重楼综合形态学、显微学真伪鉴别研究进展及 ITS2 序列分析研究

杨志城[1]，汲虹[2]，孙彩虹[1]，叶亮[3]，叶冠[1*]
（1. 上海医药集团股份有限公司中央研究院中药所，上海 201203；2. 桐乡市大麻镇卫生院，浙江 桐乡 314514；
3. 中国药科大学中药学院，江苏 南京 211198）

摘要　基于性状、显微、理化及 DNA 序列等鉴定技术，综述分析正品重楼及其混伪品差异，为重楼及其混伪品鉴伪提供参考。基于文献总结正品重楼及其混伪品种类及原植物形态、显微特征差别，下载公开重楼及其混伪品 ITS2 序列并基于隐马尔科夫原则标准化后进行序列比对、二级结构、发育树聚类分析。正品重楼主要混用品有球药隔重楼、宽叶重楼、黑籽重楼、长柱重楼等，伪品主要为拳参、珠芽蓼、禹白附等，在植物形态学及显微鉴定方面，正品与混伪品之间茎、叶、花、果实种子差异明显，而药材性状及微观结构差异较小。DNA 序列鉴定方面正品与混用品之间 ITS2 序列差异较小，与伪品之间差异较大。正品与混伪品之间可通过植株形态进行有效区分，而仅有药材时 ITS2 序列及其二级结构可快速准确鉴别伪品，本研究为中药材重楼临床的安全运用和质量评价提供参考，也可为其他药材鉴别提供参考。

关键词　重楼；混伪品；形态鉴别；性状鉴别；显微鉴别；ITS2 序列
中图分类号：R283.1　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002－2392(2025)07－0116－10
DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250154

重楼，始载于《神农本草经》，又名“蚤休”。《中国药典》2020 版认定云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*(Franch.)Hand.－Mazz. 或七叶一枝花 *P. polyphylla* Smith var. *chinensis*(Franch.)Hara 的干燥根状茎为其合法基源[1]。重楼具有清热解毒、消肿止痛、凉肝定惊的功效，用于疔疮痈肿、蛇虫咬伤、跌扑伤痛等症，现代药理研究表明，重楼具有抗炎、止血、改善血流变等活性，是云南白药、楼莲胶囊、肝复乐片等知名中成药重要原料[2]。

重楼属植物共有 24 种，中国有 19 种、18 变种、2 变型[3－4]，其中 18 种在民间习用。云南重楼多产自云南、贵州、四川等地，七叶一枝花产自云南、贵州、四川、西藏等地[5]，重楼生长周期长且需求量大，过量采挖导致资源破坏严重，目前七叶一枝花已成为我国Ⅱ级保护植物，云南重楼野生资源稀缺[6－7]。因正品重楼资源不足且其分布范围较广，故混、伪品较多。民间用药不仅仅局限于药典规定的重楼种类，混用种多为其同属植物如狭叶重楼、球药隔重楼、宽叶重楼、黑籽重楼、长药隔重楼、长柱重楼等[8－9]。伪品多为其他科属性状相似植物，如拳参、禹白附、珠芽蓼、头顶一颗珠、万年青、开口箭等，目前已有研究[8,10－12]对重楼及其部分混伪品进行鉴别研究。内部转录间隔区 2(Internal Transcribed Spacer 2，ITS2)序列是《中国药典》2020 年版规定可用于植物物种鉴定的一种核心条形码[13－14]，位于 5.8S 和 25S rRNA 基因之间，为核糖体 RNA(rRNA)基因的一部分，ITS2 区域的二级结构高度保守且因其在物种水平上的显著序列变异性而在分子系统学和进化研究中被广泛用作分子标记，是目前系统发育分析最常用的基因条形码之一。ITS2 序列的长度差异和固定替换可以作为谱系分裂的证据，尤其是在地理分布相同的谱系中。ITS2 序列因其长度短、易于用一对引物扩增、高测序效率以及物种间高变异性而被提议作为候选的 DNA 条形码，基于 ITS2 的分子形态特征可以为物种鉴定提供另一个可识别的基础[15－16]。越来越多的研究表明 ITS2 在物种鉴定方面具有良好能力，可用于药材市场中掺假物种的比例和种类监督[17]。陈士林等[18－19]通过分析 6 600 余种植物，得出 ITS2 具有较高的扩增率和良好的物种水平鉴定能力。通过“一茎四环”结构可以区分不同物种，区分度良好，并建议将 ITS2 序列作为药用植物的核心

收稿日期：2024－06－11　　**修回日期**：2025－04－02
基金项目：上海医药中药传承和创新平台能力建设(2020006)
作者简介：杨志城(1996－)，男，硕士，初级工程师，从事中药和天然药物的研发工作。
＊**通信作者**：叶冠(1974－)，男，博士，教授级高级工程师，从事中药和天然药物的研发工作。

DNA 条形码[20]，现行《中国药典》2020 版中已收录多个 ITS2 序列用于药材鉴别[1]。

重楼作为重要中药原料，实际栽培生产中由于重楼品种退化、炮制以及伪品混入等原因，显微、植物形态等鉴别手段难以满足需求，而分子鉴定不受材料部位、生长阶段等限制，且具有取样量少，准确可靠的特点。因此本研究从常规鉴别手段对重楼及其混伪品进行综述，并联合 ITS2 序列及其二级结构鉴别的方法，对重楼及其混伪品进行准确、快速地识别和鉴定。

1 综合形态学差异

1.1 原植物形态差异

整理数据库《中国植物志》[21]及相关文献[22-38]发表信息可得，重楼属植物种间差异明显且稳定，有明显鉴别特征，是鉴别正品重楼及其混伪品重要方法，可用于基于原植物或地表形态的正品重楼及其混伪品鉴别，现将重楼正品、混伪品的分布、茎、叶、花、果实种子鉴别特征总结见表 1。

