

莫建梅,刘莺燕,李庆国,等.“龙头凤尾”铁皮石斛基因鉴别及复方胶囊降血糖研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(1):182-185.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.01.044

“龙头凤尾”铁皮石斛基因鉴别及复方胶囊降血糖研究

莫建梅¹, 刘莺燕², 李庆国¹, 李进进³, 廖俊杰³

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006; 2. 湖北省宜昌市当阳人民医院检验科, 湖北宜昌 444100;

3. 广东轻工职业技术学院, 广东广州 510300)

摘要:利用目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, 简称 SCoT) 和巢式(Nested)PCR 2 种分子标记技术建立“龙头凤尾”铁皮石斛 DNA 分子鉴别的方法, 并研究其复方制剂的降血糖作用。用 SCoT 标记设计 1 对引物 SC3, 开发特异性检测“龙头凤尾”铁皮石斛的 Nested PCR 方法, 建立分子鉴别质量标准; 利用鉴别后的石斛制备复方胶囊, 对链脲佐菌素加高脂饲料复制的胰岛素抵抗/脂代谢紊乱型糖尿病大鼠进行降血糖药效学研究, 观察其对模型大鼠空腹血糖、糖耐量、血清胆固醇、胰岛素等的影响。结果显示, 用设计的特异性引物 SC3 对其进行 SCoT-Nested PCR 扩增后, 仅在睿绅 2 号中扩增出 1 条清晰的目标条带, 而在其他铁皮石斛品种中均没有出现目标条带, 从而实现特异性鉴别。其复方石斛胶囊降血糖作用的规律为: 与正常对照组比较, 造模组大鼠血糖水平、血糖曲线下面积、总胆固醇含量显著增加($P < 0.01$), 血清胰岛素含量显著减少($P < 0.01$); 与造模组比较, 复方胶囊高、中剂量组大鼠血糖水平、血糖曲线下面积、总胆固醇含量显著减少($P < 0.05$), 大鼠体质量、血清胰岛素含量显著增加($P < 0.05$)。说明 SCoT-Nested PCR 分子标记可以利用 1 对引物 SC3 对“龙头凤尾”铁皮石斛睿绅 2 号进行特异性鉴别; 其制备的复方胶囊高、中剂量组对链脲佐菌素加高脂饲料致胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型大鼠具有一定的降血糖作用, 增加胰岛素分泌, 降低血清胆固醇含量。能够提高该品种石斛的质量标准, 其制剂产品具有较好的降血糖作用。

关键词:“龙头凤尾”铁皮石斛; SCoT 标记; Nested PCR; 降血糖; 基因鉴别

中图分类号: S567.23⁺9.01; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)01-0182-04

铁皮石斛为兰科石斛属多年草本附生植物, 富含多糖、生物碱等成分^[1], 能增强胰岛素活性和降低糖尿病患者血糖作

用^[2]。传统的石斛鉴定是基于形态学、解剖学和化学分析的传统方法, 以形态、感官为主, 如茎粗、质量、嚼之黏牙、味甘、无渣等为指标^[3-4], 但这些传统方法并不能完全反映药材的内在质量, 很难从幼苗或干茎中鉴定石斛属物种, 也不利于产业管理的规范化。近年来, 随着 DNA 分子标记技术的发展, 应用这些技术鉴定石斛品种得到了迅速的发展^[5]。其中, 以目标起始密码子多态性(start codon targeted polymorphism, SCoT) 标记技术^[6]在石斛鉴定、种质源评估以及遗传多样性和亲缘关系分析上得到了较为广泛的应用。巢式 PCR (nested PCR) 分子标记因其扩增非常具有特异性而被广泛应

收稿日期: 2018-04-23

基金项目: 广东省东莞市科技局产学研项目(编号: 2014509108107)。
作者简介: 莫建梅(1992—), 女, 广西桂林人, 硕士, 研究方向为药物新剂型与制剂新技术。E-mail: 1052995279@qq.com。共同第一作者: 刘莺燕(1977—), 女, 湖北当阳人, 主管技师, 研究方向为医学检验, E-mail: 494101296@qq.com。

通信作者: 廖俊杰, 硕士, 教授, 研究方向为农业生物技术。E-mail: 1446883556@qq.com。

[10] 张全景, 冯小海, 徐虹, 等. ϵ -聚赖氨酸在冷鲜猪肉保鲜中的应用[J]. 食品科学, 2011, 32(2): 290-296.

