

当归简单重复序列区间-聚合酶链反应体系的建立及优化与品种(系)间遗传关系研究[△]

朱田田^{1,2*}, 张裴斯¹, 晋玲^{1#}, 刘效瑞³, 李应东⁴, 刘进¹(1. 甘肃中医学院中(藏)药资源研究所, 兰州 730000; 2. 甘肃中医学院药用植物遗传育种研究所, 兰州 730000; 3. 甘肃定西市旱作农业科研推广中心, 甘肃定西 743000; 4. 甘肃中医学院附属医院, 兰州 730000)

中图分类号 R282;R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3265-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.01

摘要 目的:建立并优化当归简单重复序列区间(ISSR)-聚合酶链反应(PCR)体系并对6个当归品种(系)的遗传关系进行研究。方法:以ISSR-PCR扩增结果为指标, Mg²⁺浓度、TaqDNA聚合酶活性、dNTPs浓度、引物浓度、DNA模板用量为5因素,通过正交、单因素试验优化ISSR-PCR体系。应用优化体系对6个不同品种(系)的当归样本进行遗传关系分析。结果:当归ISSR-PCR最佳反应体系为在20 μl反应体系中含Mg²⁺(10×PCR Buffer)1.5 mmol/L、TaqDNA聚合酶0.6 U、dNTPs 0.375 mmol/L、引物0.3 μmol/L、DNA模板42 ng。6个当归品种(系)的多态性位点百分率为13.04%, Nei's基因多样性指数为0.058 0, Shannon多样性指数为0.082 7。结论:建立的当归ISSR-PCR体系可用于当归分子遗传学研究,6个当归品种(系)间遗传差异较小。

关键词 当归;简单重复序列区间聚合酶链反应体系;建立;遗传关系

Establishment and Optimization of ISSR-PCR Reaction System for *Angelica sinensis* and Genetic Relationship Study of Different Varieties or Strains

ZHU Tian-tian^{1,2}, ZHANG Pei-si¹, JIN Ling¹, LIU Xiao-rui³, LI Ying-dong⁴, LIU Jin¹(1. Research Institute of Chinese (Tibetan) Medicinal Resources, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China; 2. Institute of Medicinal Plant Genetics and Breeding, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China; 3. Dingxi Center for Dryland Farming Research and Extension in Gansu Province, Gansu Dingxi 743000, China; 4. Affiliated Hospital of Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish and optimize ISSR-PCR reaction system for *Angelica sinensis*. METHODS: The ISSR-PCR reaction system were optimized by orthogonal design and single-factor design with ISSR-PCR amplification as index using Mg²⁺ concentration, TaqDNA polymerase activity, dNTPs concentration, primer concentration, template DNA concentration as factors. The genetic relationship of 6 varieties or strains of *A. sinensis* were analyzed by optimized system. RESULTS: The optimum reaction system(20 μl) contained 1.5 mmol/L Mg²⁺(10×PCR Buffer), 0.6 U TaqDNA polymerase, 0.375 mmol/L dNTPs, 0.3 μmol/L ISSR primer and 42 ng/20 μl DNA template. The average percentage of polymorphic bands (PPB) of 6 different varieties or strains of *A. sinensis* was 13.04%, Nei's genetic diversity index (He) and Shannon's information index (I) were 0.058 0 and 0.082 7. CONCLUSIONS: The established ISSR-PCR reaction system can be used to study molecular genetics of *A. sinensis*. The genetic differences among 6 varieties or strains of *A. sinensis* are small.

