

剪接因子 *SRSF7* 新 mRNA 剪接异构体在顺铂处理细胞中的变化^{*}

马春霞, 陈香玲, 李明阳, 杨 渊, 刘淑媛, 史 荔, 俞建昆^{**}

(中国医学科学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118)

[摘 要] 目的: 探讨不同梯度浓度顺铂(CDDP)处理不同肺癌细胞后新发现的剪接因子 *SRSF7* mRNA 异构体在同浓度 CDDP 处理后不同的细胞中的水平变化。方法: 采用梯度浓度的 CDDP 处理肺癌细胞 A549 (8、18、24、32、40、48 及 56 $\mu\text{mol/L}$) 和 H1299 (12、24、36、48、60、72 及 84 $\mu\text{mol/L}$), 处理 24 h 后提取总 RNA, 进行 RT-PCR 检测 *SRSF7* mRNA 剪接异构体, 并选取 NCBI 中未确定的异构体进行 TA 克隆后测序并分析鉴定异构体类型; 用 56 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 处理人胚肾细胞 293FT, 宫颈癌细胞 CaSki、SiHa、C33A 细胞 24 h, 提取总 RNA 后验证新发现的 *SRSF7* mRNA 剪接异构体是否存在这些细胞中。结果: 发现 3 种新的 *SRSF7* mRNA 剪接异构体 (分别标记为 New1、New2 及 New3), 在肺癌细胞 A549、H1299, 人胚肾细胞 293FT, 宫颈癌细胞 CaSki、SiHa、C33A 细胞等多种肿瘤细胞中均存在, 根据 NCBI 的预测 New1、New2、New3 异构体均为非编码蛋白的 mRNA 异构体, 随着处理 CDDP 浓度的增加, 其比例明显上升; 而编码蛋白的 mRNA 异构体 a 和 (或) b 所占比例明显下降; 同时 *SRSF7* 的总 mRNA 水平逐渐降低。结论: 新发现的 3 种非编码的 mRNA 异构体的变化揭示细胞可能通过 *SRSF7* 自身的 mRNA 选择性剪接来应对 DNA 损伤。

[关键词] 顺铂; 富含精氨酸丝氨酸的剪接因子 7; 选择性剪接; 异构体; 细胞凋亡

[中图分类号] R73-36 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)02-0154-06

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.02.005

New mRNA Splicing Isoforms of *SRSF7* and Their Change in Cells Treated with Cisplatin

MA Chunxia, CHEN Xiangling, LI Mingyang, YANG Yuan, LIU Shuyuan, SHI Li, YU Jiankun
(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118, Yunnan, China)

[Abstract] Objective: To explore the changes of mRNA isoforms by gradient dose of cisplatin and analyze the reasons in A549 and H1299. **Methods:** Total RNA of the cells were abstracted 24h after the treatment by cisplatin so as to detect mRNA isoforms of *SRSF7* gene by RT-PCR and analyze the ratio of the newly discovered mRNA isoforms. The undetermined isomers of NCBI were analyzed. **Results:** Three new mRNA splicing isoforms (New1, New2, New3) of *SRSF7* were found, which were ubiquitous in tumor cells and were both non-coding mRNA isoforms. With the increase of the concentration of cisplatin, their proportion significantly increased, but the ratio of mRNA isoforms that could encode protein was significantly declined. Simultaneously, the total mRNA level decreased. **Conclusion:** The newly discovered changes in three non-coding mRNA isoforms (New1, New2, New3) reveals that the cells may respond to DNA damage by alternative splicing of *SRSF7*'s own mRNA.

