

藏药兔耳草常用基原的 ITS2 序列鉴定研究

高必兴^{1,2}, 齐景梁², 钟 红⁴, 马璐琳⁴, 李 倩², 连 艳¹, 蒋桂华^{1*}, 蒋运斌^{3*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 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

3. 西南大学药学院/中医药学院, 重庆 北碚 400715

4. 成都市郫都区中医医院, 四川 成都 611730

摘要: 目的 利用 DNA 条形码内转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2) 序列针对自采及流通使用环节的不同基原兔耳草进行分析, 建立一种快速鉴定常用兔耳草的方法, 并分析市场流通的主流品种。方法 采用试剂盒提取 101 份兔耳草样品的 DNA, 针对其 ITS2 片段进行 PCR 扩增并双向测序, 获取 ITS2 序列信息; 并从 GenBank 上下载相关序列 28 条。运用 MEGA6.0 对 129 条 ITS2 序列进行比对分析, 计算种内和种间 K2P 遗传距离, 构建邻接法 (neighbor-joining, NJ) 系统进化树, 并预测 ITS2 二级结构。采用 BLAST 法及 NJ 聚类分析法分析市场流通兔耳草基原。结果 除四川部分区域所产全缘兔耳草 *Lagotis integra* 与革叶兔耳草 *L. alutacea* 种间亲缘关系近外, 短筒兔耳草 *L. brevifolia*、全缘兔耳草、圆穗兔耳草 *L. ramalana*、革叶兔耳草、短穗兔耳草 *L. brachystachya* 及紫叶兔耳草 *L. praecox* 的种内最大遗传距离均小于种间最小遗传距离, 具有明显的条形码间距。系统进化树显示短筒兔耳草、圆穗兔耳草、短穗兔耳草及紫叶兔耳草单独聚为一支, 四川部分区域所产全缘兔耳草与革叶兔耳草聚为一支, 其余全缘兔耳草聚为一支。通过 ITS2 二级结构发现, 各基原兔耳草在茎环数目、大小及位置均有一定差异, 可区分亲缘关系近的全缘兔耳草与革叶兔耳草。市场分析显示, 市面上流通的兔耳草有 6 种基原, 以全缘兔耳草使用占比最高, 短筒兔耳草次之, 短穗兔耳草及圆穗兔耳草较低, 紫叶兔耳草及革叶兔耳草最低。结论 ITS2 序列可以作为 DNA 条形码用来鉴别常用藏药兔耳草的基原, 市场主流兔耳草品种为全缘兔耳草、短筒兔耳草及短穗兔耳草。

关键词: 兔耳草; ITS2 序列; 短筒兔耳草; 全缘兔耳草; 圆穗兔耳草; 革叶兔耳草; 短穗兔耳草; 紫叶兔耳草; 主流品种
中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)21-6857-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.21.024

Identification of commonly used origins of Tibetan medicine *Lagotidis Herba* based on ITS2 barcode and market analysis

GAO Bi-xing^{1,2}, QI Jing-liang², ZHONG Hong⁴, MA Lu-ling⁴, LI Qian², LIAN Yan², JIANG Gui-hua¹, JIANG Yun-bin³

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Sichuan Institute for Drug Control/Key Laboratory of Quality Evaluation of Chinese Patent Medicines, NMPA, Chengdu 611731, China

3. College of Pharmaceutical Sciences and Chinese Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China

4. Chengdu Pidu District Hospital of TCM, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective To establish a rapid method to identify different origin of *Lagotidis Herba* from self-harvesting and distribution samples based on ITS2 sequences of DNA barcode technology, and analyze the mainstream varieties in the market. **Method** The DNA of 101 *Lagotidis Herba* samples was extracted by using the Plant Genomic DNA Extraction kit, and then their ITS2 sequence was amplified by PCR and sequenced in both directions to obtain the information of ITS2 sequence; Meanwhile, 28 related sequences were downloaded from GenBank. Subsequently, 129 ITS2 sequences were analyzed by MEGA6.0, and the intra- and inter- specific K2P genetic distances were calculated to construct a neighbor joining (NJ) phylogenetic tree and predict the secondary structure of ITS2. The origins of *Lagotidis Herba* in circulation samples were analyzed by the BLAST and NJ cluster analysis methods. **Result** The results showed that the maximum intraspecific genetic distance was far less than the minimum

