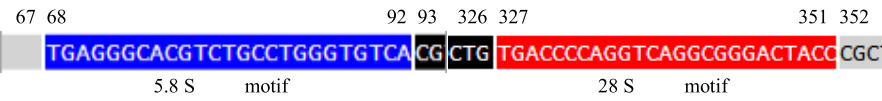


图 1 柴胡序列两端 5.8 S 和 28 S 区段

Fig. 1 5.8 S and 28 S segments at both ends of *Bupleuri Radix* sequence

表 2 柴胡序列相关信息

Table 2 Correlation information table of *Bupleuri Radix* sequence

编号	GenBank 登录号	提交单位
S1~S24	HQ687952、HQ687911	四川大学
S25~S26	JN800316、AB570258	河南大学
S27~S32	JN800313、JN800314	河南大学
S33~S41	KJ716418-422、JN800307	中国医学科学院、河南大学
S42~S43	HQ824722	四川大学
S44~S45	FJ561309、AB690805、AY551293、 FJ561306-308、HM114230-234	中国医学科学院
S46~S47	KJ716422	中国医学科学院
S48~S50	GQ434690	中国医学科学院

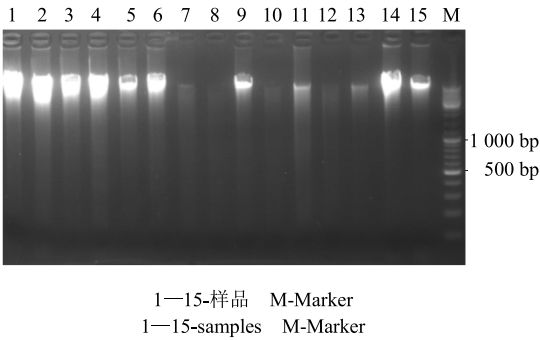
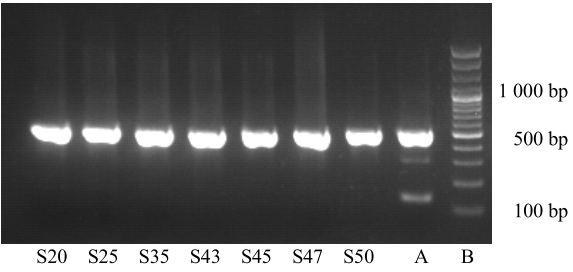


图 2 DNA 提取检测图

Fig. 2 DNA extraction and detection diagram

3.2 PCR 扩增结果

利用 ITS2 引物进行 PCR 扩增，用 5 μ L 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，发现抽样柴胡样品（S20、S25、S35、S43、S45、S47、S50）均能扩增出单一明亮条带，长度约为 500 bp。对所有检测后的 PCR 产物进行测序。见图 3。



A-Marker1-Thermo (SM0332) B-Marker2-生工 (B500437)

图 3 柴胡样品的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR product from *Bupleuri Radix* samples

3.3 基于 ITS2 序列的物种鉴定结果

将注释得到的 47 条 ITS2 序列在中药材 DNA 条形码鉴别系统（<http://www.tcmbarcode.cn/china/>）和 GenBank 数据库中进行相似性搜索（BLAST）鉴定，结果表明 ITS2 序列能够准确鉴定藏柴胡及其易混品，其中 24 条为窄竹叶柴胡，18 条为北柴胡，2 条为红柴胡；1 条为锥叶柴胡，2 条为银州柴胡。

3.4 藏柴胡及其易混品的 ITS2 序列长度及变异位点分析

藏柴胡及其易混品的 ITS2 序列特征见表 3，其中只有北柴胡的 18 条 ITS2 序列有 4 个变异位点，共有 4 个（A₁~A₄）单倍型（表 4），单倍型 A₁ 包括 8 条序列，单倍型 A₂ 包括 1 条序列，单倍型 A₃ 包括 2 条序列，单倍型 A₄ 包括 3 条序列，其余柴胡种内均无变异位点。本研究得到的北柴胡主要单倍型 A₁ 及与陈士林主编的《中国药典中药材 DNA 条形码标准序列》^[39]介绍的主导单倍型基本一致。

表 3 藏柴胡及其易混品的 ITS2 序列特征

Table 3 ITS2 sequence characteristics of *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* and its analogues