表 1 重楼及其混伪品原植物形态比较

品种	分布	茎	叶	花	果实和种子
七叶一支花[21-23]	云南、西藏、四川、贵州	粗厚，外部棕褐色，密生环节、须根，常带紫红色，基部有 1 ~ 3 枚灰白色干膜质鞘	5 ~ 11 片，长圆形、倒卵状长圆形或倒披针形，绿色，膜质或纸质	花瓣线形，有时具短爪，黄绿色，有时基部黄绿色，上部紫色	蒴果近球形，紫色，不规则开裂，3 -6 瓣裂开
滇重楼[21-22]	云南、贵州、四川	根茎肥厚粗壮，黄褐色，结节明显，具鳞片状叶及众多须根	4 ~ 9 片，长椭圆形或椭圆状披针形，绿色，膜质或薄纸质	花瓣较宽，上部狭匙形，长于萼片，线形或丝状，黄绿色；内轮花被为外轮花被的 1/2 或近等长，同数	蒴果球形，黄褐色，3 ~ 6 瓣裂；种子多数，卵球形，有鲜红的外种皮
长柱重楼[21-22,24]	云南、西藏	根茎圆柱形或螺丝状，有密集环节，棕褐色；茎无毛	4 ~ 8 片，卵状长圆形或倒卵状长圆形，绿色，膜质	花瓣丝状，黄绿色	蒴果近球形，紫色，不开裂，疣状凸起；种子卵圆形，较小，白色或黄红色
毛重楼[21-22,25]	云南、四川	茎紫色或绿色，光滑，粗糙或密被短毛；根状茎棕褐色，内面白色，粉质	5 ~ 12 片，呈倒披针形，倒卵形至倒卵状披针形，腹面绿色，背面淡绿色，糠秕状短毛呈密或稍疏状分布	花瓣丝状线形，黄绿色，比萼长	蒴果近球形，紫色，有棱，开裂；种子近球形，外种皮红色多汁
黑籽重楼[21,26]	西藏、云南、四川、甘肃、贵州	茎绿色，有时带紫色，无毛	8 ~ 12 片，背稍淡，无毛，线形，线状长圆形或披针形，绿色	花基数 4 ~ 7，花瓣，丝状，斜伸，淡绿色，比萼片短；药隔突出部分很长，淡绿色	蒴果近球形，不规则开裂；种子亮黑色，多数，光滑坚硬，于一侧包以深红色多汁鸡冠状假种皮
具柄重楼[21,27]	江西、广西、贵州、四川、陕西	茎略带紫色；根茎粗厚，横走，呈结节状不匀扁圆锥体，下细上粗略弯曲，表面棕红色至棕褐色，有层状突起横斜环纹	3 ~ 6 片，阔卵圆形至长宽卵形，薄革质	花 2 ~ 5 数，线形；药隔突出部分为小尖头状	蒴果球形，绿色，纵裂，直径 2 ~ 5 cm，有纵棱及疣状凸起；种子球形，橘红色
宽叶重楼[21,28]	山西、陕西、河南、甘肃、安徽	根状茎粗厚，棕褐色，密生多数环节和须根。常带紫红色，基部 1 ~ 3 枚灰白色干膜质鞘	8 ~ 13 片，倒卵状披针形或宽披针形	5 ~ 7 枚，外轮花被片叶状、狭披针形或卵状披针形；内轮花被片狭条形，远比外轮花被片长；药隔突出部分极短	幼果外面有疣状突起，成熟后更加明显
长药隔重楼[21,29]	四川、云南，陕西	根茎横走，较粗壮，绿色或紫色，无毛	5 ~ 12 片，倒卵状披针形、披针状长圆形至狭披针形，淡黄绿色或淡褐色	花 4 ~ 7 数，花瓣与叶片近等长或稍长，黄绿色；药凸明显	果实球形或椭圆形，棱不明显；种子近球形，红色多汁外种皮
南重楼[21,30]	云南	根茎粗壮，粉质	4 ~ 6 片，倒卵状长圆形，倒卵圆形或宽菱状卵形，绿色，叶片膜质	花 4 ~ 7 数，黄绿色，线形或丝状	蒴果黄红色，开裂，果皮厚革质，有时较薄；种子近球形，橙黄色，多汁

续表 1

品种	分布	茎	叶	花	果实和种子
球药隔重楼[21,31]	江西、湖北、广东、四川、贵州	根茎粗壮，茎偏绿色	4 ~6 片，卵状长圆形，绿色，偶下面紫色，蜡样光泽薄革质或纸质	花瓣线形，黄绿或紫黑色，与萼片近等长，常反垂于萼片之下；药隔突出部分圆头状、肉质，紫褐色	果实通体紫黑色，五棱柱形，开裂；种子多数，外种皮多汁、红色
亮叶重楼[21,31]	湖北、湖南	茎单生，圆筒状，绿色或紫红色，基部 3 个白色膜质鳞片	4 ~ 5 片，椭圆形，绿色，有光泽，厚膜质到近革质	花瓣 4 ~5，丝状，浅绿色或绿黄色	蒴果球状，绿色，开裂，具 3 ~5 个纵向脊；种子多数，白色卵球形，被红色假种皮包围
狭叶重楼[21,32]	西藏、云南、四川、贵州	茎紫红色，基部有灰白色干膜质的鞘 1 ~3 枚	10 ~22 片，窄披针形、长条形	花基数 4 ~7，花瓣丝状，明显长于花萼	种子较大，多数，乳白色，鲜红或深红色肉质多汁假种皮
拳参[21,33]	东北、华北、陕西、宁夏、甘肃、山东	黑褐色，弯曲，茎不分枝，无毛	叶矩圆状披针形或狭卵形，边缘外卷	总状花序穗状，顶生，花淡红色或白色	瘦果椭圆形，红褐色，具 3 棱
禹白附[21,34]	河北、山东、吉林、辽宁、河南、湖北	块茎倒卵形、卵球形或卵状椭圆形，被暗褐色鳞片，有 7 ~8 环状节，颈部生须根	1 ~2 年生植株上仅有叶 1 枚，初生时旋转呈尖角状；3 ~4 年生有 2 ~4 片叶。幼叶内卷如角状，后展开，箭形	肉穗花序，叶与花序同出，花序轴顶端附属物呈紫色棒状	浆果，红褐色
珠芽蓼[21,35]	东北、华北、河南、西北、西南	须状茎肥厚，紫褐色，茎直立或斜升，不分枝，细弱，无毛，通常 3 ~4 簇生于根状茎上	叶长圆形或披针形，革质，边缘微向下卷；茎生叶有短柄或近无柄，披针形，较小；叶托鞘筒状，膜质	花淡红色，花序穗状，紧密，下部生珠芽	瘦果卵形，具 3 棱，深褐色，有光泽，包于宿存花被内
头顶一颗珠[21,36]	土家族、苗族	茎直立，不分枝，根茎粗短，长圆形，根茎上部有明显环纹	叶 3 片，无柄，菱状卵形或宽菱状卵形	外轮 3 片绿色，卵状披针形，内轮 3 片，白色或淡紫色，卵状披针形，较外轮稍长	浆果卵球形，黑紫色；种子多数，卵形，绿色
万年青[21,37]	华东、华南、西南、湖北、河南	无地上茎，根状茎粗短，黄白色	叶自根状茎丛生，披针形或带形，上面深绿色，下面浅绿色，质厚	花多数，丛生于顶端排列成短穗状花序，淡绿白色	浆果球形，桔红色；种子 1 粒
开口箭[21,38]	湖北、湖南、江西、福建、台湾、浙江	根状茎长圆柱形，多节，绿色至黄色	叶 4 ~ 8 片，倒披针形、线状披针形、线形或长圆状披针形，近革质或纸质	花序直立，稍弯曲，密生多花，花短钟状，苞片绿色，卵状披针形或披针形	浆果球形，熟时紫红色