[11] Deus D, Kehrenberg C, Schaudien D, et al. Effect of a nano-silver coating on the quality of fresh Turkey meat during storage after modified atmosphere or vacuum packaging[J]. Poultry Science, 2017, 96(2): 449-457.

[12] Mancini R A, Kropf D H, Hunt M C, et al. Effects of endpoint temperature, pH, and storage time on cooked internal color reversion of pork longissimus chops[J]. Journal of Muscle Foods, 2005, 16(1): 16-26.

[13] Zarate J R, Zaritzky N E. Production of weep in packaged refrigerated beef[J]. Journal of Food Science, 2010, 50(1): 155-159.

[14] 孙灵霞, 赵改名, 柳艳霞, 等. 动物因素对肌肉保水性影响的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(3): 731-732, 743.

[15] Kawai T, Kubota T, Hiraki J, et al. Biosynthesis of epsilon-poly-L-lysine in a cell-free system of *Streptomyces albulus* [J].

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 311(3): 635-640.

[16] 李昆伦, 李江阔, 张鹏, 等. ϵ -聚赖氨酸在食品中应用的研究进展[J]. 保鲜与加工, 2010, 1(1): 11-15.

[17] 张伟娜, 李迎秋. ϵ -聚赖氨酸在食品中应用的进展[J]. 中国食品添加剂, 2012, 37(5): 207-211.

[18] 邹凯华, 展海军. ϵ -聚赖氨酸作为食品防腐剂的应用[J]. 食品研究与开发, 2008, 1(1): 165-168.

[19] 张东荣, 张超, 段作营, 等. ϵ -聚赖氨酸抑菌性能的初步研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2006, 3(3): 75-76, 78-80.

[20] 贾秀春, 吴凤娜, 李迎秋, 等. 壳聚糖在冷却肉保鲜中的应用[J]. 山东轻工业学院学报(自然科学版), 2012, 26(1): 9-12.

[21] Soutos N, Tzikas Z, Abraham A, et al. Chitosan effects on quality properties of Greek style fresh pork sausages[J]. Meat Science, 2008, 80(4): 1150-1156.

用^[7-8],其结果一般表现为扩增片段的有无,具有简单易用、重复性好、扩增结果无须测序等优点。SCoT 分子标记和巢式 PCR 分子标记二者的结合将为铁皮石斛的鉴定提供新的检测手段。

本研究所用的铁皮石斛是由东莞市睿绅生物技术有限公司以“三步法”栽培的“龙头凤尾”形,是优质的石斛新品种,其多糖含量高达 45.34%,比普通市售石斛的多糖含量高 80% 左右[《中华人民共和国药典(2015 年版)》规定多糖含量 $\geq 25\%$],由于其多糖含量显著高于市售产品,对其进行基因鉴别和产品开发非常有必要。本研究基于 DNA 分子标记技术,采用 SCoT 分子标记和巢式 PCR 分子标记结合技术进行药材鉴别研究,建立高产优质“龙头凤尾”铁皮石斛的质量标准。在此基础上,以高糖铁皮石斛睿绅 2 号为君药,配伍五味子、黄芪、葛根等中药,开发复方胶囊产品,用链脲佐菌素加高脂饲料复制的胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱型糖尿病大鼠进行降血糖药效学研究,观察本复方对模型大鼠的血糖含量、糖耐量、血清胰岛素含量、胆固醇含量等的影响,以明确本复方是否具有降低血糖的药效学作用,为开发铁皮石斛新型保健品提供理论依据。

1 试验材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 5020 型 96 孔梯度 PCR 仪、超微量紫外分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];2500 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);C. B. S 水平电泳槽[伯乐生命科学产品(上海)有限公司];血糖仪、试纸(瑞士罗氏制药有限公司);5427 型冷冻离心机(艾本德中国有限公司);1510 型酶标仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];EL204-IC 型电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司)。

1.1.2 试验药品 基因组 DNA 提取试剂盒(批号:DP305,北京天根生化科技有限公司);具有核酸外切酶(exonuclease)活性的耐热性 DNA 聚合酶(Ex Taq 酶)[批号:RR01AM,宝日医生物技术(北京)有限公司];具有核酸外切酶(exonuclease)活性的耐热性 DNA 聚合酶预混合液(Ex Taq PCR Master Mix)[批号:RR003A,宝日医生物技术(北京)有限公司];SYBR® Safe 脱氧核糖核苷酸(DNA)凝胶染料[批号:S33102,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];引物均由华大基因科技有限公司合成;链脲佐菌素(批号:S0130,美国 Sigma 公司);盐酸二甲双胍(批号:M107827,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);葡萄糖(天津市致远化学试剂有限公司);大鼠胰岛素酶联免疫检测试剂盒(武汉华美生物工程公司);总胆固醇测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);高脂高胆固醇饲料(广东省医学实验动物中心)。

