

广西产拳卷地钱DNA的SCoT-PCR引物筛选及反应体系优化[△]

谢凤凤^{1*},李鹏¹,黎理¹,朱华^{1#},尚小红²,李平凤¹(1.广西中医药大学科学实验中心,南宁 530200;2.广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室,南宁 530007)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)10-1309-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.10.04

摘要 目的:通过筛选引物并优化反应条件,建立以目标起始密码子多态性(SCoT)技术进行标记的广西产拳卷地钱DNA的聚合酶链式反应(PCR)体系。方法:采用改进的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取广西产拳卷地钱药材样品DNA,以凝胶电泳法与紫外分光光度法考察样品DNA的纯度和浓度;以样品DNA为模板,对36条SCoT引物进行PCR扩增反应,并对产物进行电泳、染色、成像以筛选合适引物;以DNA浓度、Mg²⁺浓度、dNTP浓度、引物浓度、Taq DNA聚合酶浓度等5个主要因素进行5因素4水平的正交试验,对SCoT-PCR反应体系条件进行优化。结果:所提取的样品DNA条带整齐,无RNA污染、无降解、无弥散荧光,加样孔清晰;260、280 nm紫外波长处吸光度比值在1.8~2.0范围内,样品DNA纯度和浓度均适合后续试验;36条引物PCR结果显示,4号引物所得产物条带整齐、无弥散荧光且亮度最高,故以其为引物进行PCR反应;最佳SCoT-PCR反应体系为30.00 μg/mL DNA、2.00 mmol/L Mg²⁺、0.20 mmol/L dNTP、0.40 μmol/L引物、0.50 U/mL Taq DNA聚合酶(总反应体积20 μL)。结论:筛选得到合适的样品DNA的SCoT-PCR引物并优化了反应体系,可为广西产拳卷地钱的品种鉴定、遗传多样性评价及亲缘关系分析提供技术基础。

关键词 拳卷地钱;SCoT;PCR;引物筛选;体系优化

SCoT-PCR Primer Selection and Reaction System Optimization of DNA of *Marchantia convoluta* in Guangxi

XIE Fengfeng¹, LI Peng¹, LI Li¹, ZHU Hua¹, SHANG Xiaohong², LI Pingfeng¹(1. Scientific Experiment Center, Guangxi University of TCM, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish PCR reaction system of DNA of *Marchantia convoluta* in Guangxi marked with SCoT polymorphism marker technique by screening primer and optimizing reaction condition. METHODS: Modified CTAB method was used to extract DNA of *M. convolute* from Guangxi; gel electrophoresis and UV spectrophotometry were used to investigate purity and concentration of DNA. Using sample DNA as template, PCR amplification of 36 SCoT primers was conducted, and suitable primers were screened after electrophoresis, staining and imaging of products. The orthogonal experiment of 5 factors and 4 levels was conducted by 5 main factors as DNA concentration, Mg²⁺ concentration, dNTP concentration, primer concentration, Taq DNA polymerase concentration. The condition of SCoT-PCR reaction system was optimized. RESULTS: Extracted sample DNA bands were neat without RNA contamination, degradation or dispersion of fluorescence; sample well was clear. UV absorbance ratio ranged 1.7-2.0 at 260 nm and 280 nm; purity and concentration of DNA were both suitable for follow-up test. PCR results of 36 primers showed that product band of No. 4 primer was neat without diffuse fluorescence but with best luminance, so No. 4 primer was used for PCR reaction. The optimal SCoT-PCR reaction system contained 30.00 μg/mL DNA, 2.00 mmol/L Mg²⁺, 0.20 mmol/L dNTP, 0.40 μmol/L primer, 0.50 U/mL Taq DNA polymerase (total reaction volume of 20 μL). CONCLUSIONS: Suitable SCoT-PCR primer of DNA is screened, and reaction system is optimized. It provides technologic basis for variety identification and genetic relationship analysis of *M. convoluta* in Guangxi.