1.2　药材性状差异

性状鉴别是指用眼观、手摸、鼻闻、口尝等方法来鉴别药材的外观性状，具有简单、易行、迅速的特点，性状鉴别结果显示重楼及其混伪品药材整体差异较小，差异细微不足以作为鉴别特征，仅可用于排除狭叶重楼、珠芽蓼等性状差异较大的混伪品，差异性状鉴别结果总结见表 2。

2　显微学差异

显微鉴别主要包括组织鉴别和粉末鉴别，通过观察重楼及其混伪品的切片、粉末制片或解离片，总结对比重楼及其混伪品组织构造、细胞分子、内含物造特征，对比结果显示正品重楼与混品之间粉末、断面显微差异较小，而与伪品之间差异明显，可用于伪品的鉴别，显微鉴定对比结果总结见表 3。

3　ITS2 序列分析

3.1　序列下载

从美国国家生物信息中心（NCBI）下载滇重楼及七叶一支花 ITS2 序列 6/5 条，重楼混用品、伪品药材 Genbank 登录号等信息见表 4。

表 2 重楼及其混伪品性状鉴别比较

品种	外观颜色	形状	断面	气味
七叶一支花[1]	黄棕色或棕褐色	结节状圆锥形，常弯曲，具斜向环节	质坚，断面平坦，白色至浅棕色，粉性或胶质	气微，味微苦、麻
滇重楼[1]	黄棕色或棕褐色	结节状扁圆柱形，略弯曲，密具层状突起的粗环纹	质坚，断面平坦，白色至淡棕色，粉性或胶质	气微，味微苦、麻
长柱重楼[22]	黄棕色或灰棕色	结节状圆锥形，不弯曲，具层状突起的粗环纹	质坚，断面平坦，灰色，粉性	气微，味苦、麻
毛重楼[22]	棕色或棕褐色	结节状扁圆柱形，略弯曲，密具明显的粗环纹、层状突起	质坚，断面平坦，白色或浅棕色，粉质	气微，味微苦、麻
黑籽重楼[26]	黄棕色或棕褐色	细长，结节状扁圆柱形，略弯曲，具不规则纵皱纹、层状突起	质脆易折，断面平坦，类白色或淡黄色，多为角质，少数粉质	气微，味微苦、麻
具柄重楼[27]	棕褐色或深黄棕色	结节状不匀扁圆柱体，略弯曲，具层状突起粗横斜环纹	质坚，断面浅棕色，粉性或胶质	气微，味微苦、麻
宽叶重楼[28]	灰棕色或黄棕色	结节状扁圆柱形，具层状突起环纹	质坚，断面平坦，白色或浅棕黄色，粉性	气微，味微苦、麻
长药隔重楼[29]	黄棕色至棕褐色	不规则结节状的长扁圆柱体，略弯曲，具层状突起的粗横斜环纹	质坚易折，断面乳白色较平整，微角质或粉质	气微，味微苦、麻
南重楼[30]	棕黄色或深褐色	结节状扁圆柱形，平直或稍弯曲，多数全体等粗，有层状突起的粗环纹，环节间隔大	质坚不易折，断面平整，类黄色至深黄棕色，常角质，少数粉质	气微，味微苦、麻
球药隔重楼[31]	灰褐色或深黄棕色	不规则圆柱形、略弯曲，常皱缩，环节较密，微凸起	质坚，断面黄白色或黄棕色，角质或粉质	气微，味微苦、麻
亮叶重楼[32]	浅黄棕色	圆柱形、略弯曲，有凸起细环纹	浅棕色，部分角质	气微，味微苦、麻
狭叶重楼[32]	淡黄棕色	稍细，略有皱纹，环纹较稀疏，凸起不明显	质坚，易折，断面类白色，粉质	无臭，味微苦、麻
拳参[33]	紫褐色、深棕红色	扁圆柱形，弯曲呈虾状，全体密具粗环纹	质坚，断面浅棕红色或棕红色	无臭，味苦、涩
禹白附[34]	白色至黄白色	椭圆形或卵圆形被暗褐色鳞片，具环纹及须根痕	质坚，断面白色，粉性	气微，味淡、麻
珠芽蓼[39]	黑褐色，有时粉红色至黄白色	蝉状，有时尾部细尖弯曲呈蝎子尾状，具环纹及须根痕	质坚，断面平坦，断面灰棕色至浅棕紫色	气微，味苦涩
头顶一颗珠[36]	棕黄色至棕褐色	圆柱形、类球形或短圆锥形，肉质肥厚，顶端有淡黄色膜质鳞叶及残存的茎基或茎基脱落后的疤痕，具不明显的环纹、凹点状须根痕	质坚实，切断面黄白色或淡黄棕色，粉性	气微，味麻
万年青[37]	灰黄色	根茎圆柱形，皱缩，具密集的波状环节，散有圆点状根痕	断面不平坦，黄白色（晒干品）或浅棕至棕红色（烘干品），略海绵性，有黄色维管束小点散布	气微，味苦、辛
开口箭[38]	灰棕色至棕黄色	根茎扁圆柱形，微弯曲，略扭曲，结节明显，具环状皱纹、圆点状须根痕	质坚硬或软韧（吸湿），断面淡黄色或黄白色，细颗粒状，有一明显浅棕色环纹，浅棕色小点环状排列	气微，味淡，无臭