[Key words] cisplatin; serine/arginine-rich splicing factor 7; selective splicing; isomers; apoptosis

^{*} [基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (2016-12M-2-001); 国家自然科学基金项目 (31570918)

^{**} 通信作者 E-mail: yjk@imbcams.com.cn

网络出版时间: 2018-02-14 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180214.1220.022.html>

基因的选择性剪接和翻译是 2 种重要的调控基因表达的机制。SR 蛋白 (serine/arginine-rich splicing factor) 是一种参与 RNA 剪接的调控因子^[1]。剪接因子 SRSF7 (也称 9G8) 是一个可以往返穿梭于细胞核和细胞质之间的 SR 蛋白家族成员^[2], 有研究报道核质穿梭的 SRSF7 蛋白可通过与介导 mRNA 出核的 NXF1/TAP (Tip associated protein) 蛋白相互作用, 从而调控 mRNA 出核^[3-4]。有穿梭能力的 SRSF7 可能并不局限于细胞核内的剪接功能, 还可能在核糖体蛋白中参与蛋白质翻译的调控^[5]。SRSF7 在肿瘤的发展中也有一定的作用, SRSF7 可作为一个剪接因子, 通过与外显子剪接增强子 (ESE) 或内含子剪接增强子 (ISE) 结合, 调控某些基因的 mRNA 选择性剪接, 使其产生促凋亡或抗凋亡的异构体, 从而调控细胞凋亡^[6-7]; SRSF7 也可通过调控 P21 的表达水平来影响细胞的增殖^[7]。但是关于 SRSF7 本身表达水平调控的研究未见报道。抗癌药物顺铂 (CDDP) 可通过引发 DNA 损伤从而诱导癌细胞凋亡^[8], 已有的研究发现 CDDP 处理细胞后, 为应对 DNA 的损伤, 细胞可改变一些基因的选择性剪接模式, mRNA 选择性剪接在细胞应对 DNA 损伤反应中有重要作用^[9]。本研究用不同浓度的 CDDP 处理肺癌细胞后, 通过对 *SRSF7* mRNA 异构体及其变化进行分析, 发现了 *SRSF7* 新的 mRNA 剪接异构体, 并对新发现的 *SRSF7* mRNA 异构体在 DNA 损伤的作用进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和处理

肺癌细胞 H1299, 人胚肾细胞 293FT, 宫颈癌细胞 CaSki、SiHa 及 C33A 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 肺癌细胞 A549 购自中国科学院昆明动物所细胞中心^[10]。参考课题组前期研究, H1299 细胞使用 1640 培养基 (含 10% FBS), 其余细胞均使用 DMEM 培养基 (含 10% FBS), 培养于 37 ℃, 5% 的 CO₂^[11]。当培养皿表面细胞的覆盖率大约在 75% ~ 90% 时, 将细胞分为对照组和实验组, 根据表 1 加入不同浓度的 CDDP (购自 Sigma Aldrich 公司的 Cisplatin) 处理细胞, 对照组加入与实验组最高 CDDP 浓度等体积的 DM-SO, 其余细胞种类 CDDP 处理浓度均为 56 μmol/L。

表 1 实验组 A549 和 H1299 细胞的 CDDP 浓度情况

Tab. 1 The concentration of cisplatin in A549 and H1299 in experimental group

细胞	CDDP 处理浓度 (μmol/L)						
A549	8	18	24	32	40	48	56
H1299	12	24	36	48	60	72	84

1.2 总 RNA 的提取及 RT-PCR 检测

CDDP 处理所有细胞 24 h 后按 TakaRa 公司 RNAiso PLUS 试剂盒提取细胞的总 RNA, 以 oligo (dT)23 为引物, 采用 Hiscript II 逆转录酶 (Vazyme 公司) 进行逆转录反应, 得到 cDNA 第 1 链^[12]。设计 *SRSF7* 引物 (上游引物序列: ATGCTTATGATT-GTCATCGTTACAGC, 下游引物序列: GGAGATGCT-GACCTTGACCTTC) 通过 RT-PCR 扩增检测。PCR 反应条件为 94 ℃ 变性 30 s; 59 ℃ 退火 30 s; 72 ℃ 延伸 55 s。

1.3 数据分析

PCR 产物用浓度为 2% 的琼脂糖凝胶在 TAE buffer 电泳液中检测并进行数据分析^[13], 所示结果均为 3 次试验结果的统计分析值。

1.4 异构体的 TA 克隆、筛选和测序

从琼脂糖凝胶中切下含目的片段的凝胶, 使用上海 Generay 公司薄型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收, 然后用 TAKARA 公司 T-vector pMD19 (simple) 连接试剂盒进行载体连接, 并用 DH5α 感受态细胞进行转化, 再用蓝白斑 LB 培养基筛选出阳性克隆, 扩大培养后用 Generay 公司小提质粒试剂盒提取质粒, 进行 DNA 测序测定并分析, 鉴定出各目的条带对应的异构体。