收稿日期: 2022-03-06

基金项目: 国家食药监总局药化司专项“特色民族药材检验方法示范性研究”; 四川省药品监督管理局科技计划项目 (2021002); 国家自然科学基金项目 (82173928); 四川省科技厅应用基础研究计划课题 (2020YJ0369); 四川省中医药管理局项目 (2021MS022); 四川省民族药标准提升项目 (S10201202200504)

作者简介: 高必兴, 男, 主管中药师, 主要从事中药及民族药质量研究。E-mail: laughao@foxmail.com

通信作者: 蒋桂华, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事中药及民族药研究。Tel: 18980923782 E-mail: 11469413@qq.com

蒋运斌, 男, 讲师, 主要从事民族药研究。E-mail: yunbinjiang@swu.edu.cn

interspecific genetic distance among *Lagotis brevifolia*, *L. integra*, *L. ramalana*, *L. alutacea*, *L. brachystachya* and *L. praecox*, except *L. integra* from some areas of Sichuan and *L. alutacea*, indicating there were an obvious barcoding gap among them. The NJ tree showed that *L. brevifolia*, *L. ramalana*, *L. brachystachya* and *L. praecox* shared respectively a clade, and *L. integra* from some areas of Sichuan and *L. alutacea* shared a clade, and other *L. integra* shared a clade. ITS2 secondary structures for six kinds of *Lagotis Herba* were significantly different enough to identify *L. integra* and *L. alutacea*, and the difference were the number, size and location of the stem ring. Market analysis showed that the usage rate of different origins of *L. herba* from high to low was *L. integra*, *L. brevifolia*, *L. brachystachya* and *L. ramalana*, *L. praecox* and *L. alutacea*. **Conclusion** The ITS2 sequence can be used as DNA barcode to identify the origins of *Lagotis Herba* accurately and quickly. Market mainstream varieties were *L. integra*, *L. brevifolia* and *L. brachystachya*.

Key words: *Lagotis Herba*; ITS2 barcode; *Lagotis brevifolia* Maxim.; *Lagotis integra* W. W. Smith; *Lagotis ramalana* Batalin; *Lagotis alutacea* W. W. Smith; *Lagotis brachystachya* Maxim.; *Lagotis praecox* W. W. Smith; mainstream varieties

藏药“兔耳草”基原之一的短筒兔耳草 *Lagotis brevifolia* Maxim. 收载于《中国药典》2020 年版一部，藏文音译名为“洪连”，药用部位为全草，应用广泛，药用价值高，具有清热、解毒、利湿、平肝、行血、调经等功效，可用于发热烦渴、肺热咳嗽、头痛眩晕、湿热黄疸、月经不调、药食中毒等证^[1]，主要分布于我国青海省。通过前期调研发现，市售及临床使用的兔耳草除短筒兔耳草外，还有多种兔耳草属植物均被使用^[2]，但目前传统鉴别方法难以将其区分，无法了解市场总体的兔耳草使用情况，因此亟待一种有效的鉴别方法将其区分。

DNA 分子鉴定技术是利用基因组中一段公认标准的、相对较短的 DNA 片段来进行物种鉴定的分子诊断技术，不依赖物种的形态特征和分类经验^[3]。《中国药典》2020 年版四部通则收载了中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则，其中内转录间隔区 2 (internal transcribed spacer 2, ITS2) 作为中药材鉴定的标准 DNA 条形码^[4]。现兔耳草的研究多集中在成分^[5-6]、指纹图谱^[2]、药理^[7]等方面，鲜见兔耳草 DNA 条形码的相关报道。本研究以 DNA 条形码 ITS2 序列为基础，对所收集的样品和网站下载的相关 ITS2 序列进行研究分析，以期建立一种快速准确的鉴别方法，为兔耳草品种的鉴别及使用提供科学依据。

1 仪器与试剂

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 型球磨仪 (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×Taq Master Mix 缓冲

