

# 冬凌草资源评价和可持续利用研究现状与展望

杨 慧, 刘 迪\*

湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉  
Email: 977487074@qq.com, \*liuditcm@126.com

收稿日期: 2020年10月23日; 录用日期: 2020年11月20日; 发布日期: 2020年11月27日

## 摘 要

中药冬凌草为唇形科香茶菜属植物碎米桠 *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara 的干燥地上部分, 其药理活性成分在临床上具有抗肿瘤、抗菌消炎的作用。冬凌草富含的冬凌草甲素、冬凌草乙素由于其显著的抗肿瘤活性近年来得到广泛关注。本文对我国冬凌草资源从种类与分布、化学成分及药理作用、药材质量评价、繁育栽培、分子生药学研究等方面进行了综述, 提出了冬凌草可持续利用的综合建议, 为冬凌草资源的保护、开发和利用以及综合评价, 提供合理化参考。

## 关键词

冬凌草, 繁育栽培, 资源评价, 保护, 可持续利用

# Current Situation and Prospective on Resource Evaluation and Sustainable Utilization of *Rabdosiae Rubescentis* Herba

Hui Yang, Di Liu\*

College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan Hubei  
Email: 977487074@qq.com, \*liuditcm@126.com

Received: Oct. 23<sup>rd</sup>, 2020; accepted: Nov. 20<sup>th</sup>, 2020; published: Nov. 27<sup>th</sup>, 2020

## Abstract

The traditional Chinese medicine *Rabdosiae Rubescentis* Herba is the above-ground herbaceous part of *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara. Its pharmacologically active ingredients have clinically

\*通讯作者。

anti-tumor, anti-bacterial and anti-inflammatory effects. Oridonin and ponidicin, which are rich in *Rabdosiae Rubescentis Herba*, have received widespread attention in recent years due to their significant anti-tumor activity. This review focuses on the research progress of the resources of *Rabdosiae Rubescentis Herba* in our country on species and distribution, chemical components and pharmacological effects, quality evaluation of medicinal materials, breeding and cultivation, and molecular pharmacology, and puts forward comprehensive recommendations for the sustainable use of *Rabdosiae Rubescentis Herba*, to provide a reference for the protection, development and utilization, and the comprehensive evaluation of *Rabdosiae Rubescentis Herba* resources.

## Keywords

**Rabdosiae Rubescentis Herba, Reproduction and Cultivation, Resource Evaluation, Protection, Sustainable Utilization**

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

冬凌草, 学名碎米桠 *Isodon rubescens* (Hemsl.) Hara, 为唇形科香茶属植物, 是多年生草木或亚灌木, 又称六月令、冰凌草, 冰凌草之名来源于冬天全株结满超薄的银白色冰凌片。冬凌草入药部位为其地上部分, 其味苦、甘、微寒; 归肺、胃、肝经, 具有清热解毒, 活血止痛的功效[1]。主要活性成分冬凌草甲素和冬凌草乙素具有抗炎、抑菌、抗肿瘤的功效。河南曾报道, 全草对多种炎症, 如急慢性咽炎、急性扁桃腺炎、慢性肝炎、气管炎均有治疗效果, 对食道癌、胃癌、贲门癌、肝癌、乳腺癌、直肠癌等具有缓解症状、延长患者生命周期的功效, 因此又叫延命草。冬凌草最早发现于河南济源, 在鹤壁太行山脉一带, 当地百姓患牙痛、咽喉痛时, 泡水饮服, 即可见效果[2]。1977年, 冬凌草被收入中国药典。1991年, 我国卫生部颁布中药材标准将其地上部分作为入药部位[3]。冬凌草耐旱耐寒, 可被用来防固风沙, 保持水土, 同时还可用来观赏。因其广泛的利用价值和可观的产量, 而受到研究工作者和种植户们的重视。20世纪末冬凌草的市场价格为0.9元/kg[4], 到2020年冬凌草价格已经增长至6~7元/kg, 近几年价格较为稳定。

## 2. 冬凌草资源种类与分布

冬凌草广泛分布于我国第二阶梯和第三阶梯, 多生于阳坡, 海拔在100~2800米, 灌木丛、林下、砾石地及路边等均有生长, 属于长日照植物, 对环境条件要求不高[5]。因其顽强的生命力和发达的根系, 是开发山区治理水土流失很好的水土保持植物。地球上共有香茶菜属植物150种, 分布在我国的有90个种、21个变种[6], 但近些年不合理的商业和经济开发, 野生资源的数量已经急剧减少。郑新荣等[7]于1989年对河南民间称为的“冬凌草”的植物资源进行了考察, 发现分布在大别山区的为碎米桠的原变种 *Rabdosia rubescens* (已修订为 *Isodon rubescens*), 分布在太行山区的为碎米桠的一个新变种, 即现在的冬凌草 *R. rubescens* var. *taihangensis* Z. Y. Gao & Y. R. Li (已修订为 *I. rubescens* var. *taihangensis* Z. Y. Gao & Y. R. Li); 而分布在卢氏县的为碎米桠的另一个变种, 称为卢氏香茶菜 *R. rubescens* var. *lushiensis* (*I. rubescens* var. *lushiensis* Z. Y. Gao & Y. R. Li); 其次是分布在伏牛山东端的为碎米桠的新变型鲁山香茶菜 *R.*