2 结果

2.1 发现 3 种新的 *SRSF7* mRNA 剪接异构体

在 A549 细胞中检测 *SRSF7* mRNA 剪接异构体时发现多种条带, 其中 * 条带经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染验证为杂合带 (在变性胶中 * 条带消失)。对大小为 136、243、585 及 829 bp 的条带进行 TA 克隆后测序并与原 *SRSF7* 基因 cDNA 序列比对分析, 发现 243、585 及 829 bp 条带是 3 种 NCBI 未确定存在的 *SRSF7* 基因 mRNA 异构体, 分别命名为: New1、New2 及 New3 (图 1A)。对异构体 New1、New2 及 New3 进行分析发现, 异构体

New1 是在 *SRSF7* 基因第 3、4 外显子间插入了一个大小为 107 bp 的序列,所以设计在第 3、4 外显子间的引物 F: R 检测到 243 bp 大小的条带(图 1B);异构体 New2 是在 *SRSF7* 基因第 3、4 外显子间插入了一个大小为 449 bp 的序列,所以用引物 F:R 可检测到 585 bp 大小的条带(图 1B);异构体 New3 是在 *SRSF7* 基因第 3、4 外显子间插入了一个大小为 693 bp 序列,所以用引物 F: R 检测到 829

bp 大小的条带(图 1B)。mRNA 翻译时可能由于这些插入序列使读码框发生变化,提前产生终止密码子,因此含该序列的异构体不能编码蛋白。本研究用 56 $\mu\text{mol/L}$ 的 CDDP 处理人胚肾细胞系,宫颈癌细胞系等多种细胞后提取总 RNA 并进行同样的检测,结果发现在多种细胞系中存在 New1、New2 及 New3 异构体,但在相同浓度顺铂处理下这些异构体在各细胞中表达量有差异(图 1C)。