液、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。

收集兔耳草相关样品共计 101 批次，其中自采 42 批，购买 59 批，经四川省药品检验研究院黎跃成主任中药师鉴定为全缘兔耳草 *L. integra* W. W. Smith、革叶兔耳草 *L. alutacea* W. W. Smith、短筒兔耳草 *L. brevifolia* Maxim.、短穗兔耳草 *L. brachystachya* Maxim.、紫叶兔耳草 *L. praecox* W. W. Smith、圆穗兔耳草 *L. ramalana* Batalin，样品来源见表 1。同时于 GenBank 数据库中下载 28 条 ITS2 序列，包括全缘兔耳草 7 条，革叶兔耳草 2 条，短筒兔耳草 3 条，短穗兔耳草 14 条，紫叶兔耳草 1 条，圆穗兔耳草 1 条。ITS2 序列信息见表 2。

2 方法

2.1 DNA 提取

用 75% 乙醇擦拭样品表面，自然晾干后，用球磨仪研磨成粉末，称取粉末约 30 mg，按照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书 (天根生化科技有限公司) 进行操作，提取 DNA，-20 °C 保存备用。

2.2 PCR 扩增及测序

选取通用引物 ITS2F (5'-ATGCGATACTTGGTGTGAAT-3') 和 ITS3R (5'-GACGCTTCTCCAGACTACAAT-3') 对样品 DNA 进行扩增。反应体系为 50 μL，包含 2×Taq Master Mix 缓冲液 25 μL、上下游引物各 2 μL、DNA 模板 5 μL，加灭菌超纯水至 50 μL。阴性对照为无模板 DNA 的反应体系。以 10 000 r/min 离心 (离心半径为 3 cm) 5 s 后，置于 PCR 仪中。反应程序为 95 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s、56 °C 退火 30 s、72 °C 延伸

表 1 不同基原兔耳草样品信息

Table 1 Sample information sheet of different origins of *Lagotis Herba*

编号	基原	来源	获取方式
HL-1	全缘兔耳草	德格县藏医院	购买
HL-2		宗萨藏医院	购买
HL-3		石渠县藏医院	购买
HL-4		四川省甘孜州石渠县洛须镇第一个垭口	自采
HL-5		四川省甘孜州石渠县洛须镇分叉口前行雪山	自采
HL-6		乡城县藏医院	购买
HL-7		甘孜州药检所	购买
HL-8		宇妥藏药（批次 201806）	购买
HL-9		四川省甘孜州石渠县德荣马乡	自采
HL-10		凉山州木里藏族自治县中藏医院	购买
HL-11		得荣藏医院	购买
HL-12		阿坝县藏医院	购买
HL-13		阿坝州藏医院	购买
HL-14		若尔盖藏医院	购买
HL-15		白玉县藏医院	购买
HL-16		理塘县藏医院	购买
HL-17		居麦旁藏药	购买
HL-18		青海果洛州藏医院	购买
HL-19		青海省海东市乐都区	自采
HL-20		青海省囊谦县藏医院	购买
HL-21		金珂藏药	购买
HL-22		青海省黄南州藏医院	购买
HL-23		青海省玉树藏族自治州藏医院	购买
HL-24		青海省八一路药材市场	购买
HL-25		青海省班玛县藏医院	购买
HL-26		西藏拉萨蓝屋石药材公司	购买
HL-27		西藏药检所	购买
HL-28		西藏诺迪康药业有限公司	购买
HL-29		西藏山南市错那县波拉山	自采
HL-30		西藏自治区拉萨市墨竹工卡县思金拉错	自采
HL-31		西藏藏医学院藏药有限公司	购买
HL-32		西藏错那雷达站	自采
HL-33		西藏拉萨市当雄县羊八井镇雪古拉山	自采
HL-34		西藏自治区拉萨市墨竹工卡米拉山	自采
HL-35		红原藏医院	购买
HL-36		云南药检所	购买
HL-37		四川省甘孜州理塘县兔耳山垭口	自采
HL-38		四川省甘孜州雅江县柯拉山上	自采
HL-39		四川省甘孜州理塘县拉波乡拉德村	自采
HL-40		四川省甘孜州理塘县藏坝乡	自采
HL-41		四川省甘孜州稻城海子山垭口	自采
HL-42		四川省甘孜州藏医院	自采
HL-43		四川省甘孜州巴塘县海子山姐妹湖	自采
HL-44		四川省甘孜州理塘县拉波乡拉美村	自采
HL-45		四川省甘孜州巴塘县海子山垭口	自采
HL-46		四川省甘孜州雅江县垭口前行 3 km	自采
HL-47	革叶兔耳草	云南省迪庆州白马雪山第一垭口	自采
HL-48		云南省迪庆州白马雪山第二垭口	自采
HL-49		迪庆藏医院	购买
HL-50		甘南州藏医院	购买
HL-51		四川阿坝年宝叶则	自采
HL-52		西藏自治区拉萨市墨竹工卡县思金拉错	自采