*rubescens* f. *lushanensis* Z. Y. Gao & Y. R. Li (已修订为 *I. rubescens* f. *lushanensis* Z. Y. Gao & Y. R. Li)。中国科学院昆明植物研究所孙汉董院士从化学分类的角度对冬凌草做了大量研究工作, 认为分类学家将河南省产冬凌草分为三个变种两个变型是合适的, 分别是碎米桠[*I. rubescens* var. *rubescens*, 其两个变型为 f. *rubescens* (碎米桠, 原变型)和 f. *lushanensis* (鲁山香茶菜, 新变型)], 冬凌草(*I. rubescens* var. *taihangensis*, 新变种)和卢氏香茶菜(*I. rubescens* var. *lushiensis*, 新变种), 且贵州冬凌草与卢氏香茶菜同属一个类型。根据冬凌草所含的主要有效化学成分对映-贝壳杉烷类二萜化合物种类与含量的差别, 把传统上认为是不同产地的冬凌草分为四个品种: 第一类为河南鹤壁、济源等太行山脉一带的冬凌草, 主要含 7, 20-环氧对映-贝壳杉烷类二萜衍生物, 故属同一种植物 *R. rubescens* var. *taihangensis* (已修订为 *I. rubescens* var. *taihangensis*); 第二类为河南卢氏、贵州施秉产冬凌草, 主要含 6, 7-断裂-对映-贝壳杉烷类二萜化合物及卢氏冬凌草素, 应来源于植物 *R. rubescens* var. *lushiensis* (已修订为 *I. rubescens* var. *lushiensis*); 第三类为河南栾川和鲁山冬凌草, 二者应属同一植物 *R. rubescens* var. *rubescens* f. *lushanensis* (已修订为 *I. rubescens* var. *rubescens* f. *lushanensis*); 第四类为信阳冬凌草, 主要含有 C-20 位未氧化的对映-贝壳杉烷类二萜化合物, 来源于植物 *R. rubescens* var. *rubescens* f. *rubescens* (已修订为 *I. rubescens* var. *rubescens* f. *rubescens*)。上述各种类型的冬凌草中只有河南济源地区的冬凌草含有冬凌草甲素和冬凌草乙素[8] [9]。2006 年, 河南济源的冬凌草因其质优效佳而被授予“国家地理标志保护产品”这一称号。彼时, 济源冬凌草的种植面积已达 3 万多亩, 年产 2.5 万 t 左右。

### 3. 冬凌草化学成分及药理作用研究

#### 3.1. 化学成分

对冬凌草化学成分的研究从上世纪 70 年代就已开始, 研究表明冬凌草中含有单萜、二萜、三萜等萜类化合物(其中以二萜类化合物为主), 以及挥发油、甾体、黄酮、有机酸和生物碱等[10] [11]。

冬凌草中二萜类化合物是其主要成分, 根据骨架构型可分为对映贝壳杉烷型和螺断贝壳杉烷型两大类。对映贝壳杉烷型二萜化合物包括: 冬凌草甲素、冬凌草乙素、冬凌草丙素、冬凌草丁素、冬凌草戊素、鲁山冬凌草甲素、鲁山冬凌草乙素、鲁山冬凌草丙素、鲁山冬凌草丁素、鲁山冬凌草戊素、信阳冬凌草甲素、信阳冬凌草乙素等; 螺断贝壳杉烷型二萜化合物包括: 卢氏冬凌草甲素、卢氏冬凌草乙素、贵州冬凌草素等。

挥发油类成分包括:  $\alpha$ -蒎烯、 $\beta$ -蒎烯、柠檬烯、1, 8-桉叶素、对-聚伞花素、壬醛、癸醛、 $\beta$ -榄香烯、棕榈酸、三十三烷、角鲨烯等[12] [13]。

黄酮类成分包括: 5,4'-二羟基-6,7,8,3'-四甲氧基黄酮、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、槲皮素、胡麻素、蒽素、大黄素甲醚等[14] [15] [16]。

有机酸类成分包括: 迷迭香酸、水杨酸、阿魏酸、香草酸、咖啡酸等[14] [17]。

#### 3.2. 冬凌草甲素的药理作用

冬凌草甲素属于对映-贝壳杉烷型二萜化合物, 具有显著的抗肿瘤活性。冬凌草甲素抗肿瘤活性机制主要是通过抑制肿瘤细胞的增值、促进肿瘤细胞的凋亡和提高其他抗肿瘤药物的作用强度[18] [19] [20]。张秀萍等用冬凌草甲素与阿霉素共用, 发现冬凌草甲素可抑制阿霉素带来的心肌细胞损伤的副作用[21]。冬凌草甲素抑制肿瘤细胞增值有以下三种方式, 第一是通过遏制细胞周期的进程, 第二是通过降低肿瘤细胞端粒酶的活性。研究发现在肿瘤细胞中存在端粒酶, 正常情况下, 该酶只存在胚胎干细胞和个体体干细胞中, 使这些细胞具有永久增值的能力。因此, 具有端粒酶, 是肿瘤细胞可不断增值的原因之一。第三是通过遏制细胞膜上钠钾泵的活性[22]。史国军等[23]用冬凌草甲素对人肝癌细胞 SMMC-7721 进行