1.1.3 植物样本 4 种石斛样本分别为铁皮石斛睿绅 2 号、睿绅 1 号、睿绅 3 号、睿绅 4 号,记为 RS-2、RS-1、RS-3、RS-4。4 种石斛样本均由东莞市睿绅生物技术有限公司栽培与提供。

1.1.4 石斛复方制剂制备处方及制备方法 称取葛根、五味子、黄芪药材(质量比为 1:2:2),加入 10 倍量溶剂(30%乙醇),提取 3 次,每次 1 h,合并滤液,过滤,滤液经减压浓缩,真空干燥后,加入铁皮石斛睿绅 2 号超微粉适量混匀,湿法制

粒,70%乙醇润湿,将制得颗粒于 50~60℃干燥 2 h 左右,将干燥后的颗粒过 20 目筛,整粒,直接填充胶囊即可。

1.1.5 试验动物 健康 SPF(无特定病原体)级,斯泼累格·多雷(Sprague Dawley,简称 SD)大鼠,雄性 80 只,体质量为(160±20)g,由广州中医药大学科学实验动物中心提供[动物使用合格证号:SCXK(粤)2013-0034];试验地点为广州中医药大学科学实验动物中心,试验时间为 2017 年 11 月至 2018 年 2 月[广东省动物实验证明许可证号:SCXK(粤)2013-0085]。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)提取总 DNA,所得 DNA 用超微量紫外可见分光光度计和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量及完整性,根据检测结果将 DNA 浓度稀释至 20 ng/μL, -20℃保存备用。

1.2.2 SCoT-PCR 标记的扩增 对 4 种石斛样本使用通用 SCoT 引物 S8(5'-CAACAATGGCTACCACGT-3')进行 SCoT-PCR 扩增。SCoT-PCR 反应体系为 20 μL:1 μL 20 ng/mL DNA 模板, Mg²⁺ 浓度为 2.0 mmol/L、dNTPs 浓度为 0.2 mmol/L、0.2 μL 5 U/mL Ex Taq DNA 聚合酶和引物 0.5 μmol/L,不足用 ddH₂O(去离子水)补足;扩增程序参考 Collard 等的原始扩增程序^[8]略作修改:94℃预变性 3 min;94℃变性 1 min,52℃退火 1 min,72℃延伸 2 min,35 个循环;72℃延伸 10 min。

1.2.3 SCoT 特异片段的回收、克隆、测序及引物设计 扩增获得的铁皮石斛睿绅 2 号 SCoT 特异性 DNA 片段进行回收、纯化及克隆并送往北京六合华大基因科技有限公司进行序列测定。使用在线程序 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)分析测序的 DNA 序列的同源性,并且使用在线 Primer 3(<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>)对特异性 SCoT 片段的核苷酸序列设计 1 对特异性引物 SC3:上游引物的序列为 5'-CTCGCCATATCGTCGAGCA-3';下游引物的序列为 5'-ACGTTCTGTTATGGGGTCCT-3'。

1.2.4 SCoT-Nested PCR 标记检测体系的建立 以 4 种石斛样本 DNA 为模板,进行 SCoT-Nested PCR 标记特异性个体验证,将第 1 次 SCoT-PCR 的扩增产物作为第 2 次扩增的 DNA 模板来进行巢式 PCR 扩增。20 μL 巢式 PCR 反应体系为 10 μL Ex Taq PCR Master Mix, 2 μL 2.5 mmol/L 引物, 1 μL 模板(稀释 1 000 倍),不足用 ddH₂O(去离子水)补足。PCR 仪扩增条件为:94℃预变性 4 min;94℃变性 50 s,58℃退火 45 s,72℃延伸 60 s,30 个循环;72℃延伸 8 min。扩增反应结束后,取 8 μL 扩增产物,向样品中加入 2 μL 6×上样缓冲液,在 1% 琼脂糖凝胶(含核酸染料)中电泳分离,最后在凝胶成像系统观察和记录。

