

脑心通胶囊中水蛭的特异性 DNA 鉴别*

朱晓泉¹, 胡恺恩², 邵鹏柱², 彭维¹, 苏薇薇¹

(1. 中山大学生命科学学院/广东省中药上市后质量与药效再评价工程技术研究中心,
广东 广州 510275;

2. 香港中文大学李达三叶耀珍中医药研究发展中心, 香港 沙田)

摘要: 建立正品水蛭(宽体金钱蛭、日本医蛭)的 DNA 分子鉴别方法。基于线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (CO I) 基因序列, 分别设计了针对宽体金钱蛭和日本医蛭的特异性引物, 将其应用于水蛭药材正品、常见伪品菲牛蛭以及含水蛭的中成药脑心通胶囊的 PCR 技术检测。结果显示单独使用引物 WF1R2 或 WF2R2 均可以特异性扩增宽体金钱蛭的 DNA, 产生大小为 200 bp 左右的条带; 而引物 HF1R2 则可以特异性扩增日本医蛭, 产生大小为 142 bp 的条带; 这 3 对引物在伪品菲牛蛭中均无扩增条带。且用引物 WF1R2 和 WF2R2 均在脑心通胶囊中检测到宽体金钱蛭, 与胶囊所用投料药材一致。结果表明这 3 对引物可以分别对宽体金钱蛭和日本医蛭进行特异性鉴别, 且无需测序; 而引物 WF1R2 和 WF2R2 可直接用于脑心通胶囊中所用水蛭正品的检控。该 DNA 分子鉴定方法简便、准确, 特异性强且灵敏度高, 可作为对传统基原鉴定方法的补充, 进一步提高水蛭药材及含水蛭的中成药脑心通胶囊的质量控制水平。

关键词: 水蛭; 脑心通胶囊; 基原鉴定; DNA 分子鉴定; CO I 基因

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2020) 01-0114-11

Identification of specific DNA markers for *Hirudo* in the Naoxintong capsule

ZHU Xiaoxiao¹, WU Hoiyan², SHAW Pangchui², PENG Wei¹, SU Weiwei¹

(1. School of Life Sciences/Sun Yat-sen University, Guangdong Engineering and Technology Research Center for Quality and Efficacy Re-Evaluation of Post-Marketed TCM, Guangzhou 510275, China;

2. Li Dak Sum Yip Yio Chin R & D Centre for Chinese Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Shatin, N. T., Hong Kong, China)

Abstract: To identify the genuine species of *Hirudo* (*Whitmania pigra*, *Hirudo nipponica*), DNA molecular method was established. Based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO I) gene, species-specific primers were designed for *W. pigra* and *H. nipponica*, respectively. Using three species-specific primers, PCR amplification was performed for the genuine species and the common adulterant *Poecilobdella manillensis* Lesson, as well as the Naoxintong capsules. Results showed that both primers WF1R2 and WF2R2 could specifically amplify the DNA of *W. pigra* with amplicons of around 200 bp, while the primers HF1R2 could specifically amplify the DNA of *H. nipponica* to generate amplicons of 142 bp. Besides, no amplification was obtained in the adulterant *P. manillensis* with above three pairs of primers. In addition, amplicons around 200 bp were obtained in Naoxintong capsules using primers

* 收稿日期: 2019-03-29

基金项目: 中山大学成果转化项目 (33000-18825004)

作者简介: 朱晓泉 (1996 年生), 女; 研究方向: 药物分析; E-mail: zhuxx7@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 苏薇薇 (1959 年生), 女; 研究方向: 创新药物的研究开发、中药上市后质量与药效再评价;
E-mail: lssww@126.com

WF1R2 or WF2R2, with the same sequences as *W. pigra*, which is the genuine species that the company used. These results indicated that without sequencing, the primers WF1R2 (or WF2R2) and HF1R2 could specifically amplify *W. pigra* and *H. nipponica*, respectively. Furthermore, the primers WF1R2 and WF2R2 could be applied to identify the genuine species in Naoxintong capsule. This DNA molecular identification method is simple, accurate, with high specificity and sensitivity, thus it could be used as a supplement to the conventional method for origin identification and further improve the quality control of Hirudo and the Hirudo in Naoxintong capsule

Key words: Hirudo; Naoxintong capsule; origin identification; DNA molecular identification; CO I gene