了研究。他发现冬凌草甲素可增强 E-钙黏蛋白的水平、降低波形蛋白的水平, 且呈时间和剂量依赖性, 前者为上皮钙黏蛋白, 介导细胞之间的黏着, 该蛋白含量降低则使细胞易于迁移和扩散, 这一特点即为肿瘤细胞的基本特征之一; 后者属于细胞结构蛋白, 介导细胞的运动, 可通过与肝癌致病因子直接相互作用、调控上皮-间质化过程和抑制 NLRP3/Caspase-1 炎症信号, 促进细胞的迁移, 抑制细胞的凋亡, 在肿瘤细胞中发挥重要作用。鲁遥等[24]通过研究发现冬凌草甲素能有效地抑制乳腺癌 Bcap-37 细胞增殖, 最佳抑制浓度为 32  $\mu\text{g/ml}$ , 最低抑制浓度为 8  $\mu\text{g/ml}$ , 最佳作用时间为 24 h。唐晓华等[25]发现冬凌草甲素对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖具有抑制作用, 其机制通过下调的白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等炎性细胞因子的表达而实现对癌细胞增值的抑制作用。Bi [26]等研究发现冬凌草甲素通过调节 p53 的表达而显示出对胃癌 SNU-216 细胞的抗肿瘤作用。

除此之外, 冬凌草甲素还具有抗炎抑菌作用。Zhao 等[27]发现冬凌草甲素通过降低 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子的浓度来改善脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠模型。其次, 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌(SA)、耐甲氧西林葡萄球菌(MRSA)、 $\beta$ -内酰胺酶阳性的金黄色葡萄球菌(ESBLsSA)均有一定的抗菌活性[28] [29]。纠敏等[30]发现冬凌草甲素能够抑制金黄色葡萄球菌细胞膜的形成。其细胞膜的形成需要经过四个阶段: 黏附、聚集、成熟和脱落, 然后通过刚果红平板法定性检测法发现冬凌草甲素是通过抑制聚集过程中的细胞间多糖黏附素(PIA)的形成来实现对金黄色葡萄球菌的抑制作用, 进一步研究发现冬凌草可显著降低金黄色葡萄球菌 eDNA 的释放量, 抑制与细胞膜形成相关基因的表达。

再者, 冬凌草甲素的抗氧化作用也不容忽视。徐霞等[31]于 2002 年报道出不同浓度的冬凌草甲素对鼠肝线粒体内由  $\text{Fe}^{2+}$ -Cys 引起 MDA 的含量升高均产生抑制作用, 并呈剂量依赖性。同时冬凌草甲素可抑制  $\text{Fe}^{2+}$ -Cys 诱导的线粒体膜流动性下降, 提示冬凌草甲素有较强的抗氧化作用, 对自由基引起的线粒体损伤有拮抗作用。

冬凌草甲素还是一种  $\beta$  受体阻断剂, 但冬凌草甲素作为  $\beta$  受体阻断剂在临床上应用极少, 相应的这方面的研究也较少。李琦等[32]于 1991 年报道了冬凌草甲素与普萘洛尔一样, 对  $\beta$  肾上腺素受体和腺苷酸环化酶有影响, 是一种较弱的  $\beta$  受体阻断剂。

目前研究发现, 冬凌草甲素在实现治疗作用的同时对生物体有一定程度的影响。Tian 等[33]在斑马鱼模型上对冬凌草甲素的体内过程进行了研究。该研究发现低剂量冬凌草甲素对斑马鱼孵化率等早期的生长发育起促进作用, 高剂量则有抑制, 甚至可能致畸。

### 3.3. 其他活性成分的药理作用

冬凌草在河南民间用于治疗咽喉肿痛、食管癌等已有 50 余年历史, 均以泡茶、煮水的方式服用, 研究发现其水溶性提取物迷迭香酸具有抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡的功效。Ma [34]等利用脊髓损伤的小鼠模型探究迷迭香酸的药理作用机制。实验发现, 迷迭香酸能够抑制小神经胶质细胞的活性, 并且降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  等炎症因子的表达, 随后通过蛋白质组分析发现, 迷迭香酸直接作用于 Nrf2 和 NF- $\kappa$ B 通路。除此之外, 冬凌草中的水杨酸和阿魏酸也具有抗菌消炎作用[28]。