1.2.5 模型的复制 雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后,根据体质量随机分成 6 组(正常组与 5 组造模组),正常组继续喂食普通饲料,造模组更换高脂饲料,喂饲 3 周后禁食至少 12 h(不禁水),正常组腹腔注射生理盐水 28 mg/kg,造模组给予链脲佐菌素(STZ)28 mg/kg[用 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠溶液(pH 值为 4.0)稀释成 1%溶液]腹腔注射。造模组继续给予高脂饲料喂饲 3~5 d,尾静脉采血测定空腹血糖(禁食

4 h),15~20 min 后经口给予葡萄糖 2.5 g/kg,测定给葡萄糖后各组 0.5、2.0 h 的血糖值,0.5 h 血糖值 ≥ 10 mmol/L 纳入胰岛素抵抗糖/脂代谢紊乱模型。

1.2.6 样品及处理 试验分为 6 个组,即正常对照组(等容生理盐水),模型对照组(等容生理盐水),二甲双胍组(125 mg/kg)、铁皮石斛复方胶囊高、中、低(1.0、0.5、0.25 g/kg)剂量组,灌胃给药,给药量均为 1 mL/100 g,连续 28 d,自由进食、饮水,每周测定大鼠体重。

1.2.7 指标检测

1.2.7.1 空腹血糖值的测定 试验 4 周后,大鼠禁食不禁水 4 h,用血糖仪尾静脉采血测定空腹血糖值。

1.2.7.2 糖耐量试验 试验 4 周后,大鼠禁食不禁水 4 h,测定空腹血糖值,15~20 min 后经口给予葡萄糖 2.5 g/kg,尾静脉采血测定给予葡萄糖后 0.5、2.0 h 的血糖值,进行糖耐量试验,计算血糖曲线下面积。

1.2.7.3 血清胆固醇水平和血清胰岛素水平的测定 各组动物禁食不禁水 4 h,腹主动脉取血,按测定试剂盒说明方法检测血清总胆固醇水平,酶联免疫法测定血清胰岛素水平。

1.2.8 统计学方法 试验数据用 SPSS 20 软件包进行统计分析,计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示;用单因素方差进行组间组内分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 SCoT-PCR 标记结果分析

对 4 种石斛样本使用通用 SCoT 引物 S8 进行 SCoT-PCR 扩增,结果表明,在同一迁移位置上,只有睿绅 2 号才特有的电泳条带,而其他 3 种石斛在相同位置均没有出现相同的条带(图 1)。将该 PCR 扩增片段回收克隆测序确定该片段长度为 1 568 bp,BLAST 比对发现,NCBI 数据库中无任何同源序列。

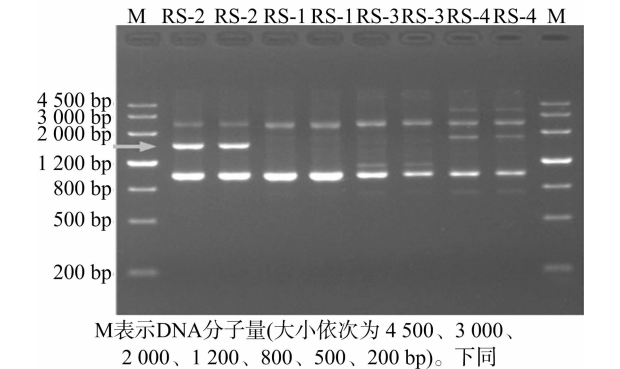


图1 4 种石斛栽培品种 SCoT 引物 S8 的扩增结果

2.2 SCoT-Nested PCR 标记引物的特异性检测

以 4 种石斛样本 DNA 为模板,进行睿绅 2 号 SCoT-Nested PCR 标记特异性个体验证。结果表明,用设计的特异性引物对其进行扩增后,仅在睿绅 2 号中扩增出 1 条清晰的目标条带,而在其他 3 个石斛品种中均没有出现目标条带(图 2)。因此,此引物只对睿绅 2 号有特异性扩增效果,从而对其进行特异性鉴别。