表 3 重楼及其混伪品显微鉴别比较

品种	根粉末			根横切面		
	淀粉粒	导管	草酸钙	外层细胞	维管束	内皮层细胞
七叶一支花[1]	淀粉粒众多,单粒,脐点不明显	网纹导管	针晶细呈束状	表皮细胞 1 列,排列较整齐,类方形、长方形、多角形或扁长形,淡黄棕色	周木型	内皮层断续,较小扁平,排列整齐
滇重楼[1]	单粒,脐点明显一字形	梯纹、网纹导管	针晶细呈束状	表皮细胞 1 列,排列不整齐,略呈波状细胞类长方形长圆形类方形或略不规则形,多切向延长	周木型	不明显
长柱重楼[22]	单粒,脐点不明显	梯纹导管	针晶细	表皮细胞 1 列,排列规则	周木型	明显
毛重楼[22]	大量淀粉粒,单粒,类圆形、椭圆形或不规则形;脐点为一字形、点状、星状或人字形等	梯纹、螺纹导管	针晶细呈束状	表皮细胞 1 列,排列规则,细胞类方形或类长方形,排列紧密、整齐,外壁多平直	周木型	较小
黑籽重楼[26]	淀粉粒众多,单粒,呈类圆形、椭圆形;脐点为点状、星状或一字形、人字形	螺纹、梯纹导管	针晶多呈束状,少数散状分布	表皮细胞 1 列,不规则,类圆形、长方形、方形或不规则形,外壁较厚,排列紧密,多切向延长	周木型	不明显
具柄重楼[27]	淀粉粒极多,单粒,球形、长圆形;脐点,点状、人字形	螺纹、梯纹导管	针晶细呈束状	表皮细胞一层呈类方形、不整齐长方形或多角形	周木型	明显,间断排列
宽叶重楼[28]	淀粉粒众多,单粒,椭圆形、类圆形;脐点为星状、点状或人字形	梯纹、螺纹、网纹导管	针晶细呈束状,少数为散状分布	表皮细胞排列整齐长方形或方形	周木型	明显
长药隔重楼[29]	含大量淀粉粒,脐点明显	螺纹、梯纹导管	针晶呈束状	表皮细胞 1 列,细胞形状规则,类长方形或类方形,多径向延长	周木型	明显
南重楼[30]	淀粉粒众多,单粒,椭圆形或类圆形;脐点为点状、一字形、人字形或星状	梯纹、网纹、螺纹导管	针晶多呈束状,少数散状分布	表皮细胞 1 列,类圆形排列整齐、紧密	周木型	皮层细胞大多为类圆形,少数不规则形
球药隔重楼[31]	淀粉粒众多,单粒,呈椭圆形、类圆形;脐点不明显	螺纹、梯纹导管	针晶稍粗,多	后生皮层细胞类长方形、长多角形或不规则形,多切向延长	周木型	–
亮叶重楼[32]	淀粉粒极多,单粒,呈球形、长圆形,大小差异显著;脐点明显,偏向一端,多为人字形	螺纹、梯纹导管	针晶呈束状	–	–	–
狭叶重楼[32]	淀粉粒众多	螺纹、梯纹导管	针晶呈束状	表皮细胞 1 列,细胞类长方形或类方形	周木型	通道细胞数目较多,部分内皮层细胞五面加厚
拳参[33]	淀粉粒单粒,椭圆形、卵形或类圆形	具缘纹孔导管,网纹、螺纹导管	簇晶	木栓细胞呈多角形,含棕红色物	外韧型维管束	–
禹白附[34]	淀粉粒众多,单粒或复粒;脐点明显,点状	螺纹、环纹导管	针晶散在或成束	木栓细胞有时残存	外韧型及周木型	–
珠芽蓼[39]	淀粉粒单粒,椭圆形类圆形;脐点明显,裂隙状、点状、分叉状	螺纹、环纹、网纹导管	无针晶,簇晶众多	木栓层由 1 ~ 4 列木栓细胞组成,木质部导管稀疏	外韧型维管束	–
头顶一颗珠[36]	淀粉粒众多,单粒,圆形、长圆形、三角状卵形;脐点呈点状、裂缝状、人字形或叉状	梯纹或网状梯纹孔式导管	针晶成束	外皮层具有 1 ~ 2 列排列紧密的细胞,皮层细胞多角形,靠外侧的细胞壁多皱缩弯曲	根茎周木型或外韧型	细胞 1 列,排列紧密
万年青[37]	淀粉粒单粒,类圆形	网纹、梯纹导管	针晶呈束状	木栓细胞数列。皮层较宽广,散列	周木型和外韧型	明显
开口箭[38]	淀粉粒众多,脐点明显	多见螺纹、环纹导管,偶见网纹、孔纹导管	针晶成束	表皮细胞木栓化	周木型、外韧型	明显,一层,椭圆形