基源物种	ITS2 长度/bp	平均 GC 量/%	种内变异位点
窄竹叶柴胡	229	62.6	0
北柴胡	233	62.1	4
锥叶柴胡	233	50.3	未知
银州柴胡	229	60.2	0
红柴胡	233	51.7	0

表 4 北柴胡 ITS2 序列种内变异位点信息

Table 4 Intraspecific variation sites information of ITS2 sequences of *Bupleurum chinense*

变异位点/bp	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄
185	C	G	*	*
192	A	*	A	*
194	T	*	*	A
230	G	C	*	C

*表示与单倍型 A₁ 碱基相同

*The same as haplotype A₁ base

藏柴胡与其同属间的变异位点主要集中在第 22、35、40、85、110、181、182、185、220、223 位点, 与北柴胡和红柴胡的变异位点较多, 与锥叶柴胡和银州柴胡的序列相似度较高, 见图 4。

3.5 藏柴胡及其易混品的种内种间遗传距离分析

基于 K2P 模型计算藏柴胡与其易混品的 K2P 距离, 其种内遗传非常稳定, 平均 K2P 遗传距离为 0.001, 种内最大 K2P 遗传距离为 0.004; 柴胡属内种间平均 K2P 遗传距离为 0.054, 种间最小 K2P 遗传距离 0.051, 远远大于藏柴胡的种内最大

遗传距离, 表明 ITS2 能够准确区分藏柴胡及其易混品。

3.6 藏柴胡及其易混品的聚类分析

基于 ITS2 序列构建藏柴胡及其易混品间的 NJ 系统聚类树(图 5)。从聚类树上可以明显看出, 藏柴胡与北柴胡分别聚类, 说明它们与其他柴胡亲缘关系较远较易区分。而柴胡属内其他 3 个物种又单独聚为 3 小支, 且支持率较高, 具有较好的单系性, 说明 ITS2 序列同样适用于亲缘关系较近的柴胡属内各物种的基源鉴别。