2.3 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠体质量的影响

给药前,各组体质量均无显著性差异;给药 4 周后,与正常对照组比较,造模组大鼠体质量显著降低($P < 0.01$);与造

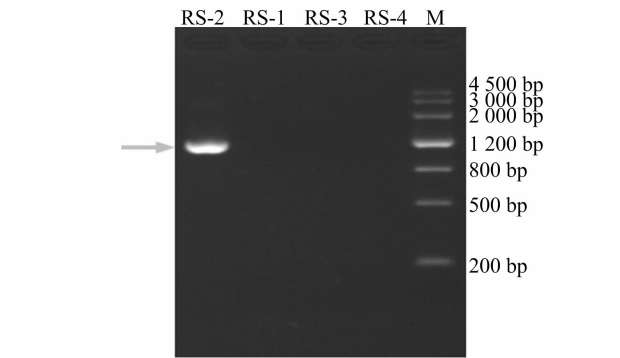


图2 4 种石斛栽培品种 SCoT-Nested PCR 标记扩增结果

表 1 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠体质量的影响

组别	大鼠体质量(g)	
	给药前	给药 4 周后
正常对照组	405.17 \pm 29.14	485.25 \pm 43.24
造模组	385.45 \pm 27.69	426.36 \pm 36.58 **
复方胶囊低剂量组	399.40 \pm 37.22	434.63 \pm 37.12
复方胶囊中剂量组	404.27 \pm 25.59	463.72 \pm 43.69 #
复方胶囊高剂量组	405.00 \pm 30.02	465.00 \pm 36.65 #
二甲双胍组	402.90 \pm 27.98	469.00 \pm 54.96 #

注:**表示与正常对照组比较在 0.01 水平上差异显著;#、##分别表示与造模组比较在 0.05、0.01 水平上差异显著。下同。

2.4 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠空腹血糖值的影响

给药前,与正常对照组比较,造模组大鼠空腹血糖值显著升高($P < 0.01$);与造模组比较,二甲双胍组,铁皮石斛复方胶囊中、低、高剂量组大鼠血糖无显著性差异。给药 4 周后,与正常对照组比较,造模组大鼠空腹血糖值显著升高($P < 0.01$);与造模组比较,铁皮石斛复方胶囊中、高剂量组大鼠空腹血糖值显著降低($P < 0.05$),表明铁皮石斛复方胶囊具有明显控制模型大鼠血糖值升高的作用,并存在一定的剂量依赖关系(表 2)。

表 2 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠血糖值的影响

组别	血糖水平(mmol/L)	
	给药前	给药 4 周后
正常对照组	5.99 \pm 0.63	5.78 \pm 0.46
造模组	25.11 \pm 6.73 **	26.60 \pm 6.73 **
复方胶囊低剂量组	25.01 \pm 7.17	24.51 \pm 7.60
复方胶囊中剂量组	24.83 \pm 6.77	19.68 \pm 8.23 #
复方胶囊高剂量组	25.67 \pm 7.54	18.10 \pm 8.18 #
二甲双胍组	25.85 \pm 6.49	15.81 \pm 9.72 #

2.5 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠糖耐量的影响

与正常对照组比较,造模组大鼠血糖值显著升高,曲线下面积显著增加($P < 0.01$);与造模组比较,给药 2.0 h 后铁皮石斛复方胶囊高、中剂量组模型大鼠曲线下面积显著减少($P < 0.05$)(表 3)。

2.6 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠血清总胆固醇和血清胰岛素的影响

与正常对照组比较,造模组大鼠血清总胆固醇水平显著升高

表 3 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠糖耐量的影响

组别	血糖值(mmol/L)			曲线下面积 (mmol/L)
	0 h	0.5 h	2.0 h	
正常对照组	5.78 ±0.46	7.43 ±0.58	6.96 ±0.58	12.85 ±0.72
造模组	26.60 ±6.73	31.07 ±6.73	28.78 ±6.53	55.95 ±12.37**
复方胶囊低剂量组	24.51 ±7.60	29.51 ±7.99	28.64 ±6.61	53.37 ±13.12
复方胶囊中剂量组	19.68 ±8.23	26.15 ±8.67	22.99 ±6.13	43.46 ±14.50 [#]
复方胶囊高剂量组	18.10 ±8.18	26.61 ±8.49	22.28 ±8.04	41.46 ±16.08 [#]
二甲双胍组	15.81 ±9.72	21.90 ±9.63	23.16 ±8.26	38.66 ±18.13 [#]

($P<0.01$),造模组大鼠血清胰岛素水平显著降低($P<0.01$)。与造模组比较,二甲双胍组,铁皮石斛复方胶囊中、高剂量组模型大鼠总胆固醇水平显著降低($P<0.05$),胰岛素水平显著升高($P<0.05$);低剂量给药组模型大鼠总胆固醇、胰岛素水平没有显著性差异(表 4)。大鼠血清总胆固醇、血清胰岛素的测定,严格按照试剂盒说明书进行。

