

· 论著 ·

多重引物 HRMA 对成骨不全患者 COL1A1/2 基因突变的筛查与分析

杨立¹ 张天可¹ 周怀蔚¹ 鞠明艳¹ 白雪² 李克秋¹ 任秀智³ 李光^{1*}

1.天津医科大学基础医学院,天津 300070

2.天津市天津医院检验科,天津 300211

3.天津市武清区人民医院骨科三病区,天津 301700

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 08-1103-07

摘要: **目的** 建立多重引物高分辨熔解曲线分析(high resolution melting analysis, HRMA)方法并运用该方法筛查两例成骨不全(osteogenesis imperfecta, OI) COL1A1/2 的突变基因。**方法** 收集两例 OI 患者临床资料,采集患者及 50 例正常对照的血液标本。设计 COL1A1、COL1A2 基因 103 个外显子所对应的引物,将满足一定条件的两对引物相互配对,与单份样本 DNA 混合作为扩增体系。运用 HRMA 筛查产物突变情况,基因测序确定突变位点。**结果** 本研究中共涉及到 COL1A1 和 COL1A2 的 103 个外显子,其中成功配对 39 对,未配对成功的有 3 个 COL1A1 外显子和 22 个 COL1A2 外显子,成功率为 75.73%。先证者 1 筛查结果 HRMA 熔解曲线在 COL1A1 41 号外显子上存在异常,测序结果为 c.2877delT 杂合突变,即 cDNA 2877 位碱基 T 缺失,编码的缬氨酸变成色氨酸。先证者 2 筛查结果 HRMA 熔解曲线在 COL1A1 16 号外显子上存在异常,测序结果为 c.1028delC 杂合突变,即 cDNA 1028 位碱基 C 缺失,编码的脯氨酸变成亮氨酸。两种突变类型在中国人群中均未见报道,为新发现的两种剪切突变,且与传统 HRMA 筛查结果一致。**结论** 多重引物 HRMA 方法在传统 HRMA 基础上进行了创新,将两对引物与单份样本 DNA 混合作为扩增体系,HRMA 筛查产物突变情况,且与传统 HRMA 筛查结果一致,具有一定创新性和可行性,为成骨不全患者基因突变及其他遗传病致病基因的筛查提供了新的思路。

关键词: 成骨不全; 高分辨熔解曲线分析; 多重引物高分辨熔解曲线分析; 点突变; 突变筛查

Identification of mutations in COL1A1/2 in patients with osteogenesis imperfect using multiple primer high resolution melting analysis

YANG Li¹, ZHANG Tianke¹, ZHOU Huaiyu¹, JU Mingyan¹, BAI Xue², LI Keqiu¹, REN Xiuzhi³, LI Guang^{1*}

1. Basic Medical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300070

2. Department of Medical Diagnoses, Tianjin Hospital, Tianjin 300211

3. Department of Orthopedic Surgery, Wuqing District People's Hospital, Tianjin 301700, China

* Corresponding author: LI Guang, Email: 13821782642@163.com

Abstract: Objective To establish a multiple primer high resolution melting analysis (Multi-HRMA) and identify gene mutation in patients with osteogenesis imperfecta (OI). **Methods** The clinical data of two patients was collected. Blood samples from two patients, as well as 50 normal controls, were also collected. Design primers of 103 exons in COL1A1 and COL1A2 individually and mix two of them up in some conditions with one piece of DNA sample. Then the mutation was screened using HRMA and validated by the gene sequence. **Results** We succeeded in matching 39 pairs of primers accounting for 75.73% in all 103 exons, including 48 exons in COL1A1 and 30 exons in COL1A2. And there were 3 COL1A1 exons and 22 COL1A2 exons unpaired. The detection of Multi-HRMA showed the abnormal result of COL1A1 41 exon in proband from family one. The sequencing result was c.2877delT, which meant that cDNA of 2877 base T disappeared. The mutation transformed the amino acid valine into tryptophan. The detection of Multi-HRMA showed the abnormal result of COL1A1 16 exon in proband from family two. The sequencing result was c.1028delC,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21177091);天津市科学与技术资助项目(12ZCZDSY03400);天津市大学生创新创业训练项目(201510062006)

* 通信作者: 李光, Email: 13821782642@163.com

which meant that cDNA of 1028 base C disappeared. The mutation transformed the amino acid proline into leucine. Both mutations were novel mutations, the same as the traditional HRMA. **Conclusion** Multiple primer high resolution melting analysis identifying gene mutation has higher innovation and feasibility than traditional PCR. Not only does it decrease the workload, but it is cheaper and improves efficiency. It is really a new thought for the gene mutation screening in patients with OI and other genetic disorders.