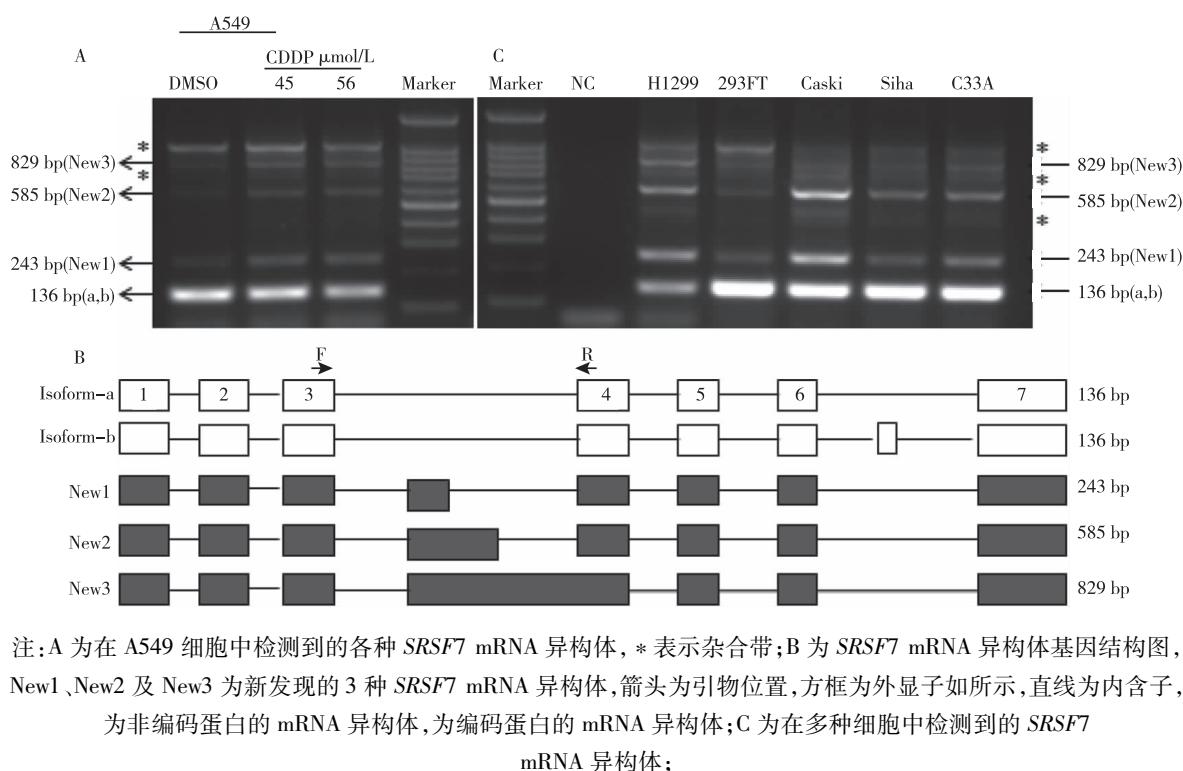


图 1 检测到的 *SRSF7* mRNA 异构体

Fig. 1 The detected new alternative splicing isoform of *SRSF7*

2.2 浓度梯度 CDDP 处理肺癌细胞后新发现的 New1、New2 及 New3 异构体的变化

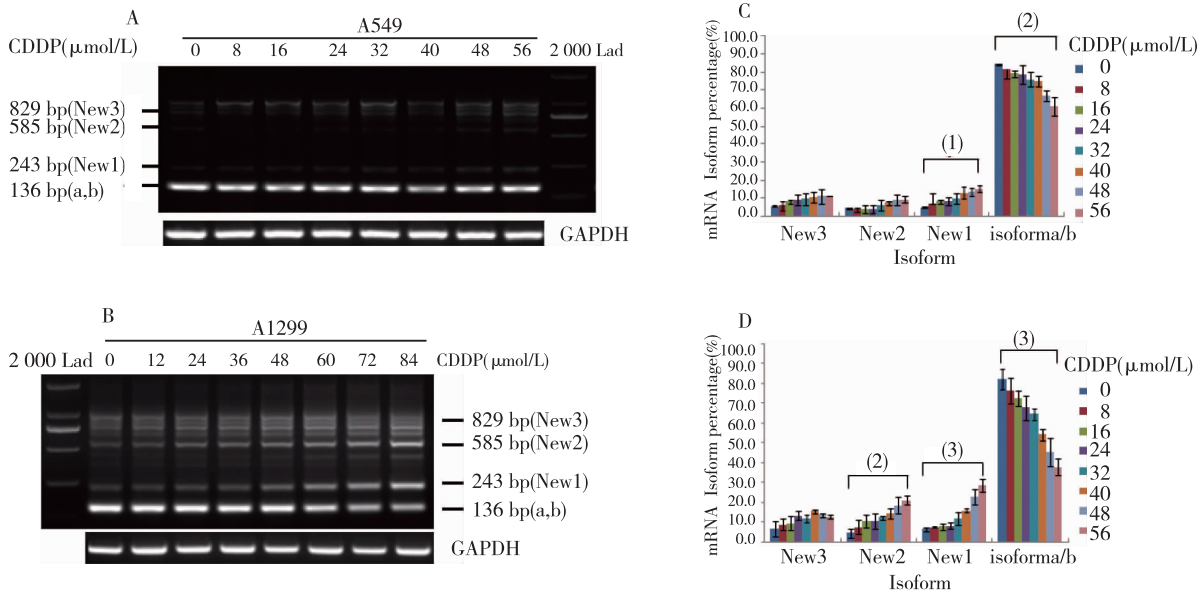
随着 CDDP 处理浓度的增加,136 bp 的 isoform a 和 (或) b 所占比例逐渐减少,而新的异构体 New1、New2 及 New3 所占比例逐渐增多,且 H1299 细胞的变化较 A549 细胞更加明显(图 2)。New2 条带在 A549 细胞中较弱(图 2A), New3 条带在 H1299 细胞中较弱(图 2B),说明 New2 在 A549 细胞中所占比例较少,New3 在 H1299 细胞中所占比例较少,推测 New2 和 New3 异构体在上述细胞不占主导地位。