注:“ – ”为尚无报道或无该特征。

表 4 NCBI 下载重楼及伪品 IST2 序列来源表

物种名	Genbank 登录号	物种名	Genbank 登录号
Paris polyphylla var. yunnanensis	AY192539	*Paris polyphylla var. latifolia*	KR152201
Paris polyphylla var. yunnanensis	MT821219	*Paris polyphylla var. latifolia*	KR152202
Paris polyphylla var. yunnanensis	MT821221	*Paris polyphylla var. latifolia*	KR152208
Paris polyphylla var. yunnanensis	JF977343	*Rohdea chinensis*	MH711698
Paris polyphylla var. yunnanensis	JF977341	*Rohdea chinensis*	MH558165
Paris polyphylla var. yunnanensis	JF977342	*Tupistra pingbianensis*	JF978992
Paris polyphylla	MZ014953	*Tupistra pingbianensis*	JF978991
Paris polyphylla	MZ014954	*Tupistra pingbianensis*	JF978993
Paris polyphylla	MZ014955	*Trillium camtschatcense*	AB018808
Paris polyphylla	OK325626	*Trillium camschatcense*	DQ404197
Paris polyphylla	GQ184575	*Trillium camschatcense*	AY974173
Trillium tschonoskii	MH808670	*Paris fargesii var. petiolata*	DQ404220
Trillium tschonoskii	DQ404201	*Paris fargesii var. petiolata*	MK346932
Trillium tschonoskii	AY192541	*Paris thibetica*	JF977358
Sauromatum giganteum	MH710753	*Paris thibetica*	AY192532
Sauromatum giganteum	MH710779	*Paris thibetica*	DQ404216
Rohdea japonica	MH558166	*Paris forrestii*	DQ404208
Rohdea japonica	MH767015	*Paris forrestii*	DQ486020
Polygonum bistorta	FJ503009	*Paris forrestii*	MT819380
Polygonum bistorta	GQ339918	*Paris polyphylla var. thibetica*	KX146543
Polygonum bistorta	EU591968	*Paris polyphylla var. thibetica*	KX146542
Paris vietnamensis	MT821226	*Paris polyphylla var. thibetica*	KX146544
Paris vietnamensis	MT821227	*Paris verticillata*	DQ404206
Paris vietnamensis	MT821228	*Paris verticillata*	MH808667
Paris mairei	DQ486017	*Paris verticillata*	MH808668
Paris mairei	HQ676581	*Bistorta vivipara*	JF977874
Paris mairei	DQ404213	*Bistorta vivipara*	JF977871
Paris nitida	MK483720	*Bistorta vivipara*	JF977872
Paris nitida	MK309858		

3.2 方法

将 NCBI 下载的序列导入 IST2 数据库(http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/),基于隐马尔科夫模型(HMMs)的方法对导入序列进行注释[40],根据注释结果除去两端 5.8S 区域和 28S 区域以及两端低质量区域,获得标准 IST2 间隔序列。采用 DNAman 软件对获得的下载序列进行整理编辑,将整理后标准 ITS2 序列导入到 MEGA 7.0[41]中,分析序列碱基组成比例、变异位点、保守位点、自裔位点等信息,构建基于 Neighbor-Joining(NJ,最近邻接法)计算模型的系统发育树,以 Kimura-2-parameter(K2P)为模型,以 1 000 次 bootstrap 检验分支可信度,进行物种亲缘关系分析。采用在线 ITS2 数据库网站(http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/)预测 ITS2 序列二级结构[42],并进行二级结构直观的比对分析。

3.3 序列对比及发育树构建

序列基于隐马尔科夫法则,去除两端低质量区及 5.8S 区、28S 区,导入 MEGA7.0 分析长度组成等相关信息,结果见表 5,采用 ClustalW 序列比对,比对结果采用最近邻接法进行发育树分析,设置 K2P 为计算模型,步长检验设置为 1 000,构建发育树,结果见图 1。

表 5　正品重楼及混伪品 ITS2 序列信息

序号	物种名	G + C/%	长度/bp	C	V	PI	S
1	*Paris polyphylla var. yunnanensis*	60.7	232	211	23	0	23
2	*Paris polyphylla*	59.1	232	209	16	0	16
3	*Paris vietnamensis*	62.3	220	218	2	0	2
4	*Paris mairei*	59.5	233	216	16	0	16
5	*Paris polyphylla var. latifolia*	60.7	232	216	16	0	16
6	*Paris thibetica*	59.0	232	212	20	0	20
7	*Paris forrestii*	59.9	232	213	19	0	19
8	*Paris nitida*	60.8	232	232	0	0	0
9	*Paris polyphylla var. thibetica*	59.0	232	230	2	0	2
10	*Paris verticillata*	63.8	232	232	0	0	0
11	*Paris fargesii var. petiolata*	60.3	232	229	3	0	0
12	*Tupistra pingbianensis*	78.6	238	238	0	0	0
13	*Trillium camtschatcense*	64.8	233	232	1	0	1
14	*Bistorta vivipara*	70.6	236	234	2	0	2
15	*Rohdea chinensis*	75.4	229	226	3	0	0
16	*Trillium tschonoskii*	64.4	233	213	20	0	20
17	*Sauromatum giganteum*	66.3	260	258	2	0	2
18	*Polygonum bistorta*	69.6	237	230	6	0	6
19	*Rohdea japonica*	76.9	217	210	6	0	0

注：1. C – conservedsites 保守位点；2. PI – parsimony – informativesites 简约信息位点；3. V – variablesites 变异位点；4. S – singletonsites 自裔位点。

由表中可得出正品重楼 ITS2 序列长度均为 232 bp，碱基组成比例差异较小，七叶一枝花较云南重楼变异位点数目较少。混品除南重楼外与正品 ITS2 序列长度基本一致，碱基组成比例差异较小。伪品中序列长度与正品差异较小，开口箭、万年青序列 GC 含量较高。