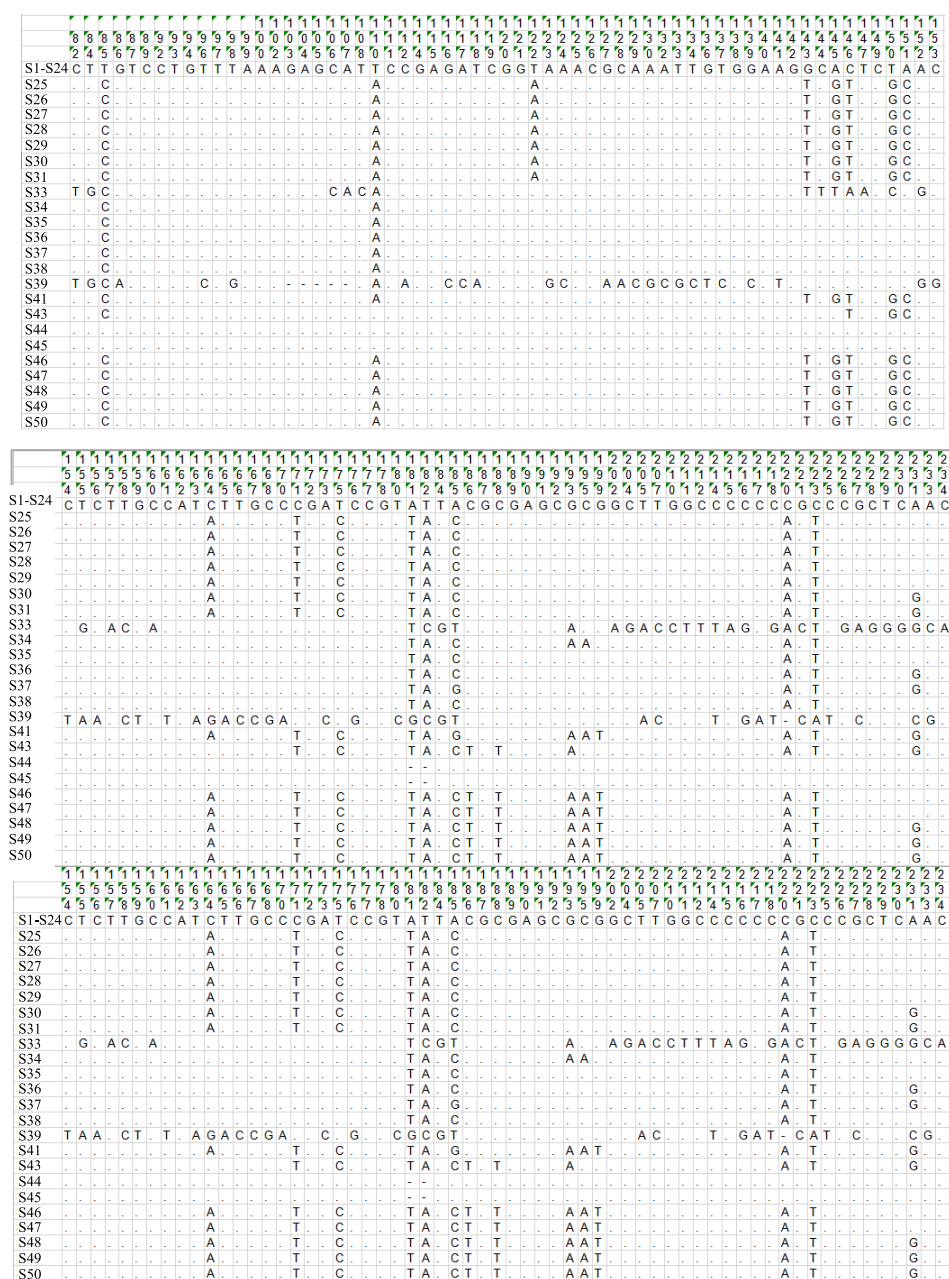
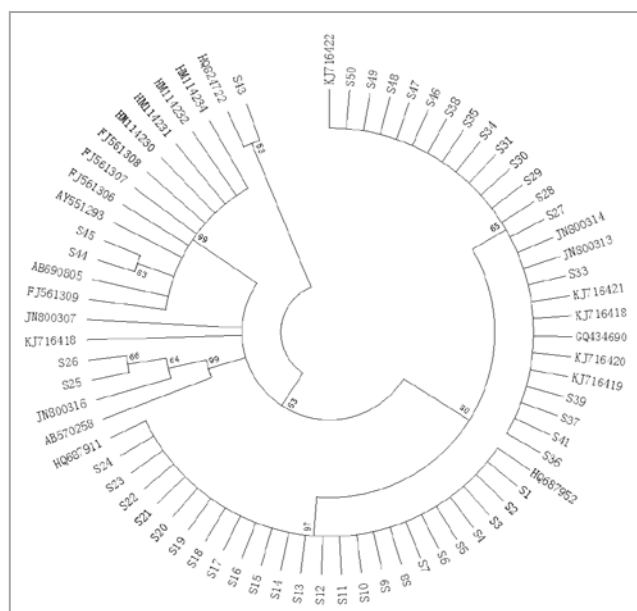


图 4 藏柴胡与其易混品间的 ITS2 序列比对

Fig. 4 ITS2 sequence comparison between *B. marginatum* var. *stenophyllum* and its analogues



Bootstrap 1 000 次重复, 支上数值仅显示自展支持率 $I > 50\%$
Bootstrap scores 1 000 replicates are shown ($> 50\%$) for each branch

图 5 基于 ITS2 序列构建藏柴胡及其易混品 NJ 树

Fig. 5 *B. marginatum* var. *stenophyllum* and its analogues NJ tree based on ITS2 sequence

3.7 藏柴胡及其易混品的 ITS2 二级结构比较

藏柴胡及其易混品的 ITS2 序列二级结构(图 6)都是由中心环和 4 个螺旋区构成, 但是每个螺旋上的茎环结构大小不一、数目各异。其中银州柴胡中心环有 3 个, 结构比较复杂, 而且螺旋 II 区有 3 个环, III 区有 1 个凸起环, 能够显著区别于其他柴胡; 藏柴胡与北柴胡、锥叶柴胡二级结构最大的差异在于中心环的大小, 藏柴胡的中心环明显较小, 其次在 4 个螺旋区也有差异: 藏柴胡在 I 区有 5 个环, 在 II 区有 2 个环, 在 III 区有 7 个环, 在 IV 区有 1 个环; 北柴胡在 I 区有 3 个环, 在 II 区有 1 个环, 在 III 区有 5 个环, 在 IV 区有 2 个环; 锥叶柴胡在 I 区有 3 个环, 在 II 区有 2 个环, 在 III 区有 6 个环, 在 IV 区有 2 个环; 且藏柴胡在 I 区、II 区和 IV 区的长度还有环与环之间的距离都有差异, 也很容易