## 4. 冬凌草药材质量评价

### 4.1. 性状与理化鉴别

市面上流通的冬凌草来自不同产区, 质量参差不齐。然其道地产区在河南济源, 该地冬凌草株高 4~7 cm, 叶长 3~5 cm, 宽 1~3 cm, 整体呈三角形, 叶缘牙齿状, 上表面光滑无皱, 下表面呈绿色, 疏被绒毛; 茎呈暗绿色, 无毛。同科其他产地的如河南辉县、鲁山、信阳和湖南株洲、凤凰山等地的冬凌草植株较大, 通常高于 10 cm, 最高可达 40 cm [35]。除此之外, 马鞭草科植物三花菟与冬凌草在形态上也极



其相似, 二者性状上的主要区别有, 冬凌草茎的皮层可轻易剥落, 聚伞状圆锥花序, 顶生, 总花梗、小花梗及花序轴处密被柔毛, 小坚果呈倒卵状三棱形; 而三花菰伞状花序腋生, 蒴果, 成熟后裂成四瓣, 倒卵状舟形。二者理化上的最大区别是冬凌草地上部分的最大紫外吸收为 209 nm 左右, 叶的最大紫外吸收为 217 nm 左右; 而三花菰的最大紫外吸收在 240 nm 左右。冬凌草粉末提取物的最大紫外吸收不仅可以与三花菰进行区别, 还可与其他不同种属的混伪品进行鉴别[36]。由于不同产地和变异类型的冬凌草中二萜类成分差异明显, 可以采用薄层色谱法和高效液相色谱法对不同产地和来源的冬凌草进行鉴别[37][38]。

## 4.2. 分子鉴别

分子鉴别以其微量、快速、准确、专属性强和重现性好的优点在中药材的真伪鉴别上被广泛推广, 该技术经历了一个快速发展时期, 从最初的限制性片段长度多态性(RFLP)技术到现在的 DNA 条形码技术。在生物进化过程中, 承载有遗传信息的核苷酸序列会发生显著变化, 尤其在种与种之间。但对于一个种属内的生物来说, 总是存在部分具有高度同源性的核苷酸序列, 而其中的个别特异性核苷酸序列则为某一种生物所固有。因此, 通过比对这些同源性序列从而定位某种生物的种属类别是当下实现对生物快速、准确鉴定的一项新技术, 即 DNA 条形码技术。上述所说的特异性核苷酸序列可能存在于细胞核中, 即 ITS 序列, 也可能存在于细胞器中, 如 *matK*、*psbA-trnH* 片段等。夏至等[39]对冬凌草、显脉香茶菜、毛叶香茶菜、溪黄草、香茶菜、内折香茶菜和线纹香茶菜等七种香茶菜属植物进行 DNA 条形码分子鉴定。其对鉴定结果构建系统发育树发现, 冬凌草与其他香茶菜属植物能够明显区分开, 并且位于河南不同产地的冬凌草也可被区分开。卢小蕾等[40]利用 RAPD 技术对不同来源的冬凌草进行了分析, 该研究者选取了河南香茶菜属的 5 个种以及野生和驯化的冬凌草植株进行多态性位点分析, 最终筛选出 10 对特异性强的引物, 该 10 对引物能够有效地将 6 个样品区分开。尽管野生和驯化的冬凌草聚为一大类, 但也存在多态性片段差异, 这些微小的差异也能被识别出来。冬凌草资源产区多, 变种多, 市场上作为药用的来源还没有严格加以区分, 而真正上乘的仍属太行山脉一带所产的冬凌草, 因此冬凌草的分子鉴定技术亟待深入研究。

## 4.3. 适宜采收期对药材质量的影响

冬凌草作为碎米槿的一个变种, 于 1977 年被载入中国药典, 是当今市场上流通的药材, 其质量优劣以冬凌草甲素和冬凌草乙素的含量高低为准。陈随清等[41]对冬凌草的化学成分冬凌草甲素和迷迭香酸研究发现, 二者主要存在于冬凌草叶中, 但鉴于采收便利, 可在 6 月份割取地上草质茎部分, 留茬, 待当年 10 月可再收割一次草质茎部分。宋俊骊[42]通过测量冬凌草甲素含量发现, 冀南地区 2、5 月份采摘的冬凌草中冬凌草甲素含量明显低于 8、9 月份采摘的。王丽芳[43]对冀南地区冬凌草的采收时期研究发现, 8、9 月份采收的冬凌草中冬凌草甲素含量分别为 0.385% 和 0.338%。2020 年药典规定干燥品中冬凌草甲素含量不得少于 0.25%。

## 5. 冬凌草的繁育栽培

野生冬凌草为多年生小灌木, 根系发达, 可以生活在各种地形, 适应性强。在水分充足地, 易生长在阳坡, 在贫瘠甚至干旱地区, 则易生长在阴坡。冬凌草在各种土质中均可生长, 但用于农作物栽培时最好选择土壤肥沃, 土层深厚, 向阳, 方便浇灌排水的沙壤土。冬凌草初春 2 月即可发芽, 6 月枝叶繁茂, 此时如遇暴雨季节, 则对山坡具有很好的固土作用, 可防止水土流失, 8 至 10 月为花期, 盛花期在 9 月, 一年可采两茬。娄玉霞[35]等人对来自不同地区的冬凌草进行了生长发育方面的考察。她发现济源