由图 1 中可以看出，珠芽蓼与拳参聚为一支，展边开口箭与两种万年青聚为一支，禹白附独自聚为一支，正品重楼及其混用品（除北重楼外）聚为一支，再与两种延龄草（吉林延龄草、白花延龄草，习称头顶一颗珠）聚为一支。ITS2 序列发育树分析结果证实，混用品长柱重楼、黑籽重楼、具柄重楼、长药隔重楼、球药隔重楼、宽叶重楼、狭叶重楼、南重楼等均为同源性较高的种属，具有真实成为正品重楼代用品的潜力。通过 ITS2 序列的发育树分析可准确区分伪品珠芽蓼、开口箭、禹白附，再结合其他特征进一步区分。

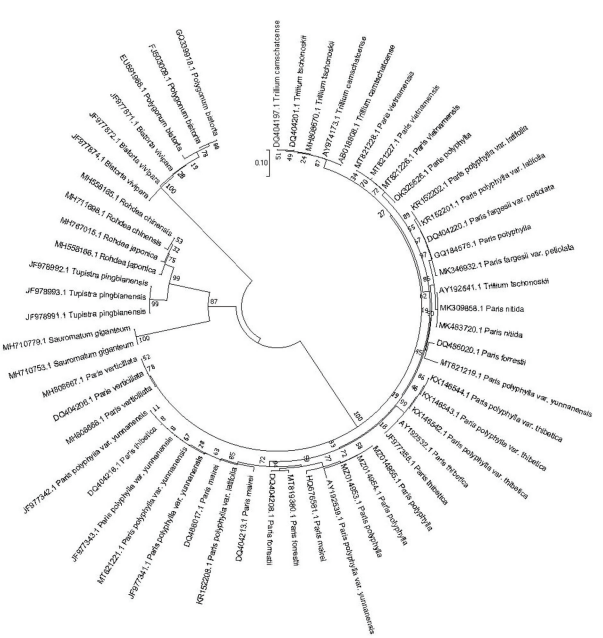
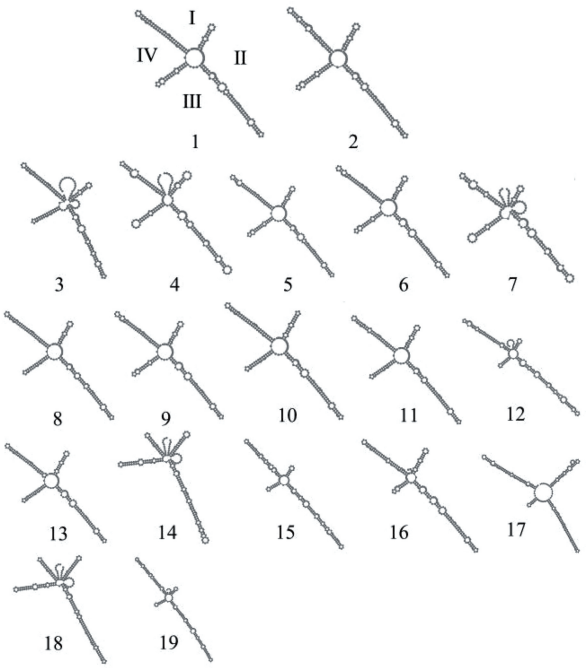


图 1　基于 ITS2 序列的正品重楼及其混伪品的发育树（NJ 法）

3.4　二级结构差异

将标准的 ITS2 序列导入到 ITS2 数据库（http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/）进行二级结构预测，设置“Force homology modeling”，结果见图 2。

由二级结构直观分析可得知，正品重楼及其混伪品的二级结构均由 1 个中心环和 4 个螺旋区组成，云南重楼与七叶一枝花 ITS2 二级结构有明显差异，云南重楼 1 号臂由 1 个发卡环和 4 个错配凸起组成，而七叶一枝花为 1 个发卡环和 2 个内部环以及 2 个错配凸



注：1. *Paris polyphylla var. Yunnanensis*；2. *Paris polyphylla*；3. *Paris vietnamensis*；4. *Paris mairei*；5. *Paris polyphylla var. latifolia*；6. *Paris thibetica*；7. *Paris forrestii*；8. *Paris nitida*；9. *Paris polyphylla var. thibetica*；10. *Paris verticillata*；11. *Paris fargesii var. petiolata*；12. *Tupistra pingbianensis*；13. *Trillium camtschatcense*；14. *Bistorta vivipara*；15. Rohdea *chinensis*；16. *Trillium tschonoskii*；17. *Sauromatum giganteum*；18. *Polygonum bistorta*；19. *Rohdea japonica*。

图 2 正品重楼及混伪品 ITS2 二级结构

起组成；2 号臂两者差异较小，均包含 1 个发卡环 1 个内部，云南重楼包含 1 个错配凸起而七叶一枝花为两个；3 号臂七叶一枝花较云南重楼少 1 个内部环且后者内部环较大；4 号臂两者差异较小，均包含 1 个发卡环及两个内部环，七叶一枝花较长。两者中心环大小无明显差异。混伪品中，3、8、9、10、13、14、17 号1 号臂与云南重楼相似，14、17 号 1 号臂较短可直接区分。7 号 1 号臂与七叶一枝花相似，其余混伪品可通过1 号臂上发卡环数量等差异准确鉴别。3 号混用品 1 号臂和 2 号臂之间存在突环而云南重楼无突环可作特征进一步鉴别。7 号混用品包含多个突环可与七叶一枝花准确区别。8 号混用品 3 号臂同样包含 4 个内部环及 1 个发卡环，但云南重楼 2、3 内部环相连且明显较大可作为区分特征。9 号混用品 1 号臂内包含 1 个较小的内部环以及 3 号臂仅为 3 个内部环可与云南重楼区分。10 号混用品 2 号臂包含 2 个内部环、3 号臂包含 3 个内部环、4 号臂无内部环可与与南重楼区别。13 号伪品 1 号臂靠近中心环处有 1 小内部环、2 号臂包含 2 个内部环、3 号臂包含 3 个内部环可与云南重楼鉴别。