水蛭 (Hirudo) 来源为水蛭科动物蚂蝗 (宽体金线蛭) *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 (日本医蛭) *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蝗 (尖细金线蛭) *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体; 其功能主治破血通经, 逐瘀消癥, 主要用于治疗血瘀证^[1]。近年来, 由于江河污染以及人们对水蛭的滥捕滥捉, 水蛭的野生资源日渐萎缩, 目前多为人工养殖的水蛭商品。其中, 养殖对象以宽体金线蛭为主, 有少量的日本医蛭, 尖细金线蛭极为罕见 (目前市面上几乎没有)。此外, 还有大规模养殖的伪品菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis* Lesson^[2], 严重影响了临床用药的安全性和有效性。因此, 对水蛭的正品基原进行准确鉴定显得尤为必要。然而, 传统的鉴别方法中, 水蛭以性状和薄层鉴别为主^[1], 专属性和特异性都不强。对于含有水蛭的中成药, 水蛭的性状特征消失, 传统的鉴别方法则更难以满足实际工作需求。

随着分子生物学领域的迅速发展, DNA 条形码分子鉴定技术应运而生, 因其具备高特异性、简单快速等特点, 被广泛应用于市售中药材的鉴定^[3-4]。近年来, 有许多研究探讨了应用线粒体细胞色素 *c* 氧化酶亚基 I (CO I)、内转录间隔区 (ITS)、ITS2、12S rRNA 和 16S rRNA 等基因序列对蛭类动物进行分类鉴别的可能性^[5-8], 结果表明上述基因可以在不同程度上有效鉴定蛭类动物, 以辨正伪。然而, 这些研究均是采用上述基因的通用引物对水蛭药材、饮片或冻干体进行鉴别, 对含水蛭的中成药中原料药材的分子鉴定 (尤其是特异性鉴别) 未见报道。

脑心通胶囊是由 16 味中药直接散粉制药而得的中药复方制剂, 主要用于治疗心绞痛、心肌梗死等心脑血管疾病^[9-11]; 水蛭为方中臣药之一。本研究以水蛭正品宽体金线蛭、日本医蛭以及伪品菲牛蛭作为研究对象, 基于 CO I 基因设计了物种特异性引物, 运用 DNA 分子鉴定技术对单味水蛭药

材以及脑心通胶囊中的水蛭进行正品基原的鉴定, 进一步提高了水蛭药材及含水蛭的中成药的质量控制水平。

1 材料与方法

1.1 材料

共收集市售水蛭商品 22 份 (表 1), 其物种信息由广东省药品检验所鉴定并使用 CO I 通用引物 (LC01490: 5' - GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3', HCO2198: 5' - TAAACTTCAGGGTGACCAA - AAAATCA - 3') 进行分子鉴定以核准。9 批脑心通胶囊 (编号 NXT-1 ~ NXT-9) 由陕西步长制药有限公司提供。另根据 2015 年版《中国药典》(一部) (以下简称“药典”) 中脑心通胶囊的制作工艺自制了缺水蛭的阴性对照药材 (T4841) 以及分别含日本医蛭和菲牛蛭的对照“脑心通胶囊”, 分别编号 NXT-12 和 NXT-18。样品均保存于中山大学生命科学学院。

1.2 仪器和试剂

数显型恒温金属浴 (美国 Labnet 公司), Nanodrop 2000C 超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 96 孔热循环仪 (新加坡 Applied Biosystems 公司), 5430R 型多功能离心机 (加拿大 Eppendorf 公司), JY600C 型君意东方电泳仪 (北京君意华鑫科技有限公司), Gel Doc tm XR + 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒 (货号 DL107-01), 广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒 (货号 DL116-01), 多功能 DNA 纯化回收试剂盒 (货号 DH103-01), 蛋白酶 K (20 mg/mL, 货号 SH405-01), 2.5 mmol/L dNTPs (货号 AP201-01), Taq DNA Polymerase (内含 10 × PCR 缓冲液, 25 mmol/L MgCl₂ 溶液, 5 U/μL 的 Taq DNA 聚合酶, 货号 AT101-12), 6 × RNA/DNA Loading buffer (货号 EL101-01) 均购自北京博迈

德基因技术有限公司，SYBRTM Safe DNA gel stain（货号 S33102）和 GeneRuler 100 bp DNA Ladder（货号 SM0242）均购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司。