表 4 铁皮石斛复方胶囊对模型大鼠总胆固醇、血清胰岛素的影响

组别	动物数 (只)	胆固醇水平 (mmol/L)	胰岛素水平 (×10 ⁻⁶ IU/L)
正常对照组	8	1.83 ±0.29	38.94 ±10.35
造模组	9	12.65 ±6.28**	17.72 ±9.03**
复方胶囊低剂量组	9	10.56 ±5.57	23.57 ±8.64
复方胶囊中剂量组	9	7.53 ±2.77 [#]	26.85 ±9.35 [#]
复方胶囊高剂量组	8	7.08 ±2.73 [#]	27.51 ±9.32 [#]
二甲双胍组	8	6.27 ±1.54 [#]	32.26 ±6.93 [#]

3 讨论与结论

本试验中 SCoT 和 Nested PCR 的组合,显著改善了该技术的稳定性和可靠性。SCoT - Nested PCR 分子标记表明,利用设计的特异性引物可以对睿绅 2 号进行特异性鉴别,此遗传标记的使用可以大大减少育种时间、节省人力和物力,便于快速大量筛选子代,并且从分子水平上进行特异性鉴别,对于保证中药质量规范其生产全过程,促进中药材标准化,保证该复方制剂临床用药有效、安全、稳定具有重要的科学意义和应用价值。

铁皮石斛是我国传统的中药材,兼具药物和健康保健功效^[9-12],其制备复方制剂的研究结果表明,采用高热量饮食并结合低剂量链脲佐菌素腹腔注射的方法复制糖尿病模型后,血糖水平显著升高($P<0.01$),分别给予高、中、低剂量(1.0、0.5、0.25 g/kg)铁皮石斛复方胶囊后,模型大鼠空腹的血糖值和血糖曲线下面积有不同程度的降低,并存在一定的剂量依赖关系,其中高、中剂量组能显著减少总胆固醇水平($P<0.05$),增加血清胰岛素含量($P<0.05$),说明铁皮石斛复方胶囊可能具有修复或者提高胰岛 B 细胞功能,抑制糖尿病可能的发病机制^[13],在降低血糖方面具有一定的效果。

目前,铁皮石斛活性成分的研究主要集中在多糖等类物质上。本试验制备的复方制剂,给药剂量小(1.0、0.5 g/kg),降血糖作用显著。陈爱君等以 3 g/kg 铁皮石斛剂量灌胃给药,可降低四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖水平^[14],但给药剂量明显高于本研究结果。因此,建立高质量的铁皮石斛药材质量标准并开发有效的复方制剂,是石斛产业日后的主要发展方向。

参考文献:

[1]罗绪强,周金星,张桂玲,等. 黔产铁皮石斛不同部位多糖、氨基

酸及必需元素含量[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):150-153.
[2]陈超琴,蒋丽华,赵黎明,等. 石斛多糖的研究进展[J]. 食品工业科技,2012,33(2):441-445.
[3]朱 照. 目前市售几种石斛属的形态分类鉴别[J]. 中国中医药信息杂志,2003,10(9):37-38.
[4]刘学平,汤明辉,戴 涌,等. 中药石斛类粉末的显微鉴定研究[J]. 中国药科大学学报,1992,23(3):148-151.
[5]丁 鸽,张代臻,丁小余. 石斛资源分子水平研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(4):208-215.
[6]龙治坚,范理璋,徐 刚,等. SCoT 分子标记在植物研究中的应用进展[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(2):336-343.
[7]徐静静,蒯 宇,董立明,等. 用 SSR 标记和巢式 PCR 快速检测大豆疫霉菌[J]. 中国农业科学,2009,42(5):1624-1630.
[8]Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter,2009,27(1):86-93.
[9]张桂玲,冉 靛,罗绪强,等. 3 种不同产地铁皮石斛与铁皮枫斗多糖、氨基酸及必需元素含量分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):146-149.
[10]陈 芳,谷晓平,梁 平,等. 不同栽培方式下铁皮石斛有效成分和光合特性的变化[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):90-93.
[11]袁颖丹,李 志,胡冬南,等. 铁皮石斛仿生栽培中不同附生树种和栽培基质的效应[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):112-114.
[12]罗绪强,周金星,张桂玲,等. 黔产铁皮石斛不同部位多糖、氨基酸及必需元素含量[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):150-153.
[13]Unger R H. Role of glucagon in the pathogenesis of diabetes: the status of the controversy[J]. Metabolism - Clinical & Experimental, 1978,27(11):1691-1709.
[14]陈爱君,李 钦,张信岳,等. 铁皮石斛膏降糖作用的研究[J]. 中国中医药科技,2009,16(6):457-458.