续表 1

编号	基原	来源	获取方式
HL-53	短筒兔耳草	青海省海南藏族自治州泽库县	自采
HL-54		青海藏医院	购买
HL-55		四川色达县藏医院	购买
HL-56		青海省藏医院	购买
HL-57		青海省海南州藏医院	购买
HL-58		青海三智商贸有限公司	购买
HL-59		青海省湟中县藏医院	购买
HL-60		青海省果洛州藏医院	购买
HL-61		四川阿坝州藏医院	购买
HL-62		荷花池药材市场（产地西藏）	购买
HL-63		青海省贵南县马营镇直亥雪山	自采
HL-64		青海省海南州兴海县	自采
HL-65		青海省果洛州	自采
HL-66		青海省西宁市大通回族土族自治县	自采
HL-67		青海省门源回族自治县岗什卡雪峰	自采
HL-68		青海省藏瀚阁	购买
HL-69		青海大东树山	自采
HL-70		青海省奥阿塔生物医药科技商贸有限公司西宁分公司	购买
HL-71		青海省八一路药材市场	购买
HL-72		甘肃武夷天柱县旦马乡	自采
HL-73		青海泽库县藏医院	购买
HL-74		青海优润堂商贸有限公司	购买
HL-75		移多藏药	购买
HL-76		西藏奇正药业	购买
HL-77	短穗兔耳草	藏瀚阁	购买
HL-78		青海省海晏县三联村	自采
HL-79		西藏（西藏医学院吴老师收）	购买
HL-80		青海省八一路药材市场	购买
HL-81		荷花池中药材专业市场	购买
HL-82		迪庆州藏医院	购买
HL-83		甘孜药检所（石渠县城关五村）	购买
HL-84		西藏昌都藏医院	购买
HL-85		青海省果洛州玛沁县 227 国道靠近威日格	自采
HL-86		青海省果洛州玛沁县拉加镇	自采
HL-87	紫叶兔耳草	四川省甘孜州理塘县拉波乡拉德村	自采
HL-88		四川阿坝藏医院	购买
HL-89		四川省甘孜州理塘县德巫乡	自采
HL-90		云南省迪庆州白马雪山第二垭口	自采
HL-91		四川省甘孜州巴塘县禾尼乡山上	自采
HL-92	圆穗兔耳草	青海省奥阿塔生物医药科技商贸有限公司西宁分公司	购买
HL-93		色达藏医院	购买
HL-94		四川省甘孜州德格县	自采
HL-95		四川省甘孜州宗萨县	自采
HL-96		四川省阿坝州壤塘县中壤塘乡中壤塘村	自采
HL-97		青海海南州藏医院	购买
HL-98		四川省阿坝州小金县美沃乡	自采
HL-99		四川省阿坝州若尔盖藏医院	购买
HL-100		阿坝州药检所	购买
HL-101		青海优润堂商贸有限公司	购买

表 2 不同基原兔耳草 ITS2 序列的 GenBank 登录号信息

Table 2 GenBank login number information of ITS2 sequence for different origins of *Lagotis Herba*

名称	GenBank 登录号
全缘兔耳草	KC413431.1、KC413433.1、KC413434.1、KC413435.1、KJ630574.1、KU508311.1、KU508316.1
革叶兔耳草	KC413410.1、KC413411.1
短筒兔耳草	KC413418.1、KC413420.1、KU508315.1
短穗兔耳草	AF313027.1、KC413414.1、KC413415.1、KC413416.1、KC413417.1、KU508310.1、KU508312.1、KU508313.1、KU508314.1、OK275352.1、OK275354.1、OK275355.1、OK275356.1、OK275357.1
紫叶兔耳草	AF313029.1
圆穗兔耳草	KC413445.1