KEYWORDS *Marchantia convolute*; SCoT; PCR; Primer selection; System optimization

随着现代遗传分子标记技术的发展,其在种质遗传

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260620);广西壮瑶药重点实验室项目(No.桂科基字[2014]32号);壮瑶药协同创新中心项目(No.桂教科研[2013]20号);广西重点学科项目(No.桂教科研[2013]16号);广西“八桂学者”项目(No.桂科政字[2013]25号)

* 实习研究员,硕士。研究方向:中药及民族药的品种品质评价。电话:0771-4733965。E-mail:550773321@qq.com

通信作者:教授,博士。研究方向:中药及壮瑶药的研究及资源开发。电话:0771-4733965。E-mail:Zhuhuagx@163.com

多样性评价与亲缘关系分析、种质资源鉴定、指纹图谱与分子连锁图谱构建、基因表达差异、分子标记辅助育种以及功能基因克隆等方面的应用^[1]逐渐成为热点。分子标记技术有数十种之多,随着研究目的不同,需要选择相适应的标记方法。基因间隔区2-限制性DNA片段长度多态性(IGS2-RFLP)、简单重复序列(ISSR)与目标起始密码子多态性(SCoT)标记是常见的3种分子标记技术。其中,SCoT分子标记作为一种新型的的目的基因

分子标记技术,其引物设计简单、通用性好,其产物可使用琼脂糖凝胶电泳检测,操作更加简便,且条带多态性高、有丰富的遗传信息^[2]。近5年关于SCoT分子标记的文献已逾300篇,主要是将其应用于遗传多样性及亲缘关系分析^[3]、反应体系优化^[4]、指纹图谱分析^[5]等方面的报道,表明SCoT分子标记的手段日趋成熟,可广泛应用于多种植物的种质资源鉴定、遗传信息分析等研究。

广西产拳卷地钱来源于地钱科地钱属植物拳卷地钱(*Marchantia convoluta* Gao et Chang),始载于《西藏苔藓植物志》,是苔藓植物中常用的中草药之一^[6]。其常用于外治烫伤骨折、体癣、疮痍不敛,内治黄疸性肝炎,获得了较好的疗效^[7-8]。广西壮族自治区地处热带及亚热带地区,且地形以山地为主、海拔较高,因此地钱属(*Marchantia* L.)植物品种资源在这一地区分布颇多。资源调查情况和生药学鉴定结果显示,广西境内地钱属植物主要有地钱(*M. polymorpha*)、拳卷地钱(*M. convoluta* Gao et Chang)和粗裂地钱(*M. paleacea*)3种^[9],尤以拳卷地钱的资源最为丰富。目前关于拳卷地钱的分子遗传学研究极少,为了更好地开发利用广西这一特色优势药材资源,确保其基源的准确性,本课题组提取了拳卷地钱的DNA,以其为模板筛选SCoT-聚合酶链式反应(PCR)体系的引物,并优化反应体系条件,为拳卷地钱的品种鉴定及资源开发提供技术基础。

1 材料

1.1 仪器

DYY-6C型核酸电泳仪(北京市六一仪器厂);JS-1075型凝胶成像分析系统(上海培清科技有限公司);ABI-2720型PCR仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];Lambda265型紫外分光光度计(美国珀金埃尔默仪器有限公司);BP211D型电子分析天平(德国赛多利斯公司);H1850R型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司);HH-S4型恒温水浴箱(上海一恒科技有限公司)。

1.2 试剂与引物

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)抽提液(北京雷根生物技术有限公司,批号:NE0012-500mL);kb DNA Ladder(批号:M1400-100T)、GoldView核酸染色剂(批号:G8140)均购自北京索莱宝科技有限公司;EX Taq酶套装(含Taq DNA聚合酶、Buffer、dNTP)及DL Marker 2000、GelRed试剂均购自宝生物工程(大连)有限公司。

引物参照文献[10]中的36条SCoT引物序列(见表1),均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 药材

拳卷地钱幼嫩叶状体于2017年5月22日采自广西来宾金秀镇六拉冲村,经广西中医药大学药用植物教研室韦松基教授鉴定为拳卷地钱(*M. convoluta* Gao et Chang)原植物。将药材洗净后于-20℃保存,备用。