KEYWORDS *Angelica sinensis*; ISSR-PCR reaction system; Establishment; Genetic relationship

当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 具有补血活血、调经止痛、润燥滑肠之功效^[1], 是甘肃省的主要道地药材之一, 具有悠久的人工栽培历史^[2]。目前, 甘肃省大面积栽培的当归品种(系)主要通过系统选育获得, 由于在育种过程中所使用的材

料主要集中在少数优良品种或品系上, 使得所选育的新品种在外观形态上极为相似, 仅依靠表型特征研究品种(系)间的遗传差异准确性较低。因此, 利用分子生物学方法鉴别当归不同品种(系)间的遗传关系十分必要。简单重复序列区间(ISSR)分子标记技术具有适用性广、重复性好、多态性高、成本低, 为显性标记等优点^[3], 已在药用植物品种鉴定、种质资源和遗传多样性研究等方面被广泛应用, 但不同种类植物的ISSR-聚合酶链反应(PCR)体系不同, 且其稳定性也受多种因素影响^[4-6]。因此, 本研究将建立适用于当归的ISSR-PCR反应体系, 对影响其稳定性的各个因素进行优化, 并应用优化后的体系对不同当归品种(系)间的遗传关系进行研究, 旨在为当

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81360605); “十二五”国家科技支撑计划课题(No.2011BAI05B02); 甘肃省自然科学基金资助项目(No.1308RJZA127)

* 讲师, 硕士。研究方向: 中药资源开发与质量综合评价。电话: 0931-8765393。E-mail: ztt0935@163.com

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 珍稀濒危和大宗常用中药资源可持续利用。电话: 0931-8765304。E-mail: zyxyjl@163.com

归新品种(系)选育提供科学参考,并为深入开展当归种源鉴定、遗传多样性分析、优良性状标记等研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

梯度 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司); GelDoc XR System 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); DYY-7 型电泳仪(北京市六一仪器厂); TGL16M 型台式高速冷冻离心机(湖南凯达科学仪器有限公司); UV-1102 型紫外分光光度计(上海天美科学仪器有限公司)。

1.2 植物材料

植物材料于 2013 年 6 月采自“十二五”科技支撑计划(No.2011BAI05B02)课题组实验基地(甘肃省漳县,东经 104°13.375',北纬 34°46.228',海拔 2 305 m),为定西市旱农中心选育的不同品种(系)当归的幼苗(见表 1)。采样时选取无病虫害的幼嫩叶片,每个品种(系)取 3 株,放入硅胶中迅速干燥后带回实验室, -25 °C 贮藏。全部样品由甘肃中医学院中药资源教研室晋玲教授鉴定为伞形科植物当归 *A. sinensis* (Oliv.) Diels 的叶片。

表 1 药材信息

Tab 1 Information of medicinal materials

编号	品种(系)	采样数(株)
1	岷归1号	3
2	岷归2号	3
3	岷归4号	3
4	岷归5号	3
5	DG 2005-03	3
6	DGA 2000-01	3

1.3 试剂

Tris 碱、EDTA、PVP (DH267-1)、 β -巯基乙醇、乙酸钠、RNaseA、琼脂糖、EB、 Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、DNA 试剂提取盒均购自西安科昊生物工程有限责任公司; ISSR 随机引物(根据 British Columbia 大学公布的序列设计,由南京金斯瑞生物科技有限公司合成); 其余试剂均为国产分析纯(天津市百世化工有限公司)。

2 方法

2.1 基因组 DNA 的提取与检验

采用改良十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)法^[7]提取每个品种(系)混合植株样本基因组 DNA,利用紫外分光光度计测定其纯度,用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 是否降解。将样品适当稀释后, -20 °C 贮藏,用于 ISSR-PCR 反应条件的优化试验。

2.2 ISSR-PCR 体系优化

2.2.1 ISSR-PCR 体系正交试验 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验确定 PCR 反应中 5 个因素(Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、引物和 DNA 模板)的最佳水平组合,引物选用 UBC-826,总反应体系为 20 μ l。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 45 s, 58 °C(理论退火温度)45 s, 72 °C 延伸 2 min, 40 个循环;72 °C 延伸 7 min, 4 °C 贮藏。扩增结束后,反应产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳缓冲液为 1×TBE, 110 V 电压下电泳 90 min 左右,EB(10 mg/ml)染色 15 min,置凝胶成像系统下检测并照相。ISSR-PCR 体系正交试验设计见表 2。