4 总结与讨论

重楼作为重要的中草药原材料，具有良好的抗菌、抗病毒、抗炎等药理作用[43]，在复方中运用广泛。长期的使用过程中，市面上流通多种混伪品，在一定程度上造成了重楼药材来源的品种混乱和质量良莠不齐，使得重楼临床用药安全带来隐患，对重楼药材的准确鉴别有极大的现实意义。

本研究基于文献及工作经验选取了民间及市面常见混伪品，通过原植物性状、药材性状显微特征以及 ITS2 序列进行对比分析研究。伪品原植物形态与正品、混用品之间差异明显，正品重楼与民间混用品之间原植物形态差存在稳定鉴别特征，可通过如茎、花、叶、果实种子等特征对混用品进行区分，原植物形态是鉴别正品重楼及其混伪品行之有效的方法。然而在现实流通中，部分药材采购商无法接触原植物形态对药材进行鉴别，导致重楼药材出现掺混、掺假现象，严重威胁中成药生产以及患者使用的安全有效性。因而除通过原植物形态进行鉴别的方法外需建立通过基于药材鉴定的合理有效途径。

总结分析正品重楼及其混伪品之间的性状差异可得出，重楼与混品之间的性状差异较小，均表现为黄棕色、黄褐色等，外形为结节状、略弯曲的圆形或椭圆形，质地坚硬、断面平坦等特点，无法实现准确区分；与伪品间颜色、外形、断面等差异均不明显。性状鉴别在实践过程中受检验者主观影响较大，难以作为合理有效的鉴别手段。显微差异分析结果显示，正品及混用品均表现为淀粉粒众多，其中七叶一枝花、长柱重楼、球药隔重楼均脐点不明显，云南重楼及其余混用品均脐点明显，呈现为人形、一字型等。草酸钙针晶细呈束状或散状分布，文献报道不同种针晶束长度存在区别，导管为螺纹、梯纹导管，横切面表皮细胞、内皮层细胞存在一定差异[8-12]。伪品与正品及混用品的辨别可通过草酸钙晶型、横切面显微特征进行有效区别。然而显微鉴别结果与鉴别工作者操作能力、经验相关，其结果准确性易因种植环境、营养条件、生长年份等因素影响，需在此基础上结合其他鉴别方法进行进一步鉴定。

分子生药学鉴定手段是近年来提出的药材基源鉴定的有效手段，其基于药材某个基因的序列进行遗传信息分析，通过碱基的变化和差异计算相互之间的进化关系[44]。本研究中通过下载数据库中正品重楼及其混伪品 ITS2 扩增序列，基于隐马尔科夫原则获得标准 IST2 间隔序列，分析序列及发育树结果可得知正品重楼与混用品（除南重楼）之间差异较小，序列同源性较高，说明长柱重楼、黑籽重楼等与正品重楼之间物种

亲缘关系近。伪品除头顶一颗珠(吉林延龄草、白花延龄草)与正品及混用品之间序列同源性均不佳,故可通过建立发育树分析的方法排除伪品开口箭、拳参等。

基于 ITS2 序列二级结构预测分析结果显示,七叶一枝花与滇重楼之间存在细微差异,与其他混伪品之间均存在显著差异,可通过二级结构准确区分,该结果可作为经典鉴别方法的验证,也可作为经典鉴别方法难以鉴别重楼真伪时一种切实可行的方法。

本研究通过对正品重楼及其混用品原植物形态、性状、显微特征归纳总结分析及 ITS2 序列对比及二级结构分析得出,通过植物形态实现对重楼及其混伪品的鉴别,当原植物形态缺乏时,可通过 ITS2 序列联合性状、显微鉴别的方法实现准确有效鉴别,本方法也适用于在地上部分形态难以区分或仅有药材时对多基原药材进行鉴别。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:38,94,229,271.

[2] 李恒,苏豹,张兆云,等. 中国重楼资源现状评价及其种植业的发展对策[J]. 西部林业科学,2015,44(3):1-7,15.

[3] 李恒. 重楼属植物[M]. 北京:科学出版社,1998:24.

[4] 牛雨晴,江保东,朱育菁,等. 七叶一枝花种质资源鉴定与评价研究进展[J]. 福建农业科技,2023,54(9):20-24.

[5] 顾晶晶,杨天梅,杨美权,等. 经典名方中重楼的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(18):186-199.

[6] 徐永艳,李昆,焦蓉,等. 滇重楼优良野生种源评价与筛选[J]. 西南林业大学学报(自然科学),2023,43(1):36-41.

[7] 张翔宇,陈晓芳,柳敏,等. 重楼属药用植物资源分布及少数民族应用研究[J]. 中国野生植物资源,2023,42(1):103-109,116.

[8] 吴顺俭,侯方高,徐光,等. 重楼及其混伪品考[J]. 北京中医,2005,24(4):232-233.

[9] 巨博雅,朱厚达,李燕敏,等. 重楼药材和混伪品中 5 种皂苷的含量及对《中国药典》2015 年版重楼含量测定修订的探讨[J]. 中国中药杂志,2020,45(8):1745-1755.

[10] 王强,徐国钧,李恒,等. 中药重楼的显微鉴定研究[J]. 中国药科大学学报,1989,20(6):330-334.

[11] 陆保平,林根平,曾建华,等. 两种重楼混伪品的鉴别比较[J]. 中国药业,2007,(18):55-56.

[12] 杨月娥,陶汝晋,刘玉雨,等. 3 种重楼属药用植物的生药学研究[J]. 中国现代应用药学,2021,38(22):2775-2780.

[13] 黄哲,杨烨,王世清,等. 基于 ITS2 序列的黔产金线莲及其常见易混品分子鉴定研究[J]. 现代中药研究与实践,2023,37(4):11-15.

[14] 杨烁. ITS2 二级结构在药用植物 DNA 条形码鉴定中的可行性[D]. 济南:山东大学,2017.

[15] 张占平,陆佳欣,徐姣,等. 药用植物 DNA 条形码与分子标记技术的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2024,41(5):653-661.