2 方法与结果

表1 36条SCoT引物序列

Tab 1 Sequences of 36 SCoT primers

编号	序列(5'端→3'端)	碱基数	编号	序列(5'端→3'端)	碱基数
1	CAACAATGGCTACCACCA	19	19	ACCATGGCTACCACCGGC	18
2	CAACAATGGCTACCACCC	18	20	ACCATGGCTACCACCGCG	18
3	CAACAATGGCTACCACCG	18	21	ACGACATGGCGACCACACA	18
4	CAACAATGGCTACCACCT	18	22	AACCATGGCTACCACCAC	18
5	CAACAATGGCTACCACGA	18	23	CACCATGGCTACCACCAG	18
6	CAACAATGGCTACCACGC	18	24	CACCATGGCTACCACCAT	19
7	CAACAATGGCTACCACGG	18	25	ACCATGGCTACCACCGGG	18
8	CAACAATGGCTACCACGT	18	26	ACCATGGCTACCACCGTC	18
9	CAACAATGGCTACCAGCA	18	27	ACCATGGCTACCACCGTG	18
10	CAACAATGGCTACCAGCC	18	28	CCATGGCTACCACCGCCA	18
11	AAGCAATGGCTACCACCA	19	29	CCATGGCTACCACCGGCC	18
12	ACGACATGGCGACCAACG	18	30	CCATGGCTACCACCGCGC	18
13	ACGACATGGCGACCATCG	18	31	CCATGGCTACCACCGCCT	19
14	ACGACATGGCGACACGC	19	32	CCATGGCTACCACCGCAC	18
15	ACGACATGGCGACCGCA	19	33	CCATGGCTACCACCGCAG	18
16	ACCATGGCTACCACCGAC	19	34	ACCATGGCTACCACCGCA	18
17	ACCATGGCTACCACCGAG	19	35	CATGGCTACCACCGCCC	18
18	ACCATGGCTACCACCGCC	18	36	GCAACAATGGCTACCACC	18

2.1 拳卷地钱药材样品DNA提取及浓度测定

采用文献[11]中的改良CTAB法提取拳卷地钱药材样品的DNA。采用1.5%琼脂糖凝胶电泳法检测DNA纯度,设定电压为110V,运行时间为30min(以下凝胶电泳试验均设置相同条件),然后经GoldView核酸染色剂染色,在凝胶成像分析系统上成像。采用紫外分光光度法,于260、280nm处分别测定吸光度(A),用吸光度比值(A_{260}/A_{280})表示DNA浓度。

凝胶电泳结果显示,样品DNA条带整齐,无RNA污染,无降解、无弥散荧光,加样孔清晰,表明所提取的样品DNA纯度较高;紫外分光光度法测定结果显示,样品DNA的 A_{260}/A_{280} 值为2.053(在1.8~2.0范围内),表明所提取的样品DNA浓度较高^[11]。将样品DNA稀释至适当浓度,以备后续试验使用。

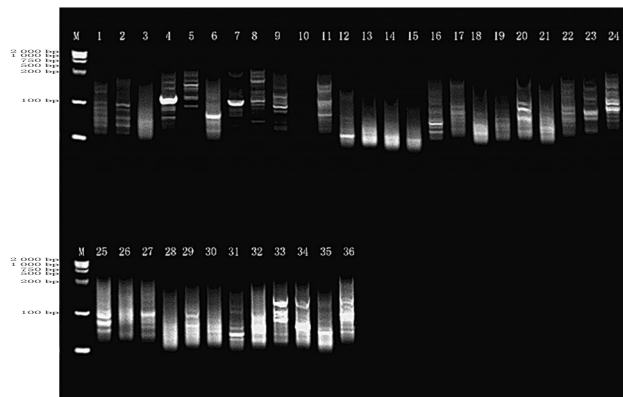
2.2 SCoT引物筛选

以样品DNA为模板,参考文献[12]的条件对36条SCoT引物进行PCR扩增反应,参照“2.1”项下方法对PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳、染色、成像,结果见图1。

由图1可见,编号为4、6、7、12、20、23、24、25、31、33、34、35的12条引物所得产物条带整齐、明亮,无弥散荧光;编号为2、5、8、9的4条引物所得产物的条带清晰、整齐、数量多,无弥散荧光;其余20条引物所得产物条带清晰度欠佳、不成条带,有明显的弥散荧光,表明产物降解明显。本课题组选择产物亮度最高的4号引物进行PCR扩增反应体系的优化试验。