2.2.2 ISSR-PCR 体系单因素试验 根据正交试验结果,选择扩增效果较好的反应体系,在此基础上采用单因素试验设计,

表 2 ISSR-PCR 体系正交试验设计

Tab 2 Orthogonal design of ISSR-PCR system

序号	Mg^{2+} ,mmol/L	TaqDNA 聚合酶,U	dNTPs,mmol/L	引物, μ mol/L	DNA 模板,ng
1	1.0	0.5	0.125	0.2	18
2	1.0	1.0	0.250	0.3	24
3	1.0	1.5	0.375	0.4	30
4	1.0	2.0	0.500	0.5	36
5	1.5	1.0	0.125	0.4	36
6	1.5	0.5	0.250	0.5	30
7	1.5	2.0	0.375	0.2	24
8	1.5	1.5	0.500	0.3	18
9	2.0	1.5	0.125	0.5	24
10	2.0	2.0	0.250	0.4	18
11	2.0	0.5	0.375	0.3	36
12	2.0	1.0	0.500	0.2	30
13	2.5	2.0	0.125	0.3	30
14	2.5	1.5	0.250	0.2	36
15	2.5	1.0	0.375	0.5	18
16	2.5	0.5	0.500	0.4	24

进一步优化影响扩增效果的因素。选取扩增条带相对清晰的随机引物 UBC-826,对影响当归 ISSR-PCR 体系的各个因素(Mg^{2+} 、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、引物和 DNA 模板)设置不同梯度浓度,每一个最佳条件确定后作为后续研究的一个条件。PCR 扩增程序和电泳检测条件与正交试验设计相同。ISSR-PCR 体系单因素试验设计见表 3。

表 3 ISSR-PCR 体系单因素试验设计

Tab 3 Single factor design of ISSR-PCR system

水平	Mg^{2+} ,mmol/L	TaqDNA 聚合酶,U	dNTPs,mmol/L	引物, μ mol/L	DNA 模板,ng
1	0.50	0.4	0.050	0.10	6
2	0.75	0.6	0.125	0.15	12
3	1.00	0.8	0.375	0.20	18
4	1.25	1.0	0.400	0.25	24
5	1.50	1.5	0.45	0.30	30
6	1.75	2.0	0.500	0.35	36
7	2.00	2.5	0.625	0.40	42
8	2.25			0.45	48
9	2.50			0.50	54
10				0.60	60
11				0.70	
12				0.80	

2.3 引物筛选与最佳退火温度的确定

在优化体系下对 70 条 ISSR 随机引物进行筛选,选择扩增条带较多、背景清晰的引物;利用梯度 PCR 仪对筛选好的引物进行退火温度梯度试验,通过比较退火温度对条带数量和条带清晰度的影响,确定每条引物的最佳退火温度。

2.4 供试品 ISSR-PCR 的检测

筛选出的 ISSR-PCR 引物在其最佳退火温度与最优反应体系下对不同供试品基因组 DNA 进行扩增。反应结束后进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,在凝胶成像系统下照相、保存。

2.5 数据统计与分析

采用人工读带法,在相同迁移率位置上,有带记为 1,无带记为 0,建立数据矩阵,并进行扩增条带的多态性统计。利用 Popgen 1.32 软件统计扩增位点的多态性位点百分率、Shannon 多样性指数、Nei's 基因多样性指数和 Nei's 遗传相似系数及遗传距离。应用 NTSYS 软件根据 Nei's 遗传距离构建 UPGMA 聚类树状图,分析 6 个不同当归品种(系)间的亲缘

关系。

3 结果

3.1 正交试验结果

第1~4、6、8~16组处理方案下均能扩增出条带,但不同处理方案的条带数目和清晰度不一致。以特异谱带多态性高、背景干扰低、主带清晰、副带明显为原则,确定第11号处理方案为当归 ISSR-PCR 的最佳反应体系。不同正交试验方案的 ISSR-PCR 产物电泳图见图1。