表 1 市售水蛭商品信息表
Table 1 The information of Hirudo collected on the market

序号	鉴定结果	样品状态	产地	供应商
H1	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	陕西步长制药有限公司
H2	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	陕西步长制药有限公司
H3	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	陕西步长制药有限公司
H4	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	陕西步长制药有限公司
H5	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	陕西步长制药有限公司
H6	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	陕西步长制药有限公司
H7	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	陕西步长制药有限公司
H8	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	动物冻干体	广东	广东连州养殖场
H9	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	江苏	广州大参林大药房
H10	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	江苏	西安恒生堂制药有限公司
H11	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	广州至信中药饮片有限公司
H12	宽体金线蛭 <i>Whitmania pigra</i> Whitman	干燥药材	山东	康美药业股份有限公司
H13	日本医蛭 <i>Hirudo nipponica</i> Whitman	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H14	日本医蛭 <i>Hirudo nipponica</i> Whitman	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H15	日本医蛭 <i>Hirudo nipponica</i> Whitman	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H16	日本医蛭 <i>Hirudo nipponica</i> Whitman	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H17	日本医蛭 <i>Hirudo nipponica</i> Whitman	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H18	菲牛蛭 <i>Poecilobdella manillensis</i> Lesson	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H19	菲牛蛭 <i>Poecilobdella manillensis</i> Lesson	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H20	菲牛蛭 <i>Poecilobdella manillensis</i> Lesson	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H21	菲牛蛭 <i>Poecilobdella manillensis</i> Lesson	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司
H22	菲牛蛭 <i>Poecilobdella manillensis</i> Lesson	动物冻干体	湖北	荆州民康生物技术有限公司

1.3 DNA 提取

水蛭单味药材的 DNA 提取：取待测药材 20 ~ 50 mg 于灭菌后的 1.5 mL 离心管中，用消毒后的小剪刀将待测样品剪碎，按组织/细胞基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书提取总 DNA。

脑心通胶囊的 DNA 提取：取约 50 mg 脑心通胶囊细粉到 1.5 mL 灭菌离心管，加入 400 μ L 缓冲液 AP1（该缓冲液为广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒中自带试剂）和 20 μ L 蛋白酶 K，按广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书提取总 DNA。9 批脑心通胶囊、缺水蛭的脑心通胶囊对照药材和分别含日本医蛭、菲牛蛭的脑心通胶囊对照样品均按上述方法提取得总 DNA，并分别定量至

(50.0 $\pm$ 0.5) ng/ μ L，存于 -20 $^{\circ}$ C 待用。

1.4 引物的设计

在 NCBI 的 GenBank 数据库中下载水蛭正品所属的 2 个科（Haemopidae 和 Hirudinidae）下各物种的 CO I 片段，其中 Haemopidae 共计 17 条，Hirudinidae 共计 47 条，登录号见表 2、3。运用 BioEdit v7.0.4 软件对这些序列进行排序、比对、分析，发现这 2 个科之间的差异较大，而属下的差异较小，故本实验针对 Haemopidae 和 Hirudinidae 水蛭正品与伪品之间的种间差异，分别设计了针对宽体金线蛭和日本医蛭的水蛭特异性引物，其序列如表 4 所示。由北京六合华大基因科技有限公司（广州分公司）合成。

表 2 GenBank 中水蛭 Haemopidae 科下各物种的 CO I 序列列表
Table 2 The CO I gene sequence list of species of Haemopidae family in GenBank Database

拉丁名	GenBank 登录号	拉丁名	GenBank 登录号
<i>Whitmania pigra</i>	EU304459. 1	<i>Haemopsis sanguisuga</i>	AF462021. 1、KP663469. 1
<i>Whitmania acranulata</i>	KM655838. 1	<i>Haemopsis terrestris</i>	AY786459. 1
<i>Whitmania acranulata</i>	KC688271. 1	<i>Haemopsis caeca</i>	AY040702. 1
<i>Haemopsis marmorata</i>	AF003270. 1、FJ897515. 1	<i>Haemopsis elegans</i>	EF125042. 1
<i>Haemopsis kingi</i>	KM611858. 1	<i>Haemopsis grandis</i>	AY425447. 1
<i>Haemopsis lateromaculata</i>	AF116028. 1	<i>Whitmania laevis</i>	KM655839. 1、KC688269. 1、 KT693113. 1、KT693112. 1