2.3 SCoT-PCR扩增体系优化

2.3.1 正交试验 相关研究发现,DNA浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTP浓度、引物浓度、Taq DNA聚合酶浓度(酶浓度以其活力单位U/mL表示)5个因素对SCoT-PCR反应体系有显著影响^[2],因此本课题组对上述影响扩增反应的5个主要因素(分别以因素A、B、C、D、E表示)进行5因素



注:M.Marker; 1~36.编号1~36的引物所得产物
Note: M.Marker; 1-36.products of No.1-36 primers

图1 36条引物扩增电泳图

Fig 1 Amplification electrophoresis figure of 36 primers
4水平的正交设计,按 $L_{16}(4^5)$ 正交表筛选最佳扩增反应体系。以“2.1”项下获得的样品DNA为模板,采用“2.2”项下筛选的4号引物进行PCR反应,总反应体积为20 μL 。扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸90 s,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸5 min。参照“2.1”项下方法对PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳、染色、成像。采用直观分析法^[13]对成像后的产物扩增条带的清晰度、数目、亮度及背景干净程度进行评分[评分范围为1~16分,成像效果最好者(条带数目多、亮度强、背景清晰、无拖带杂带)得16分,效果最差者得1分,其余按照成像效果依次排序评分,并对评分结果进行统计分析。正交试验因素与水平见表2,正交试验设计和结果见表3,扩增产物的凝胶电泳图见图2。

表2 因素与水平

Tab 2 Factors and levels

水平	因素				
	A, $\mu\text{g/mL}$	B, mmol/L	C, mmol/L	D, $\mu\text{mol/L}$	E, U/mL
1	30.00	1.00	0.15	0.20	0.50
2	40.00	1.20	0.20	0.40	1.00
3	30.00	1.50	0.25	0.60	1.50
4	40.00	2.00	0.30	0.80	2.00

由图2可知,不同因素和水平组合的扩增反应体系所得产物在条带数、清晰度和亮度方面均有差异;由表3可知,1~16号试验的扩增反应产物评分值分别为9、14、7、10、2、6、11、16、3、8、4、15、5、1、12、13。

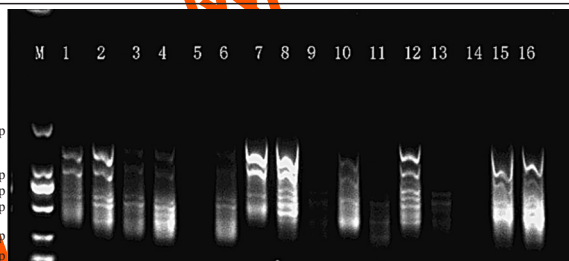
2.3.2 正交试验结果分析 根据表3中的R值可知,各因素对扩增反应影响程度排序为 Mg^{2+} 浓度(B) > Taq DNA聚合酶浓度(E) > dNTP浓度(C) > DNA浓度(A) > 引物浓度(D)。根据表3中评分结果平均值可知,当DNA浓度为30 $\mu\text{g/mL}$ 时,所得产物评分的平均值10.00为最高;当 Mg^{2+} 浓度为2.00 mmol/L 时,所得产物评分的平均值13.50为最高;当dNTP浓度为0.20 mmol/L 时,所得产物评分的平均值10.75为最高;当引物浓度为0.40 $\mu\text{mol/L}$ 时,所得产物评分的平均值9.75为最高;当TaqDNA聚合酶浓度为0.50 U/mL 时,所得产物评分的平均值11.25为最高。综上,最优SCoT-PCR扩增反应体系确定为 $A_1B_4C_2D_2E_1$,即30.00 $\mu\text{g/mL}$ DNA、2.00 mmol/L

Mg^{2+} 、0.20 mmol/L dNTP、0.40 $\mu\text{mol/L}$ 引物、0.50 U/mL Taq DNA聚合酶(总反应体积20 μL)。