和西峡的冬凌草长势最好, 最佳生长条件是在沙壤土和黑沙土的湿润地区, 温度在 27℃~29℃生长最快, 在霜冻期成活率较低, 因此冬季应做好冬凌草防冻措施。冬凌草作药用时, 应在开花前 7 至 9 月采收地上部分, 作保健品用则不分采收季节。

目前, 冬凌草最大的种植基地当属河南济源, 加工企业 10 余家, 专业合作社有 30 余家。当地正大力推广核桃—冬凌草的套种技术[44], 该技术利用核桃树的株间距和冬凌草略喜阴、矮小、萌蘖力强, 耐干旱、耐贫瘠的特点实现套种模式。套种模式不仅能提高经济效益, 还有利于改善土壤的物理状况、提高土壤蓄水保水能力、提高土壤的渗透速率、减少土壤侵蚀量, 为冬凌草的栽培种植提供了新方向。套种模式下, 主栽树种的最小株距不应低于 3 m × 5 m, 冬凌草株距取 40 cm × 60 cm。目前冬凌草的繁殖育苗主要有以下四种: 种子繁殖、扦插繁殖、分根育苗、截根育苗[45]。种子繁殖要经过选种、浸种, 之后可选择性的采取催芽撒播或种苗移植, 但不管选择哪种方式, 其生长周期都比较长; 相比种子繁殖, 后三种为无性繁殖手段, 大大减少了工作量, 缩短了生长周期, 但只能一年收, 否则随着生长年限的增加, 植株容易出现退化, 易感染病虫害, 导致产量降低。陈丽[46]等人通过实验比较了种苗种植与扦插繁殖的生长周期和存活率。其结果显示扦插繁殖不论是在春夏秋哪个季节都有较高的存活率, 以春秋存活率最高, 而种子催芽撒播存活率仅在 60% 左右。

在冬凌草的驯化栽培过程中, 形成了一套完整的技术, 包括整地、施肥、除草、病虫害防治、采收与加工等一系列操作规程[47], 但冬凌草目前的种植栽培还处于较为传统的模式。对此, 为提高冬凌草的种植栽培模式提出以下建议: 第一, 建立冬凌草种质资源圃。种质即遗传物质, 种质资源是一切能够繁殖的生物类型总称。种质资源是选育新品种的基础材料, 决定各种遗传性状的基因资源, 包括植物的栽培种、野生种、变种的繁殖材料以及利用上述繁殖材料人工创造的各种遗传材料。冬凌草属于香茶菜属, 香茶菜属全球有 150 种, 我国有 90 种, 但只需选择与冬凌草亲缘关系较近的种、碎米桠的所有变种以及不同生境的栽培种和野生种, 不仅有利于保护冬凌草资源, 而且还利于冬凌草的良种繁育。第二, 积极推进冬凌草的杂交育种和诱变育种, 获取高产、优质、多抗、适应性广的新品种。由于只有生长在太行山一脉的冬凌草才具有冬凌草甲素和冬凌草乙素, 因此加快对此种冬凌草种质资源的资源评价和优良品种繁育研究, 做好冬凌草生长栽培的适应性区划研究, 以科学扩大优质冬凌草种质资源的种植面积, 是目前需要突破的方向。此外, 在选择的新品种基础上, 在不同的产区模拟相似的生境, 以保证其次生代谢产物冬凌草甲素和冬凌草乙素的高效合成。

## 6. 冬凌草的分子生药学研究

### 6.1. 遗传多样性

遗传多样性, 也即遗传信息, 它包括所有生物的遗传信息, 一般情况下讲的是种内的遗传变异, 是其遗传特性的集中体现。遗传多样性能够评估该资源当前的进化水平以及今后的开发潜力, 是挖掘优良种质和合理利用与保护资源的关键[48]。染色体核型和基因组大小是遗传多样性研究的基础资料, 2007 年, 赵侯明等人利用 Giemsa 显带技术对湖北恩施巴东山区的冬凌草进行核型分析发现, 冬凌草为二倍体, 其染色体数目为 24 条[49]。而邢冰等于 2019 年利用丙酸-铁矾苏木精染色方法对济源地区的冬凌草进行核型分析得出冬凌草染色体数目为 16 条[50]。不同学者的研究结果有所差异, 有可能源于冬凌草种质的变异类型差别很大, 因为研究表明冬凌草冬凌草资源具有丰富的多样性[51]。

崔璨等[9]采用 ISSR 分子标记方法对来自不同地区的冬凌草进行了多态性位点研究, 其实验最终筛选出 5 条特异性强的引物, 结果发现不同地区冬凌草基因水平的分类具有较强的地带性和区域性, 即地理位置距离较近的太行山和伏牛山的冬凌草聚为一类。陈随清[52]利用 RAPD 和 ISSR 分子标记技术对来