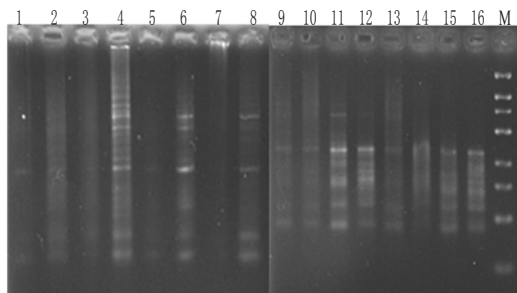


图1 不同正交试验方案的ISSR-PCR产物电泳图
1~16.正交设计1~16组;M.蛋白标记

Fig 1 Electrophoretogram of ISSR-PCR orthogonal design

1-16. groups of orthogonal design; M. stands for protein marker

3.2 单因素试验结果

3.2.1 不同 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 当 Mg^{2+} 浓度低于 1.25 mmol/L 时,扩增条带少且不清晰;当浓度高于 1.5 mmol/L 时特异性条带增多。最终确定最适 Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L,此结果与正交试验结果基本一致。不同 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图2。

3.2.2 不同 TaqDNA 聚合酶活性对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 当 TaqDNA 聚合酶活性小于 0.6 U 时,扩增条带变暗;高于 0.8 U 时,扩增条带的背景开始模糊甚至没有条带。最终确定最适 TaqDNA 聚合酶活性为 0.6 U,此结果与正交试验结果基本一致。不同 TaqDNA 聚合酶活性对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图3。

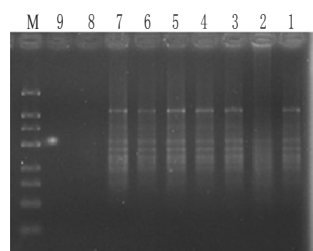


图2 不同 Mg^{2+} 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~9.泳道1~9的 Mg^{2+} 浓度分别为 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50 mmol/L;M.蛋白标记

Fig 2 Effects of different Mg^{2+} concentrations on ISSR-PCR amplification

1-9. Mg^{2+} concentrations 0.50、0.75、1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50 mmol/L; M. stands for protein marker

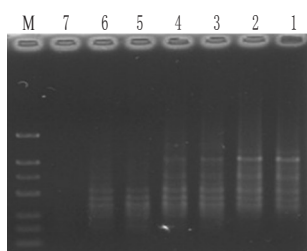


图3 不同 TaqDNA 聚合酶活性对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~7.泳道1~7的 TaqDNA 聚合酶活性分别为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5 U;M.蛋白标记

Fig 3 Effects of different TaqDNA polymerase activity on ISSR-PCR amplification

1-7. TaqDNA polymerase activities 0.4、0.6、0.8、1、1.5、2、2.5 U; M. stands for protein marker

3.2.3 不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 当 dNTPs 浓度高于 0.45 mmol/L 时,条带较少且变弱,而在 0.375 mmol/L 时扩增的条带多、稳定、清晰。最终确定最适 dNTPs 浓度为 0.375 mmol/L,此结果与正交试验结果基本一致。不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图4。

3.2.4 不同 DNA 模板用量对 ISSR 扩增结果的影响 DNA 模板用量在 42~60 ng 范围内时,PCR 扩增条带数基本不受其用量大小的影响,但当用量低于 36 ng 后,扩增条带数明显减少且变得模糊。经过清晰度、条带数及经济用量等多方面考虑,最终确定最适 DNA 模板用量为 42 ng,此结果与正交试验结果基本一致。不同 DNA 模板用量对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图5。