表3 正交试验设计与结果

Tab 3 Orthogonal design and result

试验号	因素A, $\mu\text{g/mL}$	因素B, mmol/L	因素C, mmol/L	因素D, $\mu\text{mol/L}$	因素E, U/mL	评分
1	30.00	1.00	0.15	0.20	0.50	9
2	30.00	1.20	0.20	0.40	1.00	14
3	30.00	1.50	0.25	0.60	1.50	7
4	30.00	2.00	0.30	0.80	2.00	10
5	40.00	1.00	0.20	0.60	2.00	2
6	40.00	1.20	0.15	0.80	1.50	6
7	40.00	1.50	0.30	0.20	1.00	11
8	40.00	2.00	0.25	0.40	0.50	16
9	50.00	1.00	0.25	0.80	1.00	3
10	50.00	1.20	0.30	0.60	0.50	8
11	50.00	1.50	0.15	0.40	2.00	4
12	50.00	2.00	0.20	0.20	1.50	15
13	60.00	1.00	0.30	0.40	1.50	5
14	60.00	1.20	0.25	0.20	2.00	1
15	60.00	1.50	0.20	0.80	0.50	12
16	60.00	2.00	0.15	0.60	1.00	13
平均值1	10.00	4.75	8.00	9.00	11.25	
平均值2	8.75	7.25	10.75	9.75	10.25	
平均值3	7.50	8.50	6.75	7.50	8.25	
平均值4	7.75	13.50	8.50	7.75	4.25	
极差(R)	2.50	8.75	4.00	2.25	7.00	



注:M.Marker; 1~6.编号1~16的试验所得产物
Note: M.Marker; 1-6.products of No.1-16 tests

图2 SCoT-PCR扩增产物凝胶电泳图

Fig 2 Electrophoretic diagram of SCoT-PCR amplification products

3 讨论

IGS2-RFLP、ISSR、SCoT这3种分子标记技术均可用于亲缘关系分析、基因表达差异、分子标记辅助育种等方面的研究,但三者的区别主要在于:IGS2-RFLP构建指纹图谱优势更为明显,准确性和可重复性大大优于ISSR,但其多态性检测效率略低于ISSR;而对育种材料进行遗传多样性分析时,SCoT和ISSR所得产物多态性高、信息量大,能均匀地覆盖整个基因组,但SCoT由于本身可能是目的基因的一部分或与目的基因紧密连锁,在育种时筛选可利用性状的效用会高于ISSR^[14]。

关于拳卷地钱的分子标记分析仅见于ISSR-PCR反应体系的研究^[15]。本课题组以SCoT法对拳卷地钱DNA进行标记,并采用正交试验对SCoT-PCR反应体系进行优化,对各影响因素进行综合分析。不同因素同一水平试验结果的平均值反映了影响因素各水平对反应体系的影响程度,平均值越高,表明采用该水平的反应体系效果越好;R值则反映了各影响因素对反应体系的影响

基于系统药理学的茵陈作用机制研究^Δ

陈国铭^{1*}, 汤顺莉¹, 邝梓君², 黄雁¹, 赵金龙³, 於菁雯¹, 陈子茵¹, 林洪荣¹, 黄楚瑶³, 许华^{4#}(1.广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405; 2.广州中医药大学第三临床医学院, 广州 510405; 3.广州中医药大学针灸康复临床医学院, 广州 510405; 4.广州中医药大学第一附属医院儿科, 广州 510405)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)10-1312-08

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.10.05

摘要 目的:探讨茵陈可能的药理作用机制,为其进一步开发利用提供参考。方法:利用中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP)筛选茵陈的有效成分和相关靶标蛋白;运用 Cytoscape 3.5.1 软件构建茵陈有效化合物-靶标蛋白可视化网络,并进行拓扑学分析;借助 STRING 数据库进行蛋白质与蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与分析;通过 DAVID 生物信息学资源数据库对靶标蛋白编码基因进行 KEGG 通路富集分析。结果:共筛选出茵陈有效化合物 13 个,靶标蛋白 189 个,KEGG 富集通路 34 条。槲皮素、 β -谷甾醇、异鼠李素、Artepillin C 等是主要有效化合物,前列腺素 G/H 合成酶 2 (PTGS2)、热休克蛋白 90 (HSP90)、二肽基肽酶 IV、蛋白激酶 A 催化亚基 C α 等是主要靶标蛋白;转录因子 AP-1 (JUN)、细胞肿瘤抗原 p53 在 PPI 网络中发挥了关键作用;靶标蛋白编码基因主要富集在肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 信号通路、缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路、Toll 样受体信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶 (PI3K/Akt) 信号通路、T 细胞受体信号通路、甲状腺激素信号通路、凋亡信号通路等通路上。结论:茵陈中的槲皮素、 β -谷甾醇、异鼠李素等化合物可能通过 TNF- α 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等作用于 PTGS2、HSP90、JUN 等靶标蛋白,进而发挥其抗炎、抗肿瘤等药理作用。