Key words: osteogenesis imperfecta; high resolution melting analysis; multi-HRMA; point mutation; mutation screening

成骨不全 (osteogenesis imperfecta, OI) 也称为脆性骨病, 是一种常染色体显性遗传病, 主要由于 COL1A1 或 COL1A2 两个基因发生突变所致, 分别编码了 I 型胶原的 pro- α 1 和 pro- α 2 两条肽链, 一旦发生基因突变, 将导致 I 型胶原合成不足及其三螺旋胶原结构发生异常^[1-2]。成骨不全在儿童中发病率接近于 1/10 000, 临床表现多种多样, 很难确定基因型和表现型之间的关系^[3-4]。90% 患病家系的基因突变类型为点突变 (包括无义突变、错义突变等), 并且随机发生于 COL1A1 的 51 个外显子和 COL1A2 的 52 个外显子上, 每个外显子之间的突变类型又有所不同, 使得突变区域结构相当庞大复杂; 此外, COL1A1 和 COL1A2 基因片段较长, 外显子众多, 没有突变热点, 尤其是 COL1A2 较易形成发卡结构, 这些都为突变筛查增加了难度^[5-6]。当前对于成骨不全基因突变筛查, 传统 PCR 操作简便、结果可靠; 传统高分辨溶解曲线分析 (high resolution melting analysis, HRMA) 灵敏度高、特异性强、简单快速、高效经济, 检测不受碱基位点的局限, 可同时对等位基因的变化进行识别; qPCR-HRMA 同时具备两者的特点。上述筛查方法均只针对单对引物, 对于拥有众多外显子的 COL1A1 和 COL1A2, 筛查起来工作量较大, 耗时、耗材、耗费用。

本研究在传统 HRMA 的基础上, 建立了多重引物 HRMA 的方法, 将满足一定条件的两对引物进行配对, 并与单个样本 DNA 混合作为扩增体系, 可同时对 COL1A1 或 COL1A2 的两个外显子进行突变筛查。并用该方法成功筛查了两例 OI 患者在 COL1A1、COL1A2 上的突变。多重引物 HRMA 不仅可以用于 OI 患者基因突变的筛查, 也为其他遗传病致病基因的筛查提供了新思路。这类遗传病往往都是常染色体显性遗传病, 致病基因上具有较多的外

显子, 而且没有突变热点。

1 资料与方法

1.1 一般资料

两例 OI 患者和 50 例正常对照样本均来源于天津市天津医院, 50 例正常对照样本与鞠明艳等^[7]的研究一致, 包括 28 名男性, 22 名女性, 平均年龄 9 岁, 均为汉族人群, 个体间无血缘关系。收集 OI 患者的相关临床资料, 包括家族史、骨骼畸形情况、巩膜颜色和 X 线表现等等。实验项目在 OI 患者或其家属签订知情同意书下进行, 并且得到了天津市天津医院伦理委员会批准。

先证者 1: 男, 9 岁, 患者身高 120 cm, 蓝色巩膜, 牙质发育不全, 牙齿稀疏, 共发生 15 次骨折, 初次骨折为出生时, 四肢向外弯曲畸形。X 线检查显示: 左胫腓骨骨密度降低, 骨干变细, 骨皮质变薄, 骨干向内侧弯曲变形; 左股骨下端断裂, 髓内钉固定, 临床诊断为 IV 型 OI。先证者父亲, 身高 165 cm, 在 2 岁时曾发生骨折, 浅蓝色巩膜。先证者哥哥, 身高 145 cm, 初次骨折发生于出生时, 蓝色巩膜, 龋齿。先证者母亲无相关症状。