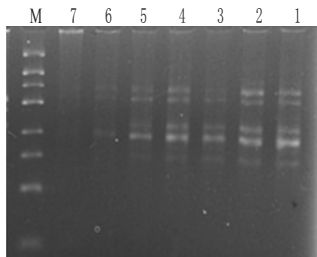


图4 不同 dNTPs 浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~7.泳道1~7 dNTPs 浓度分别为 0.050、0.125、0.375、0.400、0.450、0.500、0.625 mmol/L;M.蛋白标记

Fig 4 Effects of different dNTP concentrations on ISSR-PCR amplification

1-7. dNTPs concentrations 0.050、0.125、0.375、0.400、0.450、0.500、0.625 mmol/L; M. stands for protein marker

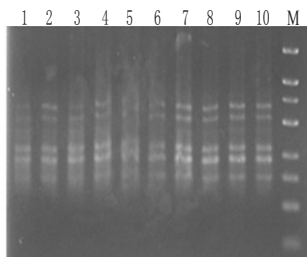


图5 不同 DNA 模板用量对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~10.泳道1~10 DNA 模板质量浓度分别为 6、12、18、24、30、36、42、48、54、60 ng/μl;M.蛋白标记

Fig 5 Effects of different concentrations of template DNA on ISSR-PCR amplification

1-10. template concentrations 6、12、18、24、30、36、42、48、54、60 ng/μl; M. stands for protein marker

3.2.5 不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响 引物浓度在 0.15~0.3 μmol/L 范围内均能扩增出条带,但浓度低于 0.15 μmol/L 时无条带;引物浓度在 0.35~0.45 μmol/L 范围内扩增条带逐渐模糊;浓度高于 0.5 μmol/L 时,特异性条带数增多。最终确定最适引物浓度为 0.3 μmol/L,此结果与正交试验结果基本一致。不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图6。

3.3 引物筛选及最佳退火温度确定

根据正交、单因素试验结果,最终确定当归 ISSR-PCR 的最佳反应体系为 20 μl,内含 Mg^{2+} (10×PCR Buffer) 1.5 mmol/L, TaqDNA 聚合酶 0.6 U,引物 0.3 μmol/L, dNTPs 0.375 mmol/L, DNA 模板 42 ng。应用优化后的体系,从 70 个 ISSR-PCR 随机引物中筛选出扩增条带清晰且条带数多的 8 条引物,并确定了每条引物的最佳退火温度。不同 ISSR-PCR 引物最佳退火温度见表4;不同退火温度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响见图7。

3.4 供试样品的遗传关系分析

3.4.1 扩增条带的多态性统计 8 条 ISSR 随机引物共扩增出 46 条带,其中多态性条带 6 条,占 13.04%。8 条引物产生的多态性条带见表4。

3.4.2 扩增位点的遗传多样性分析 共检测到 45 个遗传位点,其中多态性位点 6 个,多态性位点百分率为 13.04% ;

Shannon 多样性指标为 0.082 7; Nei's 基因多样性指标为 0.058 0, 各指标均显示不同品种(系)的当归遗传多样性较低。

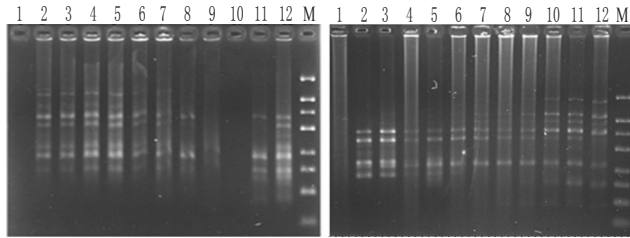


图6 不同引物浓度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~12.泳道 1~12 引物浓度 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.60、0.70、0.80 μmol/L; M. 蛋白标记

Fig 6 Effects of different primer concentrations on ISSR-PCR amplification

1-12. primer concentrations 0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45、0.50、0.60、0.70、0.80 μmol/L; M. stands for protein marker