2.3 新异构体 New1、New2 及 New3 变化的规律及作用

由 *SRSF7* 基因结构图(2.1 项下)可知目标条

带 136 bp 条带可由 Isoform-a 和/或 b 产生,它们均为编码蛋白的 mRNA 异构体;243、585 及 829 bp 条带分别由 New1、New2 及 New3 产生,均为非编码蛋白的 mRNA 异构体。为了进一步分析 *SRSF7* 基因编码及非编码 mRNA 异构体剪接变化趋势及造成这种趋势的主要 mRNA 异构体,并探究 *SRSF7* 总的 mRNA 表达水平的变化,课题组对数据进行分析发现,编码蛋白的 mRNA 异构体随 CDDP 处理浓度逐渐减少,而非编码蛋白的 mRNA 异构体逐渐增多(图 3A、B),并根据图 2A、B 条带亮度及图 2C、D 数值分析可知,造成编码蛋白的 mRNA 异构体减少主要是因为 Isoform-a 或和 b,而非编码蛋白的 mRNA 异构体升高的主要原因是 New1 或 New2。这些 mRNA 异构体变化可能是为

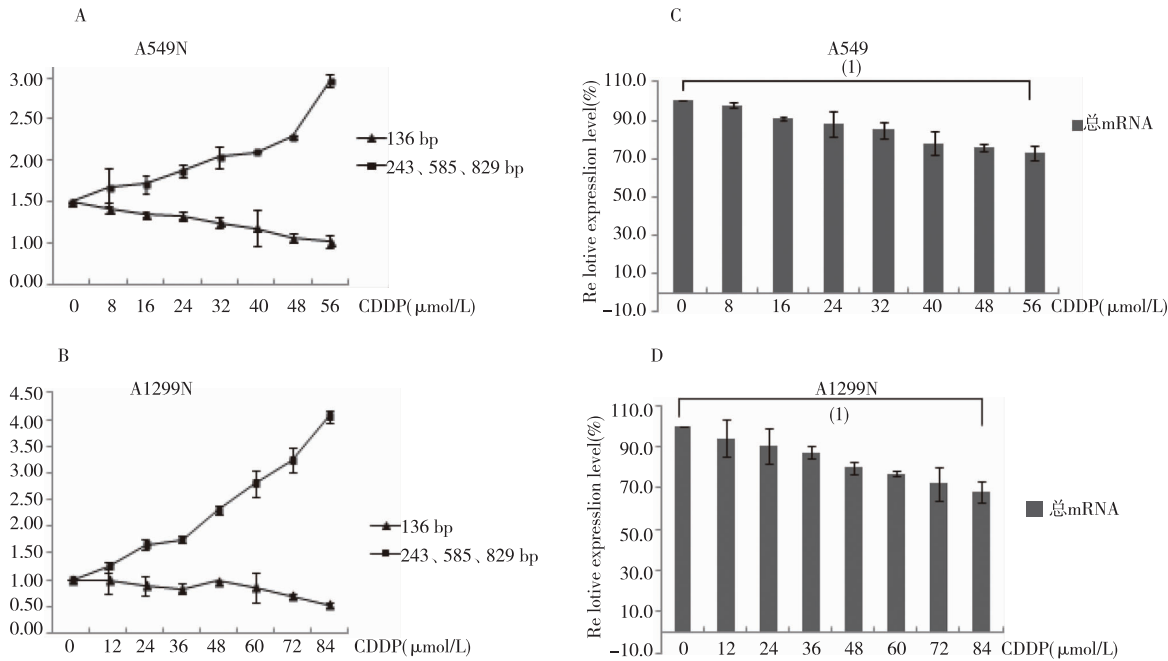
了调控 CDDP 处理下 *SRSF7* 的表达水平。研究还发现,在 A549 及 H1299 细胞中各异构体变化趋势一致,且 *SRSF7* 的总 mRNA 水平均出现下降(图 3C、D)。