45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测以确定成功率及目的条带片段大小, 扩增产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

2.3 数据分析

应用 CodonCode Aligner V6.0 对测序所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(HMMer)的注释方法去除 5.8 S 和 28 S 区段, 即可获得 ITS2 序列信息。

采用 BLAST 法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^[10]对实验样品的不同单倍型序列进行 BLAST 鉴定分析。

应用 MEGA6.0 软件进行序列比对, 对序列的变异位点进行分析, 不同物种的单倍型为 A1、B1, 同一物种存在变异位点的单倍型为 A1、A2; 并基于 K2P 模型计算种内、种间遗传距离, 利用邻接法(neighbor-joining, 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。

登录 <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。

3 结果与分析

3.1 序列信息分析

短筒兔耳草、短穗兔耳草、紫叶兔耳草及圆穗兔耳草的 ITS2 序列长度均为 202 bp, 全缘兔耳草与革叶兔耳草的 ITS2 序列长度为 203 bp。所有样品 GC 量为 59.4%~62.7%, 平均 GC 量为 61.02%。

6 种兔耳草间存在 32 个变异位点, 种内革叶兔耳草、紫叶兔耳草及圆穗兔耳草的 ITS2 序列变异较小, 不存在变异位点, 形成 1 个单倍型; 全缘兔耳草、短筒兔耳草、短穗兔耳草 ITS2 序列分析分别存在 7、3、2 个种内变异位点, 分别形成 5、3、2 个单倍型。

3.2 K2P 遗传距离分析

短筒兔耳草、全缘兔耳草、革叶兔耳草、短穗兔耳草、紫叶兔耳草及圆穗兔耳草种内和种间遗传距离见表 3, 结果显示, 除全缘兔耳草与革叶兔耳草种间与种内遗传距离有部分重合外, 种内最大遗传距离 0~0.015; 除全缘兔耳草与革叶兔耳草外, 种间最小遗传距离 0.016~0.023, 种内最大遗传距离远小于种间最小遗传距离, 具有明显的条形码间距(barcoding gap), 说明 K2P 距离可很好地区分开此 6 种兔耳草, 但无法完全区分全缘兔耳草与革叶兔耳草。

表 3 不同基原兔耳草的种内种间遗传距离分析

Table 3 Analysis of intraspecific and interspecific genetic distances of different origins of *Lagotidis Herba*

物种	种内(种间)遗传距离					
	短筒兔耳草	全缘兔耳草	短穗兔耳草	圆穗兔耳草	革叶兔耳草	紫叶兔耳草
短筒兔耳草 0	0.028 (0.026~0.041)	0.028 (0.026~0.035)	0.037 (0.029~0.045)	0.029 (0.026~0.035)	0.029 (0.026~0.035)	0.029 (0.026~0.035)
全缘兔耳草 0.028 (0.026~0.041)	0	0.033 (0.029~0.045)	0.043 (0.038~0.051)	0.003 (0.006~0.011)	0.034 (0.032~0.042)	0.034 (0.032~0.042)
短穗兔耳草 0.028 (0.026~0.035)	0.033 (0.029~0.045)	0	0.035 (0.029~0.042)	0.029 (0.029~0.033)	0.026 (0.025~0.029)	0.026 (0.025~0.029)
圆穗兔耳草 0.037 (0.029~0.045)	0.043 (0.038~0.051)	0.035 (0.029~0.042)	0	0.041 (0.038~0.045)	0.016 (0.016~0.023)	0.016 (0.016~0.023)
革叶兔耳草 0.029 (0.026~0.035)	0.003 (0.006~0.011)	0.029 (0.029~0.033)	0.041 (0.038~0.045)	0	0.032	0.032
紫叶兔耳草 0.029 (0.026~0.035)	0.034 (0.032~0.042)	0.026 (0.025~0.029)	0.016 (0.016~0.023)	0.032	0	0