图7 不同退火温度对 ISSR-PCR 扩增结果的影响

1~12.泳道 1~12 退火温度分别为 49.1、50.3、51.2、52.1、53.2、54.0、54.9、56.1、57.2、58.4、59.3、60.1 °C; M. 蛋白标记

Fig 7 Effects of different annealing temperature on ISSR-PCR amplification

1-12. annealing temperature 49.1、50.3、51.2、52.1、53.2、54.0、54.9、56.1、57.2、58.4、59.3、60.1 °C; M. stands for protein marker

表4 筛选出的引物及扩增条带

Tab 4 Selected primers and the number of amplification bands

引物编号	引物序列(5'-3')	DNA 溶解温度, °C	实际退火温度, °C	总条带数	多态性条带数	多态性条带百分率, %
UBC-835	(AG) ₃ YC	54.00~56.00	54.00	9	1	11.11
UBC-855	(AC) ₃ YT	52.00~54.00	52.00	8	1	12.50
UBC-857	(AC) ₃ YG	54.00~56.00	54.00	6	2	33.33
UBC-868	(GAA) ₃	48.00	48.00	4	0	0
UBC-873	(GACA) ₃	48.00~54.00	48.00	4	1	25.00
UBC-876	(GAT A) ₂ (GAC A) ₂	44.00	44.00	5	1	20.00
UBC-880	(GGA GA) ₃	48.00	48.00	5	0	0
UBC-881	GGGT(GGGGT) ₂ G	54.00	54.00	5	0	0
总计				46	6	13.04

3.5 不同当归品种(系)间的亲缘关系分析

3.5.1 遗传距离和遗传相似性统计 遗传距离越大的品种(系)间亲缘关系越远, Popgen 1.32 软件统计结果表明, 6 个不同当归品种(系)之间遗传距离范围为 0.002 8~0.115 1, 其中 3 号与 5 号的遗传距离为 0.002 8, 说明它们之间具有较近的亲缘关系, 而 1、2 号与 6 号间的遗传距离为 0.115 1, 说明这两个品种(系)间的亲缘关系最远。不同当归品种(系)遗传距离见表 5(表中“***”表示无距离)。

表5 不同当归品种(系)遗传距离

Tab 5 The genetic distances and genetic similarity coefficient of different varieties or strains of *A. sinensis*

pop ID	1	2	3	4	5	6
1	***	0.956 5	0.913 0	0.934 8	0.913 0	0.891 3
2	0.044 5	***	0.913 0	0.978 3	0.913 0	0.891 3
3	0.091 0	0.091 0	***	0.934 8	0.997 2	0.934 8
4	0.067 4	0.022 0	0.067 4	***	0.934 8	0.913 0
5	0.091 0	0.091 0	0.002 8	0.067 4	***	0.934 8
6	0.115 1	0.115 1	0.067 4	0.091 0	0.067 4	***

3.5.2 聚类分析 利用 NTSYS 软件根据 Nei's 遗传距离构建甘肃不同当归品种(系)的 UPGMA 聚类图。结果表明, 6 个不

同品种(系)当归在遗传距离 0.09 处被聚为 2 类, 岷归 1 号、岷归 2 号和岷归 5 号为一类群, 岷归 4 号、DG 2005-03-01 和 DG 2000-01-01 为另一类群; 在遗传距离 0.06 处, 岷归 2 号和岷归 5 号聚为一类, 岷归 1 号为一类; 在遗传距离 0.07 处, 岷归 4 号和 DG 2005-03-01 为一类群, DG 2000-01-01 为另一类。以 Nei's 遗传距离构建的当归 UPGMA 聚类图见图 8。