先证者 2: 女, 11 岁, 患者身高 150 cm, 浅蓝色巩膜, 牙质发育不全, 牙齿稀疏, 鸡胸, 共发生 20 次骨折, 初次骨折为出生后 35 d, 四肢向外弯曲畸形。X 线片显示: 左胫腓骨骨密度减低, 骨皮质变薄, 骨小梁稀疏, 胫腓骨骨干弯曲变形; 左右股骨骨密度降低, 向外侧弯曲变形, 骨干变细, 骨皮质变薄; 右股骨骨干、左右胫骨髓内钉固定, 骨干变细, 骨密度减低, 临床诊断为 IV 型 OI。先证者母亲, 身高 153 cm, 在 3 岁时曾骨折两次, 均为小腿骨折, 浅蓝色巩膜。先证者父亲无相关症状。两个先证者的 X 线片、家系调查及临床表现分别见图 1~图 3、表 1。

表 1 两例患者的临床表现

Table 1 Clinical presents of the two proband

患者编号	年龄/岁	性别	身高/cm	骨折次数	蓝色巩膜	牙质发育不全	脊柱畸形	胸部畸形	四肢畸形	OI 类型
先证者 1	9	男	120	15	+	+	-	-	+	IV
先证者 2	11	女	150	20	+	+	-	+	+	IV

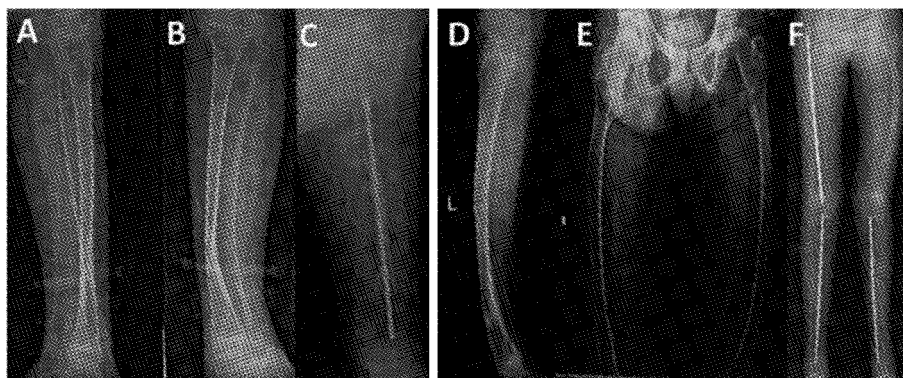


图 1 先证者 X 线片

注:A、B、C X 线片取自于先证者 1;D、E、F X 线片取自于先证者 2。

Fig.1 X-rays of the probands

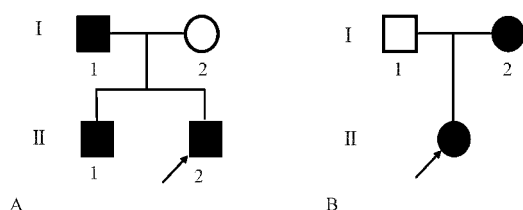


图 2 家系图

注:家系 1(A)的 II-2 是先证者 1;家系 2(B)的子代是先证者 2;
□○:分别为正常男性、正常女性;■●:分别为患病男性、患病女性。

Fig.2 Pedigree chart

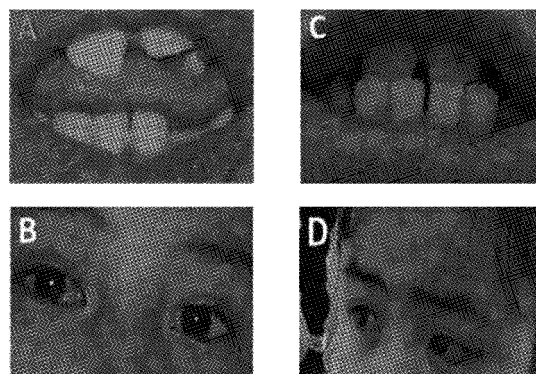


图 3 先证者临床表现

注:A、B 照片取自于先证者 1;C、D 照片取自于先证者 2。两例先证者均伴有牙质发育不全和蓝色巩膜。

Fig.3 Clinical manifestations of the probands

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 制备:采集两例成骨不全患者和 50 例正常对照人群的静脉血, EDTA 抗凝, -80°C 进行保存。采用美国 AxyPrep 血基因组试剂盒提取血液中的样本 DNA, 使用 NanoDrop 2000 核酸定量分析仪(德国)检测 DNA 的浓度和纯度, 保证浓度为 $(20 \pm 2) \text{ ng}/\mu\text{L}$, 置于 -80°C 保存备用。