表 3 GenBank 中水蛭 Hirudinidae 科下各物种的 CO I 序列列表
Table 3 The CO I gene sequence list of species of Hirudinidae family in GenBank Database

拉丁名	GenBank 登录号	拉丁名	GenBank 登录号
<i>Hirudo nipponia</i>	AY763153. 1、AY63153. 1	<i>Macrobdella ditetra</i>	DQ097215. 1
<i>Poecilobdella manillensis</i>	KC688268. 1、GQ368747. 1、AY425449. 1、 JN412848. 1、KX579976. 1、KX215710. 1	<i>Poecilobdella nanjingensis</i>	LC145741. 1、LC145739. 1
<i>Hirudo orientalis</i>	JN104648. 1	<i>Aliolimnatis africana</i>	AY425451. 1
<i>Hirudo sulukii</i>	KU216242. 1、KU216239. 1	<i>Aliolimnatis buntonensis</i>	GQ368740. 1
<i>Hirudo verbana</i>	EF446680. 1、AY763150. 1	<i>Aliolimnatis oligodonta</i>	GQ368739. 1
<i>Hirudo troctina</i>	AY763155. 1	<i>Asiaticobdella fenestrata</i>	GQ368741. 1
<i>Hirudo medicinalis</i>	FJ655036. 1、AY786458. 1	<i>Limnatis nilotica</i>	AY425452. 1
<i>Macrobdella decora</i>	AF003271. 1	<i>Myxobdella annandalei</i>	GU394014. 1
<i>Aliolimnatis michaelsoni</i>	GQ368738. 1	<i>Myxobdella sinanensis</i>	LC192132. 1
<i>Goddardobdella elegans</i>	GQ368742. 1	<i>Oxyptychus braziliensis</i>	AY425455. 1
<i>Hirudinaria bpling</i>	JQ846012. 1	<i>Philobdella gracilis</i>	DQ097218. 1
<i>Limnatis paluda</i>	GQ368755. 1	<i>Pintobdella chiapasensis</i>	GU394015. 1
<i>Limnobdella mexicana</i>	GQ368757. 1	<i>Tyrannobdella rex</i>	GU394016. 1
<i>Macrobdella diplotertia</i>	DQ097223. 1	<i>Philobdella floridana</i>	DQ097219. 1、DQ097220. 1
<i>Poecilobdella javanica</i>	KT693110. 1、KJ551853. 1、 JN412851. 1、GQ368745. 1	<i>Erpobdella octoculata</i>	HQ336344. 1、AF003274. 1、 HM246599. 1、HM246555. 1

表 4 宽体金线蛭和日本医蛭的特异性引物
Table 4 Species-specific primers for *W. pigra* and *H. nipponia*

水蛭物种	引物对	引物	序列 (5'→3')	扩增片段大小/bp
宽体金线蛭 <i>W. pigra</i>	WF1R2	正向引物 CO I WP F1	TTGGTGGGTTTGTAATTGAC	202
		反向引物 CO I WP R2	GATGGGCCTGAATGAGATACG	
	WF2R2	正向引物 CO I WP F2	TGGGTTTGTAATTGACTC	198
		反向引物 CO I WP R2	GATGGGCCTGAATGAGATACG	
日本医蛭 <i>H. nipponia</i>	HF1R2	正向引物 CO I HN F1	GCCATTAATAGTTGGAGCAG	142
		反向引物 CO I HN R2	CGGATATAATGTTTCATCCAGC	

1.5 PCR 扩增

用上述制备的水蛭单味药材 DNA 和脑心通胶囊 DNA 作为模板，分别进行 PCR 扩增。扩增总体系为 15 μL ，其中待鉴定的 DNA 模板 0.5 μL ，10 $\times$ PCR 缓冲液 1.5 μL ，25 mmol/L MgCl_2 溶液 1.5 μL ，2.5 mmol/L dNTPs 1.2 μL ，10 $\mu\text{mol/L}$ 的特异性正向引物和 10 $\mu\text{mol/L}$ 的特异性反向引物各 0.75 μL ，5 U/ μL 的 Taq DNA 聚合酶 0.1 μL ，ddH₂O 8.7 μL ；同时设置以 ddH₂O 为模板作为阴性对照。PCR 扩增反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，39 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

1.6 琼脂糖凝胶电泳检测

以琼脂糖制备凝胶，并加入 SYBRTM Safe DNA gel stain 染色。取 5 μL PCR 扩增产物与 1 μL 6 $\times$ RNA/DNA Loading buffer 混合，于 $w = 1.5\%$ 琼脂糖