3.3 聚类分析

基于 ITS2 序列构建兔耳草及其易混品间的 NJ 系统聚类树, Bootstrap 1000 次重复, 支上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$, 见图 1。可以看出, 除全缘兔耳草与革叶兔耳草外, 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。四川甘孜所产全缘兔耳草均与革叶兔耳草聚为一支, 其他均单独聚为一支。

3.4 ITS2 二级结构分析

因全缘兔耳草聚成了 2 类, 故分别建立其二级

结构, 根据 ITS2 二级结构预测数据库网站得到 7 类兔耳草(短筒兔耳草、全缘兔耳草 I 类、全缘兔耳草 II 类、革叶兔耳草、短穗兔耳草、紫叶兔耳草及圆穗兔耳草)的二级结构模型, 见图 2。通过茎环数目、大小及位置能有效区分, 分析结果如下: 均为典型的 1 环 4 臂结构, 即 1 个中心环(主环)及 4 个螺旋区(helix), 每个螺旋上又有大小、或多或少的茎环(loop)结构, 其中螺旋 III 最长。

通过茎环数目(表 4)可区分短筒兔耳草、短穗兔耳草、紫叶兔耳草及圆穗兔耳草, 但无法区分

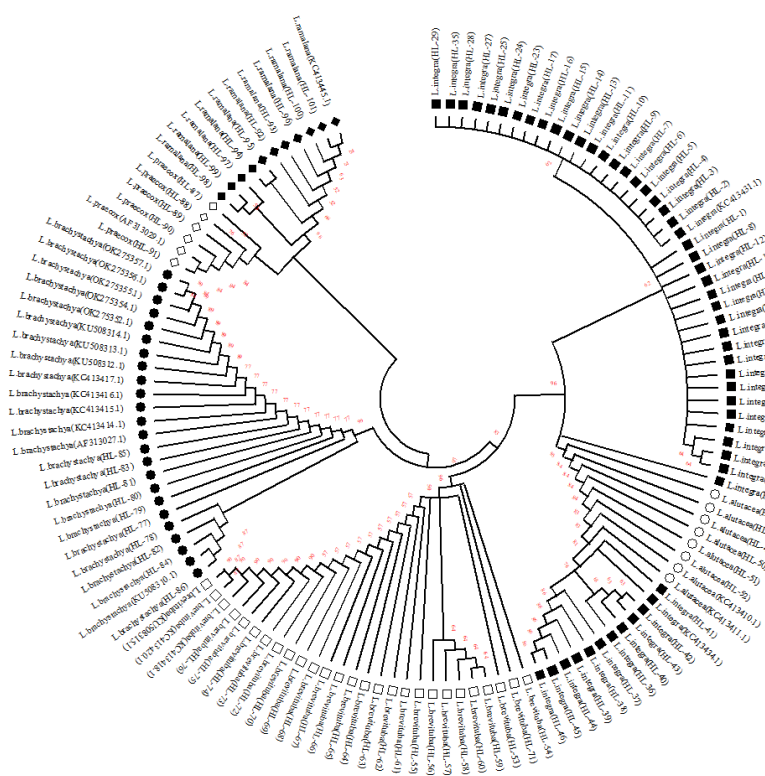


图 1 基于 ITS2 序列构建不同基原兔耳草的 NJ 树

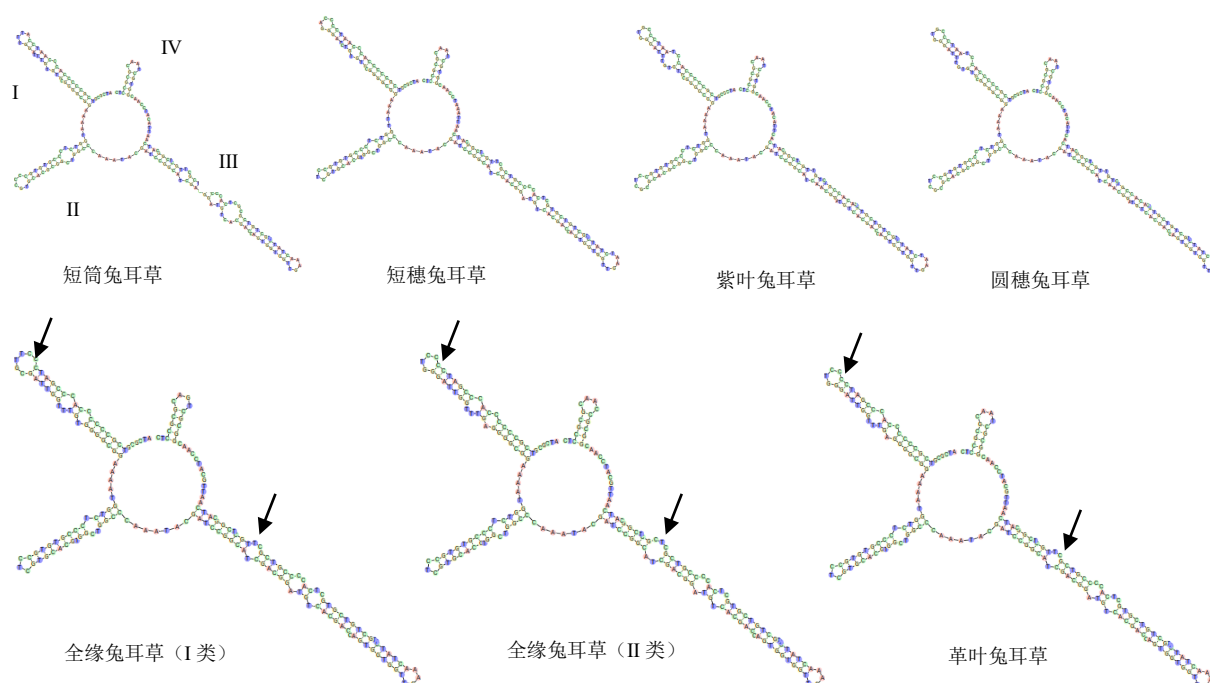
Fig. 1 NJ tree of different origins of *Lagotidis Herba* according to ITS2 sequences

图 2 不同基原兔耳草的 ITS2 二级结构

Fig. 2 Secondary structures of ITS2 sequences of different origins of *Lagotidis Herba*

表 4 不同基原兔耳草的茎环数目

Table 4 Number of stem loops of different origins of *Lagotis Herba*