1.2.2 引物设计及合成:采用 Primer 5.0 和 Oligo 7.0 对 *COL1A1* 的 51 个外显子和 *COL1A2* 的 52 个外显子进行引物的双重分析与设计, 使得引物满足条件:退火温度 $60^{\circ}\text{C} \sim 64^{\circ}\text{C}$; 长度 20~24 bp; 产物长度 80~280 bp; $|\Delta G|$ 、 $|\Delta C| < 4.5 \text{ kcal/mol}$; 将每个外显子对应的扩增产物 T_m 值差距为 $3^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$, 且验证后无相互干扰的两对引物设为一组, 与单份样本 DNA 混合作为扩增体系。对于结构较长的外显子可以设计两对或多对引物。引物由上海生工合成。

1.2.3 多重引物 HRMA 筛查分析基因突变:采用 QIAGEN(德国) Type-it HRM PCR Kit 400 试剂盒。采用基因公司(美国) illumina Eco 荧光定量 PCR 仪, 反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 10 s、退火温度 (60°C 或 64°C) 30 s、 72°C 延伸 10 s, 40 个循环。采用 48 孔板(美国 illumina 公司)进行产物合成, 每孔总反应体积为 $10 \mu\text{L}$; PCR Master Mix $5 \mu\text{L}$, 两对引物各自的上下游引物初始浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$ $0.35 \mu\text{L}$, 样本 DNA 为 $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ $1.5 \mu\text{L}$, 无酶水(北京 TIANGEN 公司) $2.1 \mu\text{L}$ 。HRMA 分析条件为 95°C 预处理 15 s, 熔解温度为 $65^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$, 上升速度为 $0.1^{\circ}\text{C}/\text{s}$, 每升高 1°C 采集 10 次荧光信号, Eco V3.0 软件进行熔解曲线分析, 每个样本重复 4~5 次。

1.2.4 长片段引物扩增与测序:经过多重引物 HRMA 筛查分析后, HRMA 熔解曲线提示存在突变, 针对存在突变的基因序列自行设计长片段引物, 并与单份正常对照 DNA 样本混合作为扩增体系, 进行 PCR 合成。采用 Applied Biosystems 公司梯度 PCR 仪(美国), 由上海生工完成测序。

1.2.5 产物序列分析:运用 GENECLUST 及

GENETOOL 等软件分析测序结果,与 GENE BANK 上的正常序列进行比对分析,确定突变位点和变化的氨基酸编码序列,在人类突变数据库中(<https://www.le.ac.uk/genetics/collagen/>)查找为新的突变类型。