区分; 而北柴胡和锥叶柴胡的二级结构在螺旋 I、IV 区较为保守, 最大的区别在于 II 区, 北柴胡有 1 个环, 锥叶柴胡有 2 个环, 其次在 III 区, 北柴胡有 5 个环, 而锥叶柴胡有 6 个环。藏柴胡与红柴胡最大的差异在于螺旋 III 区, 首先在数目上藏柴胡有 7 个环, 红柴胡有 6 个环; 其次环的大小以及环与环之间的距离都有差异。由此可见, 通过 ITS2 序列二级结构的分子形态差异也可以准确地鉴别藏柴胡药材与其易混品。

4 讨论

4.1 柴胡药材样品的采集

对本次在甘肃等地采集的 DNA 条形码鉴定的实验材料, 均为健康、新鲜、没被真菌、细菌和病毒等感染的叶片, 采用目前常用的硅胶干燥法取样和保存样品, 确保遗传物质材料的稳定性。为确保

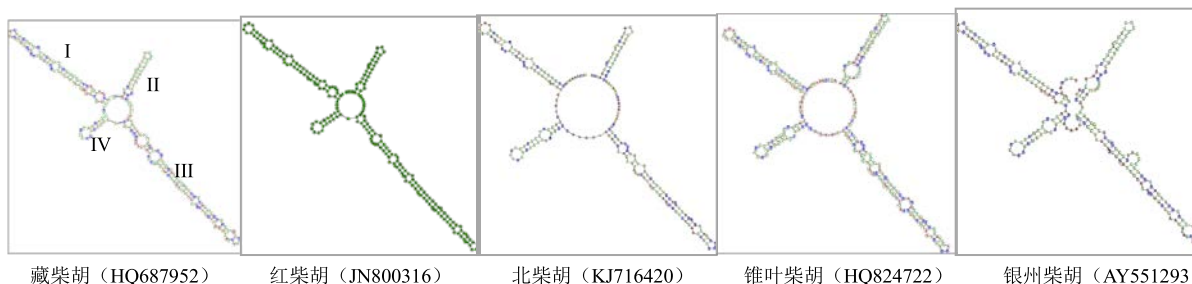


图 6 藏柴胡及其易混品的 ITS2 二级结构

Fig. 6 Secondary structure of ITS2 in *B. marginatum* var. *stenophyllum* and its analogues

鉴定结果的可靠性, 样本均在不同地区的不同位置采集三份。而其余样品为科室留存的植物干根, 为避免土壤中多种感染菌的污染、提高鉴别的准确性, 采用 75%乙醇擦洗表面, 晾干后用刀片取其内部组织备用。

4.2 柴胡药材基因组 DNA 的提取

植物细胞内存在大量次生代谢产物, 如多糖、多酚等^[40], 这些物质在提取 DNA 的过程中与 DNA 共沉淀形成黏稠的胶状物, 难以获得高质量的 DNA, 影响后续的 PCR 扩增实验。加入酚的络合物聚乙烯吡咯烷酮(PVP)和抗氧化剂 β -巯基乙醇, 可以有效地避免提取过程中多酚及多糖的污染。另外可适当增加样品用量和延长水浴时间, 如 56 °C 水浴过夜等, 使得 DNA 充分释放到缓冲溶液中, 获得较高浓度 DNA。

本实验中 32、40、42 号样品未成功提取, 可能原因是所选样品存放时间过久导致 DNA 降解, 所以建议 DNA 条形码鉴定的植物样本最好是新鲜叶片, 若为根茎, 则存放时间不宜太久。