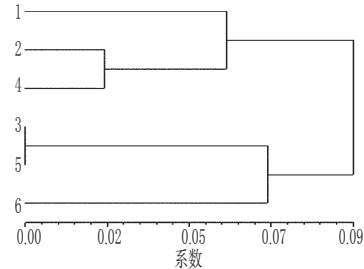


图8 当归 UPGMA 聚类图

Fig 8 UPGMA dendrogram of *A. sinensis*

4 讨论

ISSR 分子标记方法简便、易操作, 但其稳定性却受多种因素影响^[8-10], 若想增加其分析结果的可靠性, 首先应对各种影响因素进行优化, 确立适合该物种的最佳反应体系。本研究先应用正交试验筛选出可扩增出清晰条带的反应体系, 然后结合单因素试验进一步优化该体系, 根据试验结果来看, 二者确定的 Mg²⁺、TaqDNA 聚合酶、dNTPs、引物和 DNA 模板水平差别不大, 最终确立的当归最佳 ISSR-PCR 体系稳定可靠, 可用于后续试验。

遗传多样性可以作为一个鉴别物种遗传能力、种质优劣的指标, 特别是在人工选择、新品种(系)培育的过程中要时刻关注, 以防止种质下降, 延缓新品系形成时间。本研究中 6 个不同当归品种(系)的遗传多样性较低, 多态性比率仅为 13.04%, 其原因可能是由于这几个是选育较早且种植规模较大的当归品种(系)^[11-13], 经过多年的人工栽培其种质已发生退化而导致遗传多样性下降。课题组对近几年新选育的当归品种(系)研究后发现, 其遗传多样性高达 86.70%, 此结果充分说明在当归育种过程中, 扩大选育品种(系)的种类和数量可有效防止其遗传多样性下降, 减缓种质退化的速度。

研究表明, 6 个当归栽培品种(系)间的遗传距离普遍不大, 只有少数品种(系)的遗传分化较显著, 说明多数品种(系)的遗传基础较窄, 因此在育种过程中应该丰富亲本的选择, 以提高育种的效率和获得优良品种的概率。聚类结果可为不同当归品种(系)间的远缘杂交提供依据, 但不能仅依靠此结果, 还应结合其表型性状, 综合判断不同品种(系)间亲缘关系的远近。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 4 801.
- [2] 晋玲, 吴迪, 崔治家, 等. 当归药材资源种类及分布研究[J]. 中兽医医药杂志, 2013, 32(1): 74.
- [3] 邹喻苹, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16.
- [4] 王翀, 周天华, 赵桂仿, 等. ISSR-PCR 鉴别绞股蓝属 7 种植物[J]. 中草药, 2009, 39(4): 588.
- [5] 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.
- [6] 陈大霞, 张雪, 李隆云. 灰毡毛忍冬主栽品种的遗传多样

接骨木总苷片促进骨折愈合与抗炎作用研究 I^Δ

杨炳友*, 何娅雯, 朱晓清, 韩 华, 杨 柳, 王秋红, 匡海学[#](教育部北药基础与应用研究重点实验室/黑龙江省中药及天然药物药效物质基础研究重点实验室/黑龙江省教育厅中药学重点实验室/黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R285;R863 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)35-3269-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.35.02

摘要 目的: 研究接骨木总苷片促进骨折愈合与抗炎作用。方法: 复制兔骨折模型。60只新西兰大白兔随机均分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、跌打丸(0.28 g/kg)组与接骨木总苷片高、中、低剂量(0.22、0.11、0.06 g/kg)组, 以药物加入饲料给药, 连续36 d。骨密度仪测定骨密度(BMD)、骨矿含量(BMC)、骨痂面积(Area), 通过X光片观察兔骨折愈合程度。采用小鼠耳肿胀和大鼠足肿胀模型观察其抗炎作用, 热板法观察其镇痛作用。结果: 高、中、低剂量接骨木总苷片可增加模型大白兔BMD、BMC, 使模型大白兔骨折断端接近消失, 骨膜反应密度加深, 骨痂量增多、加深; 中剂量组接骨木总苷片可增加模型大白兔Area。高、中、低剂量接骨木总苷片可减轻模型小鼠耳肿胀度, 降低模型大鼠足肿胀率, 提高1 h内模型小鼠痛阈值。结论: 接骨木总苷片有较好的抵抗急性炎症和镇痛的作用, 并能促进骨折愈合。