2 结果

2.1 正常对照下多重引物 HRMA 分析

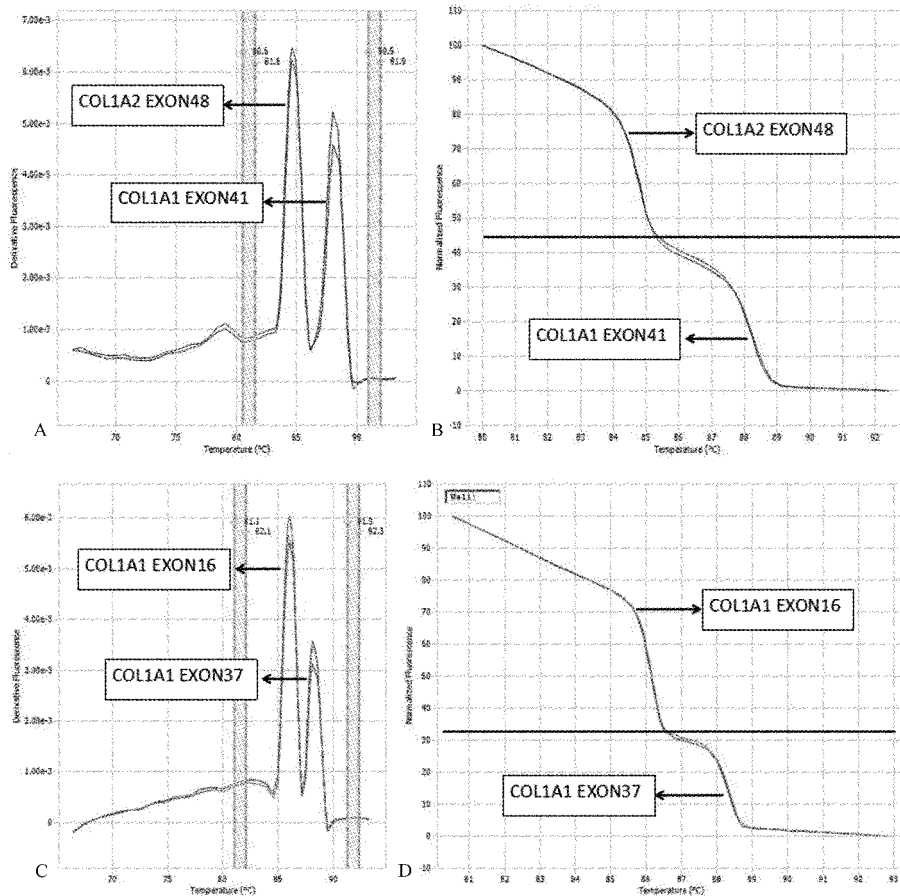


图 4 正常对照 HRMA 熔解曲线

注:A:COL1A2 exon48、COL1A1 exon41 配对合成派生曲线,Tm 分别为 84.7 °C、88.1 °C;B:COL1A2 exon48、COL1A1 exon41 配对合成标准曲线,据此判断有无异常;C:COL1A1 exon16、COL1A1 exon37 配对合成派生曲线,Tm 分别为 86.1 °C、88.2 °C;D:COL1A1 exon16、COL1A1 exon37 配对合成标准曲线,据此判断有无异常。

Fig.4 High resolution melting analysis curves

2.2 多重引物 HRMA 筛查 2 例患者基因突变

提取两例先证者的 DNA 样本,与成功配对的引物混合,作为扩增体系进行 HRMA 合成。在正常对照下,两例先证者 HRMA 熔解曲线见图 5。

2.3 测序结果

采用 Applied Biosystems 公司梯度 PCR 仪(美国)进行合成,由上海生工完成测序。测序结果为:先证者 1 在 COL1A1 第 41 外显子上 c.2877delT 杂

合突变,即 cDNA2 877 位碱基 T 缺失,编码的缬氨酸变成色氨酸;先证者 2 在 COL1A1 第 16 外显子上 c.1028delC 杂合突变,即 cDNA1 028 位碱基 C 缺失,编码的脯氨酸变成亮氨酸,与传统 HRMA 筛查结果一致。测序图见图 6。两种突变类型在人类突变数据库(<https://www.le.ac.uk/genetics/collagen/>)中均未见报道。