4.3 中药柴胡 DNA 条形码鉴定的意义

首先, DNA 条形码鉴定技术是传统四大经典鉴定方法(原植物(原动物)、性状、显微、理化鉴定)的有效补充。该技术利用标准的 DNA 短片段作为物种标记进行鉴定, 不受个体形态、大小等特征和完整性的影响, 能直接从基因水平上提供丰富的鉴别依据, 可以实现对中药材原植物、饮片、粉末以及细胞、组织等材料来源的准确鉴定, 尤其适合以不同部位入药的中药材的物种鉴定, 有效弥补了经典鉴定方法的不足^[41-43]。本次实验中采用传统鉴别的方法难以确定的“黑柴胡”, 最终以 DNA 条形码鉴定技术确定基源为北柴胡。其次, 建立中药柴胡 DNA 条形码数据库可实现柴胡基源鉴定的标准化。不同物种形态上的差异归根结底都可追溯到 DNA 序列上的差异, 因此, 对基因序列差异的比较无疑为植物分类和中药鉴定提供了最本质的依据。而 DNA 条形码是目前国际上物种鉴定的最新技术, 可为我国柴胡属药用植物提供明确的物种、特别是近缘物种的鉴别信息。再将 DNA 条形码序列数据与计算机信息系统结合起来, 可促进 DNA 条形码技术操作的程序化和规范化, 实现中药鉴定的标准化和自动化, 对中药品种监管工作带来极大便利^[44-45]。最后, DNA 条形码技术可促进中药柴胡新资源的开发利用。目前药典收录 2 种柴胡品种资源现状: 南

柴胡产量很少, 几乎绝种; 北柴胡种植产量低, 野生资源枯竭, 所以寻找新的柴胡药源及替代品成为柴胡资源研究的一个重要方向。通过 DNA 条形码序列构建系统发育树确定柴胡物种间的系统发育关系、分化过程及进化地位, 从分子水平探讨他们之间的遗传关系, 发现分子水平上密切联系的物种, 从而发现可替代的新的柴胡资源物种, 这将大大加快柴胡新资源寻找的进程^[46-48]。相信随着我国中药现代化研究进程的加快, DNA 条形码分子鉴定技术将在中药材基源鉴定、市场流通和开发利用等方面得到广泛应用, 在临床用药安全合理等方面发挥强有力的作用。

参考文献

- [1] 杨进. 关于中医药防治新型冠状病毒肺炎的几点思考 [J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(2): 149-151.
- [2] 徐旭, 张莹, 李新, 等. 各地区中医预防新型冠状病毒肺炎(COVID-19)方案分析 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 866-872.
- [3] 胡伟尚, 吴巧凤. 中药熏蒸防疫历史沿革与现代应用探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 895-901.
- [4] 王延斌. 中医药防治新冠肺炎 疗效导向就是硬道理 [N]. 科技日报, 2020-02-18(002).
- [5] 韩园园, 赵梦冉, 石垚, 等. 中西医结合治疗新型冠状病毒肺炎的应用分析 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 878-882.
- [6] 庞稳泰, 金鑫瑶, 庞博, 等. 中医药防治新型冠状病毒肺炎方证规律分析 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1242-1247.
- [7] 刘菊, 崔瑛, 白明学, 等. 基于中医药预防治疗新型冠状病毒肺炎的用药探析 [J]. 中草药, 51(4): 860-865.
- [8] 赵静, 田赛赛, 杨健, 等. 清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎机制的网络药理学探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 829-835.
- [9] 郑文科, 张俊华, 杨丰文, 等. 中医药防治新型冠状病毒肺炎各地诊疗方案综合分析 [J]. 中医杂志, 2020, 61(4): 277-280.
- [10] Yao R Y, Zou Y F, Chen X F. Traditional use, pharmacology, toxicology, and quality control of species in Genus *Bupleurum* L. [J]. *Chin Herb Med*, 2013, 5(4): 245-255.
- [11] Li D Q, Wu J, Liu L Y, et al. Cytotoxic triterpenoid glycosides (saikosaponins) from the roots of *Bupleurum chinense* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(18): 3887-3892.
- [12] 熊晗晖, 蔡光明, 黄鹤慧, 等. 藏柴胡地上部分有效成分提取工艺的研究 [J]. 中南药学, 2007, 5(3): 214-216.
- [13] 苏丽娟, 王娟, 刘旭恩, 等. 小柴胡汤抗抑郁作用及