凝胶上进行点样，DNA Marker 为 GeneRuler 100 bp DNA Ladder。120 V 条件下电泳 20 ~ 30 min 后，置凝胶成像系统观察。

2 结果与分析

2.1 水蛭单味药材的特异性鉴别

分别用引物 WF1R2、WF2R2 和 HF1R2 对 22 个水蛭商品的 DNA 进行 PCR 扩增，电泳检测结果见图 1。图 1A、1B 中，引物 WF1R2 和 WF2R2 可以有效扩增出宽体金线蛭 *W. pigra* 的 DNA，电泳结果呈现出大小为 200 bp 左右的明亮条带；而日本医蛭 *H. nipponica*、伪品菲牛蛭 *P. manillensis* 和空白对照均无扩增条带。另一方面，引物 HF1R2 对日本医蛭产生特异性扩增，有明亮清晰的条带，大小约 140 bp，而其它样品均呈阴性，无扩增条带（图 1C）。此外，为验证所获得条带为目的基因，

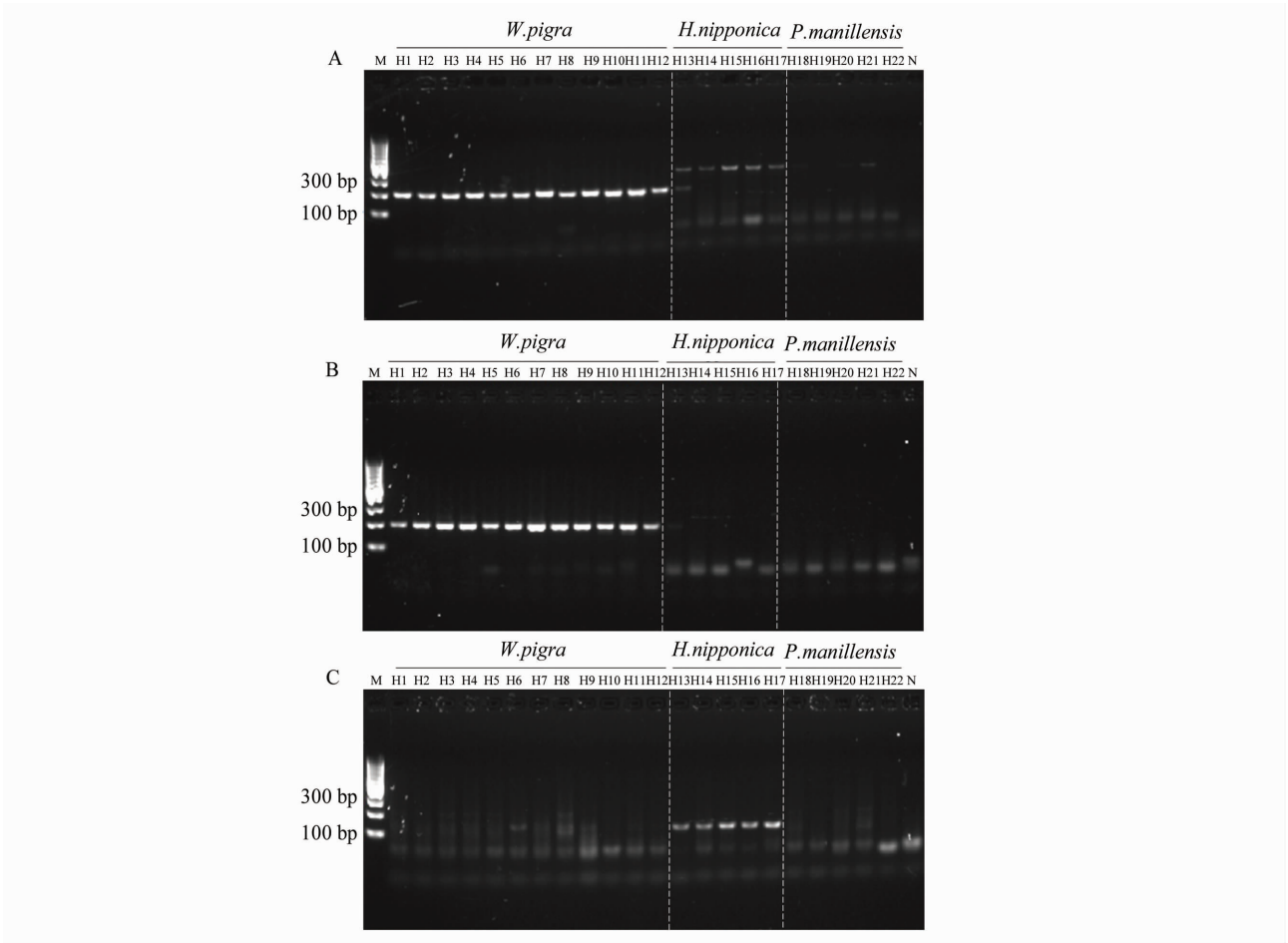


图 1 水蛭特异性引物 WF1R2 (A)、WF2R2 (B) 和 HF1R2 (C) 对水蛭药材进行 PCR 的产物电泳检测图

Fig. 1 Electrophoregram of PCR amplification products by specific primers for the Hirudo

(A: WF1R2; B: WF2R2; C: HF1R2)

M: DNA 相对分子质量标记; H1 ~ H22: 水蛭药材; N: 空白对照

M: DNA marker; H1 – H22: crude drugs of Hirudo; N: Negative control

将特异性引物所得 DNA 条带切胶纯化、测序以进行分析。就引物 WF1R2 和 WF2R2 而言，所得序列较长，利用 BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）工具与 GenBank 数据库中相关序列进行搜索匹配。结果显示两对引物所对应的序列最高匹配物种均为宽体金线蛭，相似度达 96.2%~100%。而引物 HF1R2 所得序列较短，GenBank 数据库中有较多其他物种的干扰，故将该序列直接与 CO I 通

用引物对相应日本医蛭所扩增的序列进行序列比对。由图 2 可知，引物 HF1R2 所得序列与相应位点上 CO I 通用引物所得日本医蛭的序列一致，该特异性引物所获得的条带为相应的目的基因（CO I 通用引物所得日本医蛭的序列全长 658 bp，图 2 仅截取 180 ~ 360 位点的序列片段）。上述实验结果表明，引物 WF1R2/WF2R2 和 HF1R2 分别对宽体金线蛭和日本医蛭具有良好的特异性。