基原	茎环数目			
	螺旋 I	螺旋 II	螺旋 III	螺旋 IV
短筒兔耳草	2	2	4	1
全缘兔耳草 (I 类)	3	2	4	1
全缘兔耳草 (II 类)	3	2	4	1
短穗兔耳草	2	2	4	1
圆穗兔耳草	2	2	2	1
革叶兔耳草	3	2	4	1
紫叶兔耳草	2	2	2	1

全缘兔耳草 I 类、全缘兔耳草 II 类及革叶兔耳草。但通过茎环的大小及位置可以区分三者，螺旋 I 中三者均具有 3 环，但全缘兔耳草 I 类第一环大小大于第 2 环及第 3 环，全缘兔耳草 II 类与革叶兔耳草 3 环大小相似，但在螺旋 III 中全缘兔耳草 II 类第一环大小大于其余 3 环，而革叶兔耳草 4 环大小相似，能将其区分。

3.5 不同基原兔耳草在市场中的使用情况

针对购买的兔耳草样品 (59 批)，基于 NCBI 的 BLAST 鉴定结果和 NJ 系统聚类树分析结果表面，6 种兔耳草均有使用，以全缘兔耳草 (27 批，占总批次的 45.8%) 占比最高，短筒兔耳草 (16 批，占总批次的 27.1%) 次之，短穗兔耳草 (7 批，占总批次的 11.9%) 及圆穗兔耳草 (6 批，占总批次的 10.2%) 较低，紫叶兔耳草 (1 批，占总批次的 1.7%) 及革叶兔耳草 (2 批，占总批次的 3.4%) 最低。

4 讨论

传统的鉴别方法难以将 6 种兔耳草的基原完全区分，故使用《中国药典》2020 年版四部通则^[4]收载的中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则的 ITS2 作为该药材鉴定的方法。其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^[10]，同时本研究在 ITS2 一级核酸序列的基础上，对其二级结构也进行了预测，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^[11]，可以作为 DNA 条形码鉴别中药材的辅助手段。结合 ITS2 一级结构与二级结构的