- 其对脑内神经递质、神经营养因子和雌性激素的影响研究 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 38-40.
- [14] 杨辉, 杨亮, 蒋玲. 柴胡、竹叶柴胡对小鼠的抗炎镇痛作用研究 [J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4442-4444.
- [15] 谭超, 安文蓉, 刘娟, 等. 大柴胡汤中柴胡、大黄不同配对抗炎镇痛作用的影响 [J]. 西部中医药, 2016, 29(3): 8-10.
- [16] 王丽娜, 汪巍, 徐驰, 等. 柴胡醋制前后抗炎作用比较研究 [J]. 中成药, 2013, 35(5): 1079-1081.
- [17] 王红燕, 郝彩琴, 李军. 柴胡地上部分不同醇提物抑菌活性的初步研究 [J]. 轻工科技, 2018, 34(9): 36-37.
- [18] 贾为壹, 刘佳佳, 胡睿, 等. 小柴胡颗粒激活 Nrf2 通路抗 TAA 致大鼠急性肝损伤的机制探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(8): 54-59.
- [19] 王惠, 冯玛莉, 张越, 等. 醋制藏柴胡对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. 中南药学, 2019, 17(10): 1637-1641.
- [20] 刘丹, 王佳贺. 柴胡皂苷抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(1): 203-208.
- [21] 王文姣. 浅析小柴胡汤在心血管疾病治疗中的作用 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(25): 159-160.
- [22] 严华, 董亚娟, 程显隆, 等. 南柴胡与常见混伪品的鉴别方法研究 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(2): 109-114.
- [23] 王梦迪, 靳光乾. 柴胡中药资源研究进展 [J]. 山东林业科技, 2019, 49(3): 107-110.
- [24] 郭佳琪, 杨印军, 方伟, 等. 藏柴胡以及种植北柴胡和竹叶柴胡的皂苷含量研究 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(1): 34-38.
- [25] 甘肃省食品药品监督管理局. 甘肃省中药材标准 [M]. 兰州: 甘肃省中医药管理局, 2008.
- [26] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药材标准 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2010.
- [27] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2012.
- [28] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [29] Chen S L, Pang X H, Song J Y, *et al.* A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237-1244.
- [30] Yao H, Song J Y, Liu C, *et al.* Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13102.
- [31] Feng S G, Jiang Y, Wang S, *et al.* Molecular identification of *Dendrobium* species (Orchidaceae) based on the DNA barcode ITS2 region and its application for phylogenetic study [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21975-21988.
- [32] 丁锤, 徐莹, 马孝熙, 等. 柴胡属 5 种易混药材的鉴别研究 [J]. 中药材, 2016, 39(9): 1975-1981.
- [33] 李军, 张燃, 于淑萍, 等. 中药材银柴胡及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2019, 54(5): 937-943.
- [34] 吴田泽, 赵小惠, 胡心怡, 等. 中药材 DNA 条形码鉴定技术应用进展 [J]. 中医药导报, 2019, 25(16): 125-130.
- [35] 赵晴, 谢红波, 赵红玲, 等. 中药材种子 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3471-3476.
- [36] Selig C, Wolf M, Muller T, *et al.* The ITS2 Database II: Homology modelling RNA structure for molecular systematics [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 36(Database): D377-D380.
- [37] Koetschan C, Förster F, Keller A, *et al.* The ITS2 Database III—sequences and structures for phylogeny [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(1): D275-D279.
- [38] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [39] 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.
- [40] 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.
- [41] 刘现磊. 浅析中药材的现代鉴定方法 [J]. 中国民康医学, 2019, 31(1): 86-87.
- [42] 吴田泽, 赵小惠, 胡心怡, 等. 中药材 DNA 条形码鉴定技术应用进展 [J]. 中医药导报, 2019, 25(16): 125-130.
- [43] 方强强, 王燕, 彭春, 等. 中药 DNA 条形码分子鉴定技术的应用与展望 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(22): 197-205.
- [44] 杜兴丽, 施明毅. 浅析 DNA 条形码技术在中药溯源中的应用 [J]. 电脑知识与技术, 2019, 15(12): 238-241.
- [45] 熊波, 赵志礼, 倪梁红, 等. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用、局限性与展望 [J]. 中药材, 2015, 38(10): 2202-2206.
- [46] 戚文涛, 李剑超, 王晨, 等. 应用 ITS2 条形码及种子形态鉴定柴胡属种子 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 170-177.
- [47] 王亚丹, 韩晓妮, 赵玉丹, 等. 基于 ITS2 条形码鉴别市售柴胡药材及其混伪品 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3590-3596.
- [48] 陈士林. 《中药分子鉴定技术与应用》评价 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(5): 1011.