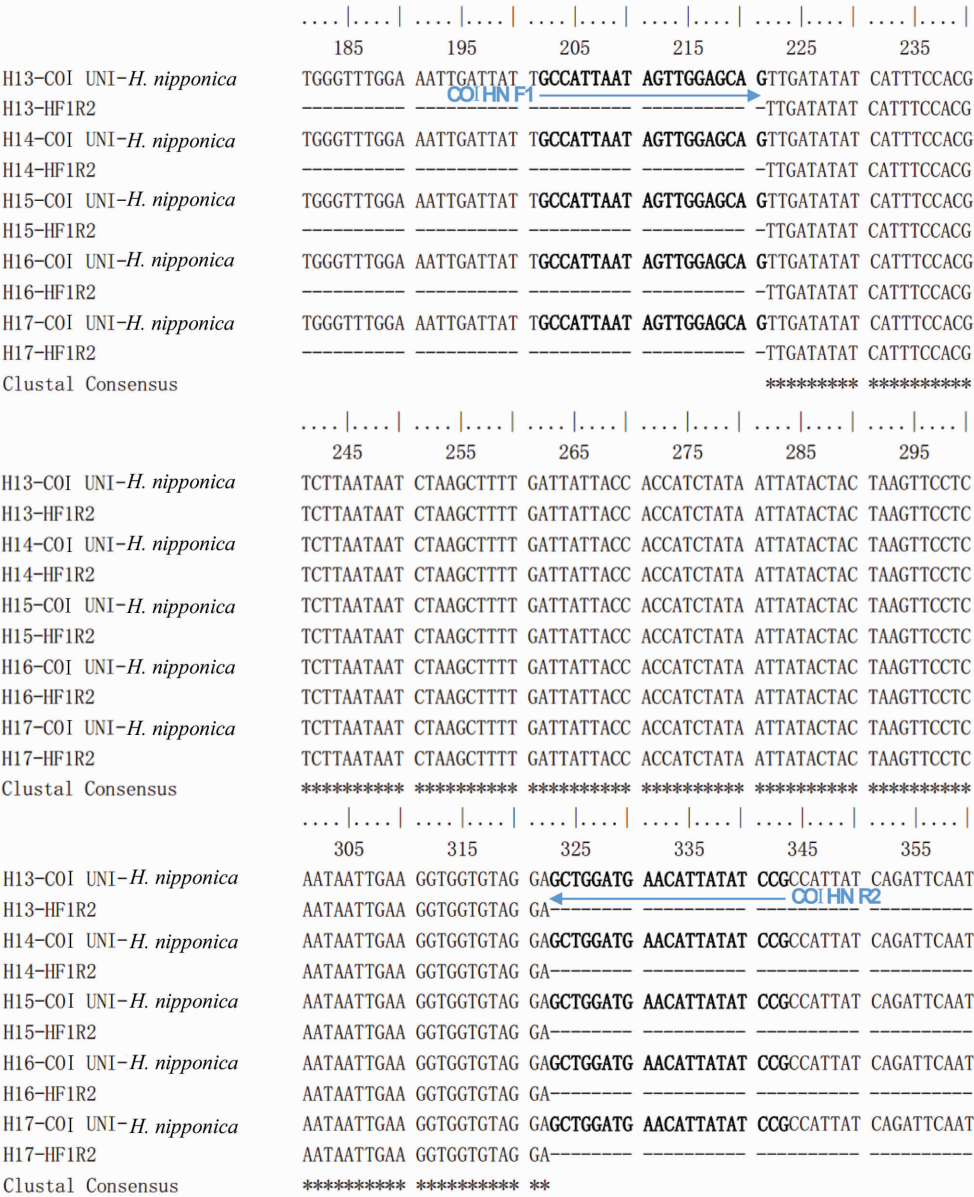


图 2 CO I 通用引物及水蛭特异性引物 HF1R2 对日本医蛭扩增所得序列对比

Fig. 2 Multiple alignment of the sequences amplified from the crude drugs of *H. nipponica* with CO I universal primers and specific primers HF1R2

H13 ~ H17: 日本医蛭药材; CO I UNI: CO I 通用引物

H13 - H17: crude drugs of *H. nipponica* ; CO I UNI: CO I universal primers

2.2 脑心通胶囊中水蛭药材的特异性鉴别

将引物 WF1R2 和 WF2R2 分别应用于脑心通胶囊中水蛭的检测时（图 3A、3B），均在 200 bp 左右大小出现明亮清晰的条带。为验证是否为假阳性，将各条带切胶纯化、测序，并利用 BLAST 工具，与 GenBank 数据库中相关序列进行搜索匹配。结果显示，9 批脑心通胶囊所对应的序列最高匹配的物种为宽体金线蛭 *W. pigra*，相似度达 98% ~ 99%。而在用引物 HF1R2 进行扩增时，脑心通胶囊中未检出明亮的条带（图 3C）。由此说明，脑心通胶囊中所用水蛭为宽体金线蛭，而不含日本医蛭，这与胶囊所用水蛭投料药材（H1 ~ H7）鉴定结果一致。