分析可以区分此 6 种基原。此方法可用于洪连基原种的鉴别，无疑是对洪连资源的合理开发与利用有着非常重要的价值。

本研究通过聚类分析及 K2P 遗传距离分析可知，全缘兔耳草与革叶兔耳草的亲缘关系非常近；紫叶兔耳草及圆穗兔耳草亲缘关系也近，以大于 50% 的置信度聚为一支，同时有着所有种最低的种间遗传距离 (0.016~0.023)。同时通过聚类分析还发现，中国植物志中归属于兔耳草属分萼组的短穗兔耳草、紫叶兔耳草及圆穗兔耳草以 97% 的置信度聚为一大支，归属于兔耳草属合萼组的短筒兔耳草、全缘兔耳草及革叶兔耳草以 83% 的置信度聚为一大支，从分子生物学的角度验证了其归属的可信度。

市场使用情况分析可知，以国家药品标准收载的短筒兔耳草及全缘兔耳草使用得最为普遍，地方标准收载的短穗兔耳草、圆穗兔耳草及革叶兔耳草的使用次之，未被标准收载的紫叶兔耳草使用的最低。有必要增加紫叶兔耳草的质量标准研究，规范其用药的安全及有效性。同时从自采的批次 (短筒兔耳草 8 批、全缘兔耳草 19 批、革叶兔耳草 4 批、短穗兔耳草 3 批、紫叶兔耳草 4 批及圆穗兔耳草 4 批) 也可以看出，全缘兔耳草的资源较其他资源更为丰富，短筒兔耳草现为国家保护植物，常年的采摘导致其资源的匮乏，以资源更为丰富的全缘兔耳草来代替短筒兔耳草，以缓解其资源的劣势。

综上所述，DNA 分子鉴定技术的 ITS2 序列可鉴别市场中常见的 6 种兔耳草，其中短穗兔耳草又作为药材“志达萨增”使用，其收载的功效均与传统的洪连相悖^[12-15]；同时圆穗兔耳草、短筒兔耳草及紫叶兔耳草同属于“雄洪连”，全缘兔耳草与革叶兔耳草属“雌洪连”，雄洪连的临床疗效优于雌洪连^[2]，但现有研针对此 6 种兔耳草的化学成分和药效学研究甚少^[9]，仍需进一步深入研究，为其资源的合理开发及使用奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 129.
- [2] 高必兴, 苟琰, 齐景梁, 等. 多基原兔耳草 HPLC 指纹图谱对比研究 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4019-4024.
- [3] 夏召弟, 刘霞, 冯玛莉, 等. 基于 ITS2 条形码鉴定藏柴胡及其易混品 [J]. 中草药, 2020, 51(23): 6062-6069.

- [4] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 126.
- [5] 何芳, 齐景梁, 李倩, 等. 基于环烯醚萜苷成分的不同基原兔耳草及药用部位差异性研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(7): 1019-1023.
- [6] 何芳, 高必兴, 赵春艳, 等. 藏药兔耳草的生药学研究 [J]. 中药材, 2020, 43(4): 824-830.
- [7] 高必兴, 何芳, 齐景梁, 等. 蒋运斌. 3 种形态全缘兔耳草不同药用部位中 6 种成分测定 [J]. 中成药, 2022, 44(5): 1521-1526.
- [8] 高必兴, 何芳, 齐景梁, 等. 常用兔耳草类药材的 6 种有效成分含量对比研究 [J]. 中草药, 2022, 53(9): 2810-2817.
- [9] 朱继孝, 张红阳, 钟国跃, 等. 藏族药兔耳草属药用植物化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(12): 214-222.
- [10] 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: 23.
- [11] 齐景梁, 高必兴, 苟琰, 等. 基于 ITS2 序列的竹叶花椒及其近缘种药材鉴别 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 786-791.
- [12] 中华人民共和国卫生部药品标准: 藏药第一册 [S]. 1995.
- [13] 云南省药品标准 [S]. 云南大学出版社, 1996: 84.
- [14] 四川省藏药材标准 [S]. 四川省科技出版社, 2020: 185.
- [15] 青海省藏药材标准 [S]. 甘肃民族出版社, 2019: 105.

[责任编辑 时圣明]