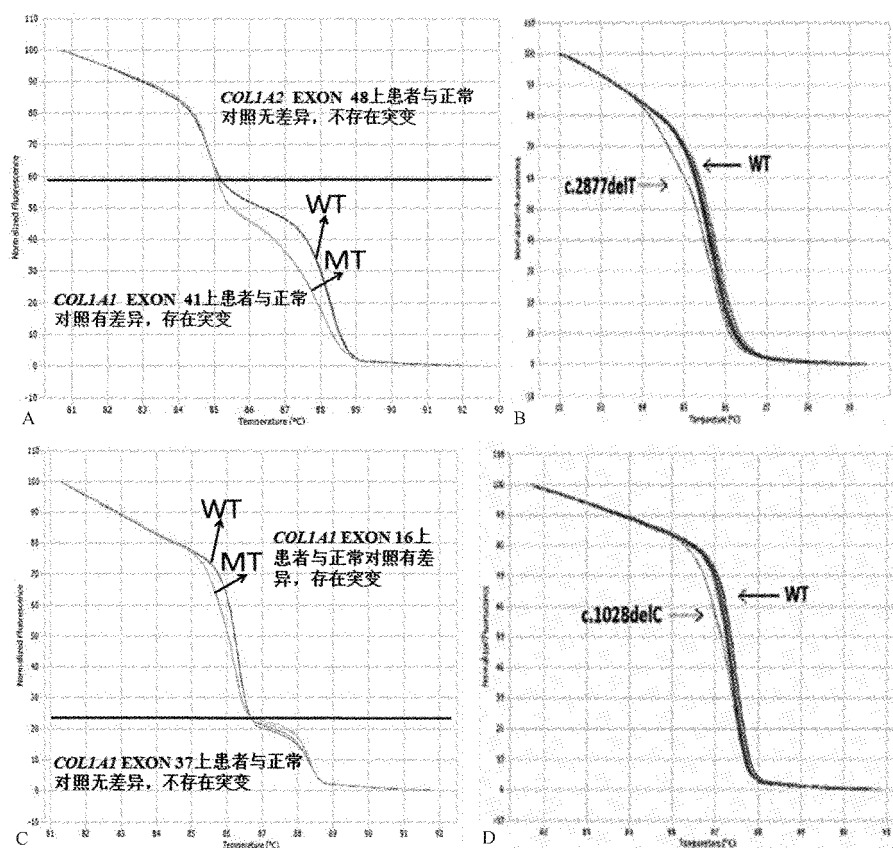


图5 患者 HRMA 熔解曲线

注:A:患者1,WT为野生型,MT为突变型,多重 HRMA 标准曲线在 COL1A1 第 41 外显子上存在异常,并且提示杂合突变;B:患者1,WT为野生型,传统 HRMA 标准曲线在 COL1A1 第 41 外显子上存在杂合突变;C:患者2,WT为野生型,MT为突变型,多重 HRMA 标准曲线在 COL1A1 第 16 外显子上有异常,并且提示杂合突变;D:患者2,WT为野生型,传统 HRMA 标准曲线在 COL1A1 第 16 外显子上存在杂合突变。

Fig.5 High resolution melting analysis curves

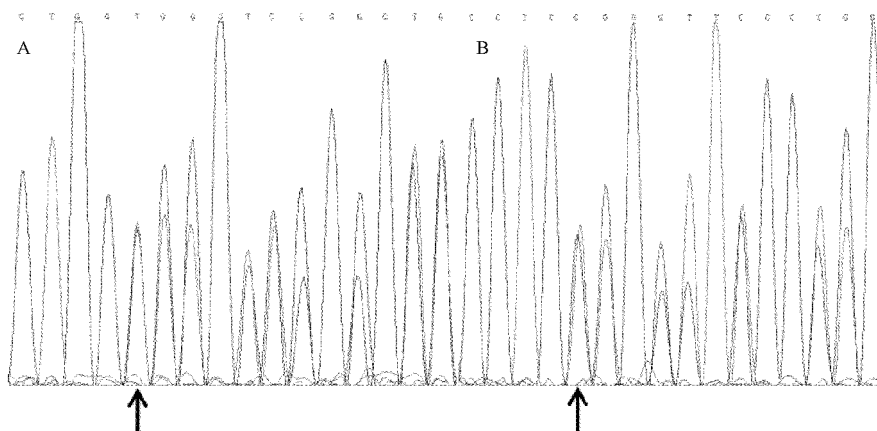


图6 先证者测序图

注:箭头所示分别是先证者1(A)和先证者2(B)的突变位点,两者的突变类型均是杂合突变。

Fig.6 Sequence curves of the proband

3 讨论

OI 主要由于 *COL1A1* 和 *COL1A2* 发生基因突变导致,这两个基因分别编码 I 型胶原蛋白的 pro- $\alpha 1$ 、pro- $\alpha 2$ 链。两种肽链因基因突变,表达出现异常,导致骨组织质或量的改变,从而引起成骨不全。OI 基因突变形式多样,种类繁多,随机发生在 103 个外显子上,每个 OI 家系又有自己的“特异突变”^[8],使得传统 PCR 筛查突变的工作量大、难度高、成本高、效率低。Gentile 等^[9]在 2012 年首次引入 qPCR-HRMA 筛查 OI 基因突变,该方法基于扩增产物之间 Tm 的微小差异及熔解曲线差异来进行突变筛查,具有快速、高效、成本低等优点。2015 年, Wang 等^[10]运用 qPCR-HRMA 筛查出两例新的 OI 突变,再一次证实 qPCR-HRMA 方法对于筛查 OI 基因的有效性。本项目研究在 qPCR-HRMA 的基础上进行了创新,建立了多重引物 HRMA,将 103 个外显子所对应的引物按照一定的条件进行两两配对,进一步降低了 OI 突变筛查的工作量,使之减半,提高了效率,降低了成本。并用该方法筛查了两例 OI 患者基因突变。