[16] YU N, WEI Y L, ZHANG X, et al. Barcode ITS2: a useful tool for identifying *Trachelospermum jasminoides* and a good monitor for medicine market[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5037.

[17] 张欢欢,徐金娣,周静,等. 基于 COI 条形码的市售蝉蜕及其混淆品 DNA 分子鉴定研究[J]. 中草药,2024,55(6):2057-2065.

[18] 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.

[19] 陈士林. 中药 DNA 条形码分子鉴定[M]. 北京:人民卫生出版社,2012:4.

[20] 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.

[21] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第一卷)[M]. 北京:科学出版社,2004:16,37,42,86-92,97,323.

[22] 符德欢,王丽,郭佳玉,等. 4 种重楼属药用植物的比较鉴别研究[J]. 云南中医学院学报,2017,40(4):83-86,97.

[23] 杨琳,程江雪,王艳,等. 陕产七叶一枝花的生药学研究[J]. 中国现代中药,2020,22(11):1844-1850.

[24] 夏从龙. 长柱重楼[J]. 大理大学学报,2024,9(8):102.

[25] 中草药杂志社. 毛重楼[J]. 中草药,2020,51(20):5122.

[26] 赵兴蕊,刘常逊,杨发建,等. 黑籽重楼的生药学研究[J]. 中国药房,2018,29(23):3246-3250.

[27] 程虎印,杨哲,程江雪,等. 陕产具柄重楼的生药学研究[J]. 中医药导报,2019,25(7):39-44.

[28] 赵兴蕊,刘常逊,杨发建,等. 宽叶重楼的生药学研究[J]. 中国民族民间医药,2018,27(23):56-58,68.

[29] 雷婧艺,程虎印,张逸潇,等. 陕产长药隔重楼的生药学研究[J]. 陕西中医药大学学报,2020,43(6):36-43.

[30] 段志刚,刘江,夏从龙. 南重楼的生药学研究[J]. 大理大学学报,2016,1(4):29-32.

[31] 尹鸿翔,王庆鹤,赵灵,等. 球药隔重楼品种整理及其混用种的真伪鉴别研究[J]. 中药材,2020,43(10):2378-2384.

[32] 刘玉雨. 云南重楼属植物分类整理与质量评价研究[D]. 大理:大理大学,2019.

[33] 于风蕊,林林,穆向荣,等. 拳参与其易混淆品的鉴别研究[J]. 时珍国医国药,2020,31(10):2408-2411.

[34] 黄婧文. 白附子与附子的鉴别[J]. 实用中医药杂志,2020,36(7):962.

[35] 王俊丽,公维镇,肖璇,等. 藏药珠芽蓼的研究与应用[J]. 中央民族大学学报(自然科学版),2010,19(1):28-33.

[36] 李若樨,张晓存,石召华. 头顶一颗珠的质量研究[J]. 中药材,2017,40(8):1898-1902.

[37] 邹翔,曲中原,朱世儒,等. 虎眼万年青生药学研究[J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版),2019,35(5):515-518.

[38] 杨秋琛,王慧娜,赵桦. 开口箭药材生药学特征研究[J]. 陕西理工学院学报(自然科学版),2016,32(1):76-81.

[39] 竺叶青,施大文,梁宏伟,等. 拳参及其类似品的生药鉴别与鞣质含量[J]. 上海医科大学学报,1994,21(2):129-134,T009.

[40] 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.

[41] KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Mol Biol

Evol,2016,33(7):1870 - 1874.
[42] ANKENBRAND M J,KELLER A,WOLF M,et al. ITS2 database V: twice as much[J]. Mol Biol Evol,2015,32(11):3030 - 3032.
[43] 管鑫,李若诗,段宝忠,等. 重楼属植物化学成分、药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药,2019,50(19):4838 - 4852.
[44] 谭新宁,吴文如,来慧丽,等. 分子生药学研究的计量学及可视化分析[J]. 中华中医药学刊,2020,38(11):218 - 224,294 - 298.

Research Progress on Comprehensive Morphological and Microscopic Authentication of Paris polyphylla and ITS2 Sequence Analysis

YANG Zhicheng[1], JI Hong[2], SUN Caihong[1], YE Liang[3], YE Guan[1]
(1. *Institute of Chinese Materia Medica, Central Research Institute, Shanghai Pharmaceutical Group Co., Ltd., Shanghai* 201203, *China*; 2. *Damazhen Health Center, Tongxiang* 314514, *China*; 3. *School of Traditional Chinese Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing* 211198, *China*)

Abstract Based on identification techniques including morphological characteristics, microscopic features, physicochemical properties and DNA sequences, this paper reviews and analyzes the differences between genuine Paris polyphylla and its adulterants to provide references for authentication. The varieties of genuine P. polyphylla and its adulterants were summarized based on literature, including differences in original plant morphology and microscopic characteristics. The ITS2 sequences of P. polyphylla and its adulterants were downloaded from public databases, standardized based on Hidden Markov Model principles, and subjected to sequence alignment, secondary structure prediction and phylogenetic tree cluster analysis. The main adulterants of genuine P. polyphylla include P. fargesii, P. latifolia, P. thibetica and P. forrestii, while common counterfeits are Polygonum bistorta, Polygonum viviparum and Typhonium giganteum. Significant differences exist between genuine and adulterant materials in plant morphology (stem, leaf, flower, fruit and seed) and microscopic identification, while crude drug characteristics and microstructures show minor differences. In DNA sequence identification, the ITS2 sequences show minor differences between genuine and adulterant materials but significant differences from counterfeits. Genuine and adulterant materials can be effectively distinguished by plant morphology, while ITS2 sequences and their secondary structures can rapidly and accurately identify counterfeits when only crude drugs are available. This study provides references for clinical safety and quality evaluation of P. polyphylla, and may also serve as reference for authentication of other medicinal materials.

Key words Paris polyphylla; Adulterants; Morphological identification; Character identification; Microscopic identification; ITS2 sequence