注:A、B 为梯度浓度 CDDP 处理后 A549 和 H1299 细胞中检测到的 *SRSF7* mRNA 异构体,C、D 为 2 种细胞中各异构体所占比例的变化,⁽¹⁾ 为 $P < 0.05$, ⁽²⁾ 为 $P < 0.01$, ⁽³⁾ 为 $P < 0.001$ 。

图 2 不同浓度 CDDP 处理后 A549 和 H1299 细胞中 *SRSF7* mRNA 异构体所占比例变化

Fig. 2 Changes of constitution ratio of *SRSF7* each isoform in A549 and H1299 after cisplatin treatment



注:A、B 为不同浓度 CDDP 处理后 A549 和 H1299 细胞中 *SRSF7* 编码及非编码 mRNA 异构体的变化,C、D 为 A549 和 H1299 细胞中 *SRSF7* 总 mRNA 水平, ⁽¹⁾ 为 $P < 0.01$

图 3 不同浓度 CDDP 处理后 A549 和 H1299 细胞中 *SRSF7* mRNA 异构体总 mRNA 变化

Fig. 3 Changes of constitution ratio, relative mRNA level of coding/non-coding isoform and total mRNA level after cisplatin treatment

3 讨论

Pre-mRNA 选择性剪接是基因转录后表达调控的一个重要机制,通过选择性剪接可产生不同的 mRNA 异构体从而翻译出不同的蛋白质^[14]。剪接因子 SRSFs 可通过结合在 pre-mRNA 上的抑制子或增强子上,或是竞争 RNA 结合位点影响选择性剪接^[6],SRSF7 作为一种在肿瘤中高表达的原癌基因其剪接变化的机制尚未有明确的文献报道,但它可通过调控其他肿瘤相关因子的剪接模式导致肿瘤的发生,有相关证据证明 SRSF7 会通过调控 SMN 基因的表达从而导致肌肉萎缩症的发生^[15],所以研究 SRSF7 的剪接变化很有价值和意义。

本研究将检测到的条带经 TA 克隆后测序分析确认了 3 种新的 SRSF7 mRNA 异构体,与已报道的异构体 Isoform-a/b 相比,新的异构体是因为 SRSF7 基因第 3 外显子和第 4 外显子间插入了一段序列造成的,在 CDDP 作用下该序列位点发生选择性剪接从而产生不同的异构体,这很可能是靠 SRSF7 的自身调控来实现的,即在肿瘤细胞中高表达的 SRSF7 蛋白在 CDDP 处理下通过结合自身转录物的剪接调控元件,改变 SRSF7 基因的选择性剪接模式产生不同异构体,且这些异构体的表达水平是会发生动态变化的,这说明细胞可能利用 SRSF7 的 mRNA 选择性剪接机制来调节其蛋白功能,以应对细胞 DNA 损伤。

有研究报道 SRSF7 可以通过细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂家族中的重要成员 P21 的表达水平来影响细胞的增殖^[16]。microRNA 是短的非编码 RNA,它可通过结合在一些基因的 3'UTR 诱导 mRNA 降解或抑制翻译来下调受控基因的表达^[17]。有相关文献报道 miR-30a-5p 及 miR-181a-5p 可下调 SRSF7 的表达^[18],但同时 SRSF7 也可调控 microRNA 的表达,在肾癌细胞中 SRSF7 与 microRNA 形成反馈回路调控肾肿瘤相关因子 SPP1 的选择性剪接从而影响肾肿瘤细胞的增殖^[18-19]。综上所述,我们知道 SRSF7 在肿瘤中高表达且它参与细胞的增殖,调控其表达的机制可能是 microRNA 调控,选择性剪接等方式。在中国人群中 SRSF7 的表达水平与肺癌风险是相关的^[20],本研究检测到在肺癌细胞系 A549 和 H1299 中,随着处理 CDDP 浓度的增加,SRSF7 的总 mRNA 水平是逐渐降低的,如果其蛋白水平也是下调的,那么这可能是 CDDP 作为化疗药物治疗肿瘤诱导的结果之