自 23 个地区的冬凌草进行研究, 分别用两种方法筛选出 10 条和 5 条特异性引物对样品进行扩增, 结果发现冬凌草的遗传具有明显的地域性特点。

## 6.2. 二萜类化合物生物合成途径解析

目前, 各种具有明显临床疗效和生物活性的次生代谢产物都处于供不应求的状态。因此研究者们出于既满足市场需求, 又保护环境, 减轻人类对自然索取压力的目的, 致力于对次生代谢产物生物合成途径的研究。冬凌草中富含的冬凌草甲素和冬凌草乙素均具有显著的抗癌活性, 对于冬凌草甲素和冬凌草乙素等二萜类化合物生物合成途径的研究一直都是研究热点。朱昀昊等[53] [54] [55]于 2016 年分别克隆出冬凌草甲素合成途径的三个酶基因, 第一个是乙酰辅酶 A 酰基转移酶(AACT)基因, 该基因全长 1254 bp, 编码 417 个氨基酸, 属于 MVA 途径的酶基因; 第二个是羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶(HMGS)基因, 是 MVA 途径的第一个催化酶基因, 全长 1382 bp, 编码 460 个氨基酸残基; 第三个是 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶(DXS), 属于另一合成途径——MEP 途径, 该基因全长 2169 bp, 编码 722 个氨基酸残基。MVA 和 MEP 两个途径均可合成冬凌草甲素, 均为冬凌草甲素合成的上游途径。同年苏秀红等克隆出 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR) [56]和异戊烯基焦磷酸异构酶(IDI) [57]两个二萜类化合物合成途径基因。陈延清等[58]克隆出冬凌草甲素等二萜化合物下游合成途径一酶基因 IrCYP71。Jin 等通过综合利用转录组、表达谱、蛋白体外功能鉴定、同源建模及定点突变等技术系统克隆鉴定了参与冬凌草甲、乙素等二萜类化合物生物合成的二萜合酶基因并对其进行功能鉴定, 明确了冬凌草中二萜类化合物生物代谢途径下游最初的两步反应, 为下游 CYP450 基因的功能研究及最终阐明冬凌草整个二萜代谢网络打下重要基础[59]。冬凌草四环二萜类化合物的合成途径极为复杂, 合成通路长, 参与合成的各种酶非常多, 而目前已克隆鉴定并验证功能的酶基因数量还不多, 所以要想实现冬凌草甲素等的细胞工厂化合成, 仍需要相当长一段时间的深入研究。

## 7. 结语

冬凌草作为小灌木植物, 可当年种植当年采收, 产量高, 经济价值和生态价值都非常可观。现在冬凌草的市场需求越来越大, 不仅在临床上当抗癌药物使用, 有望成为“紫杉醇第二”, 还在生产加工过程中被制成各种冬凌草产品, 如“中国冬凌神奇茶”、冬凌草片、冬凌草糖浆等来满足不同层次的需要, 不改进栽培技术或者提高产量, 则可能出现供不应求的局面。市场上所售冬凌草多以栽培为主, 野生冬凌草资源已经逐年减少, 亟需对野生冬凌草资源加以保护, 因此十分有必要从可持续发展角度, 对冬凌草资源制定一系列的保护性利用措施, 以平衡对冬凌草种质资源的保护和满足对冬凌草资源利用需求的矛盾。

## 基金项目

湖北中医药大学 2014 年“青苗计划”资助项目(XJ2014KJ006)。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 第一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 119-120.
- [2] 刘净, 梁敬钰, 谢韬. 冬凌草研究进展[J]. 海峡药学, 2004, 16(2): 1-7.
- [3] 刘晨江, 赵志鸿. 冬凌草的研究进展[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(10): 1-5.
- [4] 段延恒, 孔四新. 冬凌草资源调查及开发利用[J]. 中国水土保持, 1990(6): 38-39+23.
- [5] 卢明先. 药用观赏兼用的冬凌草[J]. 农业新技术, 2003(2): 42.
- [6] 孙骏, 郭莉, 庄炜, 唐海英. 我国药用香茶菜属植物化学及药理学研究新进展[J]. 中草药, 2002(8): 99-100.