关键词 系统药理学;茵陈;有效化合物;靶标蛋白;信号通路;药理作用

程度, R 值越大,表明该因素影响越明显。本研究结果显示,各因素对 SCoT-PCR 扩增反应的影响程度排序为 Mg^{2+} 浓度 > Taq DNA 聚合酶浓度 > dNTP 浓度 > DNA 浓度 > 引物浓度;其中 Mg^{2+} 浓度和 Taq DNA 聚合酶浓度结果的 R 值分别为 8.75 和 7.00,在 5 个因素中排前 2 位,表明这 2 个因素对试验结果的影响最为显著,故试验过程中应特别注意对这 2 个因素的设置。

综上所述,本研究所优化的 DNA 的 SCoT-PCR 反应体系,可为广西产拳卷地钱品种鉴定、遗传多样性评价及亲缘关系分析提供技术支持,进而为该药材的资源开发利用提供实验基础。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 熊发前,唐荣华,陈忠良,等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638.
- [3] 陈大霞,王钰,张雪,等. 黄连属部分药用植物遗传多样性与亲缘关系的 SCoT 分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3): 473-477.
- [4] 崔健,胡福初,陈哲,等. 榴莲蜜基因组 DNA 提取方法比较及 SCoT 反应体系的优化[J]. 分子植物育种, 2017, 15(4): 1338-1346.

- [5] 张安世,张中海,齐秀娟,等. 猕猴桃 SCoT 遗传多样性分析及指纹图谱的构建[J]. 植物研究, 2017, 37(2): 259-265.
- [6] 中国科学院青藏高原综合科学考察队. 西藏苔藓植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1985: 553.
- [7] 宋华. 广西地钱属药用植物资源调查和形态构造研究[C]//中国中医药学会. 第 7 届全国中药标本馆专业学术讨论会论文集. 成都: 成都中医药大学, 2002: 161.
- [8] Zinsmeister HD, 王洁. 苔藓植物是生物活性物质的一个资源吗?[J]. 国外医药植物药分册, 1994, 9(5): 203-209.
- [9] 国家中医药管理局《中华本草》编写组. 中华本草[M]. 上海: 上海科技出版社, 1998: 324-325.
- [10] COLLARD BCY, MACKILL DJ. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. *Pl Mol Biol Rep*, 2009, 27(1): 86-93.
- [11] 张安世,邢智峰,刘永英. 苔藓植物 DNA 不同提取方法的比较分析[J]. 河南科学, 2009, 27(5): 559-562.
- [12] 尚小红,严华兵,曹升,等. 葛根 SCoT-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 南方农业学报, 2018, 49(1): 1-7.
- [13] 何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析法优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(4): 403-404.
- [14] 赵梦然,陈强,张金霞,等. IGS2-RFLP、SCoT 和 ISSR 在白灵侧耳遗传多样性分析中的比较研究[J]. 菌物学报, 2013, 32(4): 682-689.
- [15] 周雨晴,杜沛霖,王跃峰,等. 拳卷地钱基因组 DNA 提取及 ISSR-PCR 扩增体系优化[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(6): 1498-1500.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81373686)

* 本科生。研究方向:中医儿科学。E-mail: 1252309411@qq.com

通信作者:主任医师,教授,博士生导师,博士。研究方向:中医儿科学。电话:020-36591367。E-mail: xuhua212@126.com

(收稿日期:2017-11-16 修回日期:2018-03-29)

(编辑:段思怡)