在正常对照样本下,成功配对了 39 对即 78 个外显子,成功率为 75.73%,剩余未配对成功的 *COL1A1* 有 3 个外显子,*COL1A2* 有 22 个外显子,大部分存在于 *COL1A2*。究其原因,可能由于 *COL1A2* 上碱基 A/T 的比例明显高于 G/C 的比例,碱基序列的 Tm 高于 *COL1A1* 的碱基序列;另外,由于 *COL1A2* 序列较长,结构较为复杂,设计的引物之间较易形成发卡结构,序列之间较易相互干扰。多重引物 HRMA 熔解曲线相对于单对引物而言有两个高峰,即代表着两对引物配对成功,可以说成功配对几对引物就会出现几个高峰。这也是该方法的创新之处。

在家系 1 中,筛查发现先证者 1 的 HRMA 标准曲线在 *COL1A1* 41 外显子上存在差异,患者 Tm 大约为 87.5℃,正常对照 Tm 约为 88.1℃,两者相差 0.6℃;HRMA 标准曲线提示杂合突变;测序结果为 c.2877delT 杂合突变,即 cDNA2 877 位碱基 T 缺失,编码的缬氨酸变成色氨酸。该家系中存在着一个令人关注的现象:先证者的突变位点存在于一段致死基因序列上(869 位碱基到 1001 位碱基之间),该序列与配体结合区域 MLBR2 密切相关^[11]。在家系 2 中,筛查发现先证者 2 的 HRMA 标准曲线在

COL1A1 16 外显子上存在差异,患者 Tm 大约为 86℃,正常对照 Tm 约为 86.3℃,两者相差 0.3℃;HRMA 标准曲线提示杂合突变;测序结果为 c.1028delC 杂合突变,即 cDNA1028 位碱基 C 缺失,编码的脯氨酸变成亮氨酸。多重引物 HRMA 熔解曲线显示只有在有突变的外显子上才存在异常,若配对的两对外显子上都有突变,则同时存在异常,与传统 HRMA 熔解曲线的筛查结果无明显差异,同时也证实了多重引物 HRMA 具有一定的可行性。

环境、遗传及个体差异等共同影响使得 OI 的基因型与表型的关系还不是很清楚^[12],临床诊断也仅仅依赖患者的临床特征和影像学特征^[13]。尽管如此,OI 分型仍以 Sillence 分型为主,根据临床表现和组织病理学主要分为 I~IV 型,病情严重程度也有所不同。所以 OI 表现型和基因型的关系仍是亟待研究的问题。相反地,对于 OI 患者突变筛查的方法却不断在创新,从传统 PCR 到 qPCR-HRMA,再到本文中建立的多重引物 HRMA,其筛查效率不断提高,工作量不断减少,筛查成本也在不断降低。目前,多重引物 HRMA 筛查 OI 患者突变仅适用于两对引物配对的情况,三对及三对以上配对还有待研究。另外,文章中仅涉及到两例 OI 患者的突变筛查,数量有限,多重引物 HRMA 的有效性和可行性还需要大量样本进行分析。尽管如此,两例患者的筛查结果作为新的突变位点,为科研工作者对其他 OI 患者的研究提供了有用的信息。

总之,多重引物 HRMA 为成骨不全以及其他遗传病的突变筛查提供了新的思路。这类遗传病往往是常染色体显性遗传病,基因上存在较多外显子,而且不具有突变热点。

【参考文献】

- [1] Bodian DL, Chan TF, Poon A, et al. Mutation and polymorphism spectrum in osteogenesis imperfecta type II: implications for genotype-phenotype relationships [J]. Human Molecular Genetics, 2008, 18:463-471.
- [2] Rauch F, Lalic L, Roughley P, et al. Genotype-phenotype correlations in nonlethal osteogenesis imperfecta caused by mutations in the helical domain of collagen type I [J]. Eur J Hum Genet, 2010, 18(6):642-647.
- [3] Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta [J]. Best practice & research Clinical rheumatology, 2008, 22:85-100.
- [4] Rauch F, Glorieux FH. Osteogenesis imperfecta [J]. Lancet, 2004, 363:1377-1385.