- [7] 郑新荣, 唐晋琪. 冬凌草的新药源探讨[J]. 河南科学, 1989(3): 114-120.
- [8] 孙汉董, 韩全斌. 冬凌草的植物资源、化学和抗癌活性成分的研究[C]//中国植物学会. 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编(1933-2003). 2003: 2.
- [9] 崔璨. 冬凌草种质资源研究[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 河南中医学院, 2010.
- [10] 冯卫生, 李红伟, 郑晓珂, 王彦志. 冬凌草化学成分研究进展[J]. 中国新药杂志, 2008, 17(23): 2003-2007.
- [11] 郭琳, 程永现, 白明, 苗艳艳, 苗明三. 冬凌草现代研究分析[J]. 中医学报, 2015, 30(3): 412-414.
- [12] 刘净, 谢韬, 魏秀丽, 杨春华, 梁敬钰. 冬凌草化学成分的研究[J]. 中草药, 2007, 38(1): 25-27.
- [13] 张婉晴, 夏小婧. 冬凌草化学成分及药理作用研究进展[J]. 云南化工, 2020, 47(10): 17-19+22.
- [14] 卢海英, 梁敬钰, 陈荣. 冬凌草的化学成分[J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 269-271.
- [15] 卢海英, 王孟芹, 张雪芹, 吴斐华, 梁敬钰. 冬凌草的化学成分研究[J]. 海峡药学, 2013, 25(12): 193-196.
- [16] 吕芳, 徐筱杰. 冬凌草化学成分研究[J]. 中药材, 2008, 31(9): 1340-1343.
- [17] 郑晓珂, 李钦, 冯卫生. 冬凌草中酚酸类化学成分研究[J]. 中国药理学杂志, 2004(5): 22-23.
- [18] Ren, K.K., Wang, H.Z., Xie, L.P., Chen, D.W., Liu, X., Sun, J., Nie, Y.C. and Zhang, R.Q. (2006) The Effects of Oridonin on Cell Growth, Cell Cycle, Cell Migration and Differentiation in Melanoma Cells. *Journal of Ethnopharmacology*, **103**, 176-180. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.020>
- [19] Ji, Z., Tang, Q., Zhang, J., Yang, Y., Liu, Y. and Pan, Y. (2011) Oridonin-Induced Apoptosis in SW620 Human Colorectal Adenocarcinoma Cells. *Oncology Letters*, **2**, 1303-1307. <https://doi.org/10.3892/ol.2011.408>
- [20] Li, F., Fan, J., Wu, Z., Liu, R.Y. and Wang, Z. (2013) Reversal Effects of *Rabdosia rubescens* Extract on Multidrug Resistance of MCF-7/Adr Cells *In Vitro*. *Pharmaceutical Biology*, **51**, 1196. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.784342>
- [21] 张秀萍, 钟诚, 张鹏. 冬凌草甲素减轻自噬对阿霉素诱导心肌细胞凋亡的保护作用[J]. 局解手术学杂志, 2018, 27(10): 702-706.
- [22] 栾剑, 董慧婷, 郭海勇. 冬凌草甲素抗癌活性的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2018, 24(20): 41-44.
- [23] 史国军, 叶兴涛, 屠小龙, 施航, 董晶, 陆宁. 冬凌草甲素对肝癌细胞增殖的抑制作用及其对 E-cadherin、Vimentin 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2019(4): 526-529.
- [24] 鲁遥, 张岚尔, 骆丰, 陈琳, 章浙忠. 冬凌草甲素对乳腺癌 Bcap-37 细胞凋亡影响的研究[J]. 浙江临床医学, 2017(8): 1417-1418.
- [25] 唐晓华, 董文静, 骆丰, 陈琳, 章浙忠. 冬凌草甲素对胃癌 Sgc-7901 细胞炎性细胞因子的影响[J]. 浙江临床医学, 2017(8): 1438-1440.
- [26] Bi, E., Liu, D., Li, Y., Mao, X., Wang, A. and Wang, J. (2018) Oridonin Induces Growth Inhibition and Apoptosis in Human Gastric Carcinoma Cells by Enhancement of p53 Expression and Function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **51**, e7599. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20187599>
- [27] Zhao, G., Zhang, T., Ma, X., Jiang, K., Wu, H., Qiu, C., Guo, M. and Deng, G. (2017) Oridonin Attenuates the Release of Pro-Inflammatory Cytokines in Lipopolysaccharide-Induced RAW264.7 Cells and Acute Lung Injury. *Oncotarget*, **8**, 68153-68164. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19249>
- [28] 李高申, 张伟, 彭涛, 郭梅珍. 冬凌草抗菌活性成分研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014(3): 610-613.
- [29] Yuan, Z., Ouyang, P., Gu, K., Rehman, T., Zhang, T., Yin, Z., Fu, H., Lin, J., He, C., Shu, G., Liang, X., Yuan, Z., Song, X., Li, L., Zou, Y. and Yin, L. (2019) The Antibacterial Mechanism of Oridonin against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Pharmaceutical Biology*, **57**, 710-716. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1674342>
- [30] 纠敏, 闫鹏, 李晶晶, 汪伦记. 冬凌草甲素对金黄色葡萄球菌生物膜的抑制机制[J]. 微生物学通报, 2020, 47(5): 1565-1571.
- [31] 徐霞, 张小莉, 闫素清, 李淑荣, 王瑞, 贾法云, 寇娴, 张雁冰. 冬凌草甲素等二萜类化合物的抗氧化作用[J]. 海峡药学, 2002, 14(6): 28-31.
- [32] 李琦, 陈正. 冬凌草甲素对  $\beta$ -肾上腺素受体及腺苷酸环化酶活性的影响[J]. 白求恩医科大学学报, 1991, 17(2): 152-155.
- [33] Tian, L., Sheng, D., Li, Q., Guo, C. and Zhu, G. (2019) Preliminary Safety Assessment of Oridonin in Zebrafish. *Pharmaceutical Biology*, **57**, 632-640. <https://doi.org/10.1080/13880209.2019.1662457>
- [34] Ma, Z., Lu, Y., Yang, F., Li, S. and Kang, X. (2020) Rosmarinic Acid Exerts a Neuroprotective Effect on Spinal Cord