关键词 接骨木总苷片; 骨折愈合; 抗炎; 镇痛

Study on Effects of *Sambucus williamsii* Total Glycosides Tablets on Fracture Healing and Inflammation: Part I
YANG Bing-you, HE Ya-wen, ZHU Xiao-qing, HAN Hua, YANG Liu, WANG Qiu-hong, KUANG Hai-xue (Key Lab of Chinese Materia Medica, Ministry of Education/Heilongjiang Provincial Key Lab of TCM and Natural Medicine Pharmacodynamic Material Bases/Key Lab of TCM, Heilongjiang Provincial Education Department/College of Pharmacy, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of *Sambucus williamsii* total glycosides tablets on fracture healing and inflammation. METHODS: Rabbit fracture model was induced. 50 New Zealand white rabbits were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), Dieda pills group (0.28 g/kg), *S. williamsii* total glycosides tablets high-dose, medium-dose and low-dose groups (0.22, 0.11, 0.06 g/kg). They were given medicine via feedingstuff for consecutive 36 d. The bone mineral density (BMD), bone mineral content (BMC) and callus area (Area) were determined by dual energy X-ray absorptionmetry (DXA). The degree of fracture healing was observed by X-ray film. Anti-inflammatory effects were observed by mice ear swelling and rat foot swelling experiments; analgesic action was observed by hot plate method. RESULTS: High-dose, medium-dose and low-dose of *S. williamsii* total glycosides tablets could increase BMD and BMC in model group; the fracture site of model rabbit disappeared nearly, and periosteal reaction density increased and deepened. Medium-dose of *S. williamsii* total glycosides tablets could increase Area in model group. High-dose, medium-dose and low-dose of *S. williamsii* total glycosides tablets relieved mice ear swelling of model mice and foot swelling of model rats, and increased 1h pain threshold of normal mice. CONCLUSIONS: *S. williamsii* total glycosides tablets have good resistance to acute inflammation and analgesic effect and can promote the fracture healing.

KEYWORDS *Sambucus williamsii* total glycosides tablets; Fracture healing; Anti-inflammatory; Analgesia

- 性及其亲缘关系分析[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(13): 1912.
- [7] 朱田田, 晋玲, 杜骏, 等. 中麻黄基因组DNA不同提取方法比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 40(4): 316.
- [8] 欧立军, 颜旺, 廖亚西, 等. 天门冬 ISSR 分子标记技术的建立与体系优化[J]. 中草药, 2011, 42(2): 353.
- [9] 朱田田, 晋玲, 杜骏, 等. 中麻黄 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. 中国药房, 2013, 24(43): 4033.
- [10] 张福生, 郭顺星. 金线莲 ISSR 反应体系的建立与优化[J]. 中草药, 2011, 42(1): 137.
- [11] 刘敬, 颜红梅, 刘效瑞, 等. 当归新品系“DGA2000-020”与对照品种的遗传差异分析[J]. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 201.
- [12] 颜红梅, 刘效瑞, 李文建, 等. 甘肃当归新品系 DGA 2000-02 的选育研究[J]. 原子核物理评论, 2008, 25(2): 196.
- [13] 贾婕楠. 当归新品系 90-01 选育报告[J]. 中药材, 2005, 28(8): 649.

(收稿日期: 2014-04-17 修回日期: 2014-07-25)

Δ 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No.81173501); 黑龙江中医药大学“优秀创新人才支持计划”项目(No.B201201); 黑龙江中医药大学博士创新基金资助项目(No.B201003)

* 教授, 博士。研究方向: 中药及复方药效物质基础。电话: 0451-87267038

通信作者: 教授, 博士。研究方向: 中药及复方药效物质基础。电话: 0451-82110803。E-mail: hxkuang@hotmail.com