(下转第 1141 页)

- [18] 丁悦,张嘉,岳华,等.骨质疏松性椎体压缩性骨折诊疗与管理专家共识[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2018, 11(5): 425-437.
- [19] Lee JH, Lee YH, Moon SH, et al. Influence of insurance benefit

criteria on the administration rate of osteoporosis drugs in postmenopausal females[J]. Clin Orthop Surg, 2014, 6(1): 56-61.

(收稿日期: 2019-09-05;修回日期: 2019-11-01)

(上接第 1108 页)

- [5] Kataoka K, Ogura E, Hasegawa K, et al. Mutations in type I collagen genes in Japanese osteogenesis imperfecta patients[J]. Pediatr, 2007, 49(5): 564-569.
- [6] van Dijk FS, Byers PH, Dalgleish R, et al. EMQN best practice guidelines for the laboratory diagnosis of osteogenesis imperfecta[J]. Eur J Hum Genet, 2012, 20(1): 11-9.
- [7] 鞠明艳, 张天可, 白雪, 等. 成骨不全患儿 COL1A1 基因第 45 外显子两个突变位点的筛查及分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2016, 33(2): 140-144.
- [8] Lee KS, Song HR, Cho TJ, et al. Mutational spectrum of type I collagen genes in Korean patients with osteogenesis imperfecta[J]. Hum Mutat, 2006, 27(6): 599.
- [9] Gentile FV, Zuntini M, Parra A, et al. Validation of a quantitative PCR-high-resolution melting protocol for simultaneous screening of COL1A1 and COL1A2 point mutations and large rearrangements: application for diagnosis of

osteogenesis imperfecta[J]. Hum Mutat, 2012, 33(12): 1697-707.

- [10] Wang J, Ren X, Bai X, et al. Identification of gene mutation in patients with osteogenesis imperfect using high resolution melting analysis[J]. Scientific Reports, 2015, 26(5): 13468.
- [11] Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, et al. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen[J]. The Journal of biological chemistry, 2002, 277: 4223-4231.
- [12] Rauch F, Lalic L, Roughley P, et al. Relationship between genotype and skeletal phenotype in children and adolescents with osteogenesis imperfect[J]. Bone Miner Res, 2010, 25(6): 1367-1374.
- [13] 任秀智, 曾裴, 李冰, 等. 多段截骨矫形髓内固定治疗儿童成骨不全症[J]. 中华骨科杂志, 2012, 32(5): 477-481.

(收稿日期: 2019-07-02;修回日期: 2019-08-25)

(上接第 1113 页)

- [15] Chen JH, Lin X, Bu C, et al. Role of advanced glycation end products in mobility and considerations in possible dietary and nutritional intervention strategies[J]. Nutr Metab (Lond), 2018, 15:72.
- [16] 于雪妮,冯小刚,张建民,等. 人参化学成分与药理作用研究新进展[J]. 人参研究, 2019, 31(1): 47-51.
- [17] 田耀博,赵大庆,李香艳,等. 人参多糖通过抑制 ROS 水平和凋亡保护 H₂O₂ 诱导的心肌细胞氧化应激损伤[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2018, 52(2): 240-247.
- [18] 周彬,吴琳,凌叶盛,等. 人参皂苷 Rb1 通过抑制 NF- κ B p65 介导的炎症和氧化应激改善内皮细胞复制性衰老[J]. 中山大学学报(医学版), 2018, 39(6): 835-843.
- [19] 李晶峰,闫伟,金平,等. 龟甲的强骨活性研究进展[J]. 吉林

中医药, 2017, 37(12): 1242-1244.

- [20] 鲍悦,高久堂,孙佳明,等. 中药鹿角胶的研究进展[J]. 吉林中医药, 2016, 36(2): 173-175.
- [21] Pliszka B. Polyphenolic content, antiradical activity, stability and microbiological quality of elderberry (*Sambucus nigra* L.) extracts[J]. Acta Sci Pol Technol Aliment, 2017, 16(4): 393-401.
- [22] 陆敏,李晓明,卢永翎,等. 槲皮素抑制蛋白糖基化及 DNA 损伤[J]. 食品科学, 2016, 37(1): 104-108.
- [23] Olsen EK, Hansen E, Isaksson J, et al. Cellular antioxidant effect of four bromophenols from the red algae, *Vertebrata lanosa* [J]. Mar Drugs, 2013, 11(8): 2769-2784.

(收稿日期: 2019-10-16;修回日期: 2019-12-25)