一,即 CDDP 处理肿瘤细胞后导致 SRSF7 的 mRNA 选择性剪接模式变化,从而在肿瘤中高表达的 SRSF7 水平下调,可能诱导肿瘤细胞凋亡因此达到治疗肿瘤的目的。该文阐述了化疗药顺铂作用于肿瘤是一种潜在的机制,剪接因子的异常表达可能与肿瘤基因的异常表达相关,那么研究剪接因子的表达对肿瘤早期的诊断,预后及治疗有很大帮助。

综上,经不同浓度梯度 CDDP 处理后,在 A549 和 H1299 细胞中检测到了 4 种 mRNA 异构体(a 或/和 b、New1、New2、New3),其中,New1、New2 及 New3 为 NCBI 未确定的新发现的 SRSF7 mRNA 异构体。在不同浓度梯度 CDDP 处理下,SRSF7 基因 pre-mRNA 选择性剪接发生了变化,随着处理 CDDP 浓度的升高,非编码的 New1、New2 及 New3 异构体比例明显上升,而编码蛋白的 mRNA 异构体所占比例明显下降,同时 SRSF7 的总 mRNA 水平也逐渐降低。

4 参考文献

- [1] KIM E, GOREN A, AST G. Insights into the connection between cancer and alternative splicing[J]. Trends Genet, 2008,24:7-10.
- [2] BAR A, MARCHAND V, KHOURY G, et al. Structural and functional analysis of the Rous Sarcoma virus negative regulator of splicing and demonstration of its activation by the 9G8 SR protein[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(8):3388-3403.
- [3] MÜLLERMCNICOLL M, BOTTI V, AM D J D, et al. SR proteins are NXF1 adaptors that link alternative RNA processing to mRNA export. [J]. Genes Dev, 2016,30(5):553-566.
- [4] SWARTZ J E, BOR Y C, MISAWA Y, et al. The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element [J]. Journal of Biological Chemistry, 2007,282(27):19844-19857.
- [5] SANFORD J R, ELLIS J D, CAZALLA D, et al. Reversible phosphorylation differentially affects nuclear and cytoplasmic functions of splicing factor 2/alternative splicing factor. [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005,102(42):15042.
- [6] LIU J, HUANG B, XIAO Y, et al. Aberrant expression of splicing factors in newly diagnosed acute myeloid leukemia. [J]. Onkologie, 2012,35(6):117-132.
- [7] SAIJO S, KUWANO Y, MASUDA K, et al. Serine/arginine-rich splicing factor 7 regulates p21-dependent growth arrest in colon cancer cells. [J]. J Med Invest, 2016,63

- (3-4):219-234.
- [8] BIAMONTI G, CACERES J F. Cellular stress and RNA splicing[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2009, (3):146.
- [9] LENZKEN S C, LOFFREDA A, BARABINO S M. RNA splicing: a new player in the DNA damage response[J]. International Journal of Cell Biology, 2013, 2013(9): 153634-153656.
- [10] 杨梦莉, 陈香岭, 马春霞, 等. 顺铂处理癌细胞后 CDC25mRNA 剪接异构体的变化[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(2):159-164.
- [11] 马春霞, 杨梦莉, 李明阳, 等. 顺铂处理下肺癌细胞剪接因子 SRSF1 mRNA 异构体的变化[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(8):879-884.
- [12] 马春霞, 杨梦莉, 李明阳, 等. 顺铂处理下肺癌细胞剪接因子 SRSF2 mRNA 异构体的变化[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(9):443-449.
- [13] 杨勤兴, 马春霞, 陆成龙, 等. 梯度浓度顺铂处理对 6 种肿瘤细胞中 CASP9 的 mRNA 选择性剪接的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2017, 42(9):1003-1009.
- [14] DE MIGUEL F J, SHARMA R D, PAJARES M J, et al. Identification of alternative splicing events regulated by the oncogenic factor SRSF1 in lung cancer[J]. Cancer Research, 2014, 74(4):1105.
- [15] WEE C D, HAVENS M A, JODELKA F M, et al. Targeting SR proteins improves SMN expression in spinal muscular atrophy cells[J]. Plos One, 2014, 9(12): e115205.
- [16] SAIJO S, KUWANO Y, MASUDA K, et al. Serine/arginine-rich splicing factor 7 regulates p21-dependent growth arrest in colon cancer cells. [J]. Journal of Medical Investigation Jmi, 2016, 63(3-4):219.
- [17] MATTIOLI C, PIANIGIANI G, PAGANI F. Cross talk between spliceosome and microprocessor defines the fate of pre-mRNA [J]. Wiley Interdisciplinary Reviews Rna, 2014, 5(5):647.
- [18] LEE Y, RIO D C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. [J]. Annual Review of Biochemistry, 2015, 84(84):291-308.
- [19] BOGUSLAWSKA J, SOKOL E, RYBICKA B, et al. microRNAs target SRSF7 splicing factor to modulate the expression of osteopontin splice variants in renal cancer cells[J]. Gene, 2016, 595(2):142-149.
- [20] SHEN W, YIN R, WANG C, et al. Polymorphisms in alternative splicing associated genes are associated with lung cancer risk in a Chinese population [J]. Lung Cancer, 2015, 89(3):238-317.