Injury by Suppressing Oxidative Stress and Inflammation via Modulating the Nrf2/HO-1 and TLR4/NF- $\kappa$ B Pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **397**, Article ID: 115014. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115014>

- [35] 娄玉霞, 董诚明, 乔毅琳. 不同产地冬凌草生态特征比较[J]. 中医学报, 2013(10): 1506-1507.
- [36] 孔增科, 付正良. 冬凌草及其伪品三花疣的鉴别研究[C]//第二届全国中药商品学术大会论文集. 2010: 119-120.
- [37] 陈随清, 崔璨, 裴莉昕, 董诚明, 冯卫生. 不同产地和来源冬凌草药材的质量评价[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 122-126.
- [38] 陈随清, 宋君, 崔璨. 冬凌草二萜类成分的化学指纹图谱研究及评价[J]. 植物科学学报, 2012, 30(5): 92-100.
- [39] 夏至, 张红瑞, 李贺敏, 高致明. 碎米槎及其近缘种的分子鉴定和亲缘关系研究[J]. 中草药, 2013, 44(8): 2904-2909.
- [40] 卢小蕾, 陈随清, 李雪菊, 董诚明, 冯卫生. 河南产香茶菜属 6 种植物的 RAPD 分析[J]. 河南科学, 2006, 24(6): 841-843.
- [41] 陈随清, 王丽, 董三丽, 董诚明. 冬凌草化学成分积累动态的研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2007, 9(3): 67-70.
- [42] 宋俊骊, 余卫兵, 孔增科, 刘轶, 田雅娟. 冀南地区不同采收期冬凌草的质量考察[J]. 河北医药, 2009, 31(23): 3299-3300.
- [43] 王丽芳, 付正良, 孔增科, 贺伟丽, 王文兰, 付彩文. 冀南太行山区野生冬凌草的分布与应用现状[J]. 河北中医, 2014(9): 1376-1377.
- [44] 彭颖, 任军战, 张向锋, 李洁, 王东. 济源市退耕还林地核桃-冬凌草套种技术探讨[J]. 绿色科技, 2018(11): 72-73.
- [45] 贾永贵. 野生冬凌草无公害栽培技术[J]. 现代农业科技, 2009(4): 33-34.
- [46] 陈丽, 牛小沛, 田瑞昌, 王梅. 冬凌草种苗繁殖方法的研究 [J]. 基层农技推广, 2018, 6(11): 36-38.
- [47] 王新民, 李明, 介晓磊, 边传周, 张重义. 冬凌草 GAP 栽培技术标准操作规程[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(6): 142-144.
- [48] 王洪新, 胡志昂. 植物的繁育系统, 遗传结构和遗传多样性保护[J]. 生物多样性, 1996, 4(2): 92-96.
- [49] 赵侯明, 宋发军, 覃瑞. 冬凌草的染色体数目及核型分析[J]. 中南民族大学学报: 自然科学版, 2007(4): 35-37.
- [50] 邢冰, 董诚明, 李曼, 李询. 冬凌草染色体制片方法的初步研究[J]. 黑龙江农业科学, 2019(6): 7-9.
- [51] 苏秀红, 董诚明, 冯卫生, 陈随清, 王龙, 王伟丽, 黄严. 冬凌草叶片形态多样性的研究[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(10): 2351-2353.
- [52] 陈随清, 尹磊, 宋君, 崔璨, 孟灿. 不同产地冬凌草种质资源分子生物学分析[J]. 亚太传统医药, 2016(16): 5-9.
- [53] 朱响昊, 苏秀红, 董诚明, 陈随清, 邵远洋, 张风波. 冬凌草 AACT 基因的克隆与表达分析[J]. 中药材, 2016, 39(1): 43-47.
- [54] 朱响昊, 俎梦航, 苏秀红, 董诚明, 陈随清. 冬凌草 HMGS 基因的克隆与表达分析[J]. 作物杂志, 2016(5): 25-30.
- [55] 朱响昊, 苏秀红, 董诚明, 陈随清, 邵远洋, 张风波. 冬凌草 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶基因克隆与表达分析[J]. 广西植物, 2016, 36(12): 1476-1482.
- [56] 苏秀红, 尹磊, 陈随清. 冬凌草 1-脱氧木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)基因克隆与分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12): 37-41.
- [57] 苏秀红, 尹磊, 陈随清. 冬凌草异戊烯基焦磷酸异构酶基因(IDI)克隆与分析[J]. 北方园艺, 2016, 40(12): 80-85.
- [58] 陈延清, 胡志刚, 黄必胜, 刘迪. 冬凌草 IrCYP71 基因的克隆和功能[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 29-35.
- [59] Jin, B., Cui, G., Guo, J., Tang, J., Duan, L., Lin, H., Shen, Y., Chen, T., Zhang, H. and Huang, L. (2017) Functional Diversification of Kaurene Synthase-Like Genes in *Isodon rubescens*. *Plant Physiology*, **174**, 943-955. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00202>