(2017-12-10 收稿, 2018-02-01 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 丁廷森

(上接第 153 页)

- [2] 黄红泓, 甄汉深. 中草药辣蓼近年来的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(01):38-40.
- [3] 刘亮, 潘年松, 刘英波, 等. 蓼子草的研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(01):27-28.
- [4] 林聪明, 王道平, 崔范洙, 等. 贵州产辣蓼挥发性成分分析[J]. 广西植物, 2012, 32(3):410-414.
- [5] 刘信平, 张驰, 谭志伟, 等. 辣蓼挥发性活性成分的 GC/MS 研究[J]. 中国现代应用药学, 2009, 26(04):285-288.
- [6] 李强. 辣蓼挥发油的提取、化学成分分析及杀虫活性测定[D]. 华南热带农业大学, 2007.
- [7] 吴莉宇, 李强, 苍涛. 辣蓼挥发油的提取及其 GC/MS 分析[J]. 广东农业科学, 2007, (09):72-73+81.
- [8] 张国英. 辣蓼主要成分的提取、分离与鉴定[D]. 南京: 南京林业大学, 2004.
- [9] 姚祖凤, 周亮成, 刘家欣. 湘西辣蓼挥发油化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发, 1999, 11(02):37-40.
- [10] 华燕. 四种药用植物的化学成分[D]. 昆明: 中国科学院昆明植物研究所, 2004.
- [11] AYAZ M, JUNAID M, ULLAH F, et al. Comparative chemical profiling, cholinesterase inhibitions and anti-radicals properties of essential oils from Polygonum hydropiper L: A Preliminary anti-Alzheimer's study[J]. Lipids in Health & Disease, 2015, 14(1):141.
- [12] AYAZ M, JUNAID M, ULLAH F, et al. GC-MS Analysis and gastroprotective evaluations of crude extracts, isolated saponins, and essential oil from polygonum hydropiper L[J]. Frontiers in Chemistry, 2017, (5):58.
- [13] AYAZ M, JUNAID M, ULLAH F, et al. Chemical profiling, antimicrobial and insecticidal evaluations of polygonum hydropiper L: [J]. BMC Complementary & Alternative Medicine, 2016, 16(1):502.
- [14] 蔡玲, 李爱阳. 水蓼挥发油的提取及 GC-MS 分析[J]. 中成药, 2009, 31(06):918-921.
- [15] 罗国安, 王义明. 中药指纹图谱的分类与发展. [J]. 中国新药杂志. 2002, 11(1):46-51.
- [16] 刘慧琼, 郭同好. 现代仪器与中草药指纹图谱. [J] 中国医药学报. 2002, 30(2):35-38.
- [17] 冯华, 刘英波, 刘亮, 等. 辣蓼不同部位槲皮素的含量测定及 HPLC 指纹图谱[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(4):411-414+423.
- [18] 冯华, 刘英波, 刘亮, 等. 黔产辣蓼及其混淆品高效液相指纹图谱研究[J]. 中草药, 2015, 46(19):2943-2945.
- [19] 谢占芳. 八种菊花挥发性成分及其抑菌活性研究[D]. 开封: 河南大学, 2016.

(2017-11-15 收稿, 2018-01-12 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 丁廷森