为验证若有日本医蛭或非牛蛭混入该胶囊中，这三对引物是否能检测出正品，本实验按照脑心通胶囊的制备工艺，自制了分别含日本医蛭和非牛蛭的脑心通胶囊（NXT - 12，NXT - 18）。结果显示

（图 3），将引物 HF1R2 应用于 NXT - 12 的检测时，出现了大小约 140 bp 的明亮条带，说明若该胶囊中含有另一药典收载的正品日本医蛭，引物 HF1R2 是可以将其鉴别出来的。而若胶囊中含有菲牛蛭，3 对引物都不会扩增出条带，说明这 3 对引物用于脑心通胶囊中水蛭的鉴别时，也是具备特异性的。

2.3 脑心通胶囊中水蛭的特异性鉴别灵敏度试验

测量脑心通胶囊的总 DNA 质量浓度后，母液均定量至 (50.0 ± 0.5) ng/ μ L 作为标准质量浓度。然后分别以 5 倍梯度稀释，一共 7 个梯度，即分别稀释至质量浓度为 10.0、2.0、0.4、0.8 $\times 10^{-1}$ 、1.6 $\times 10^{-2}$ 、3.2 $\times 10^{-3}$ 和 6.4 $\times 10^{-4}$ ng/ μ L。用引物 WF1R2、WF2R2 和 HF1R2 对所有相应的脑心通胶囊进行 PCR 扩增（每个批次重复 1 次），琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 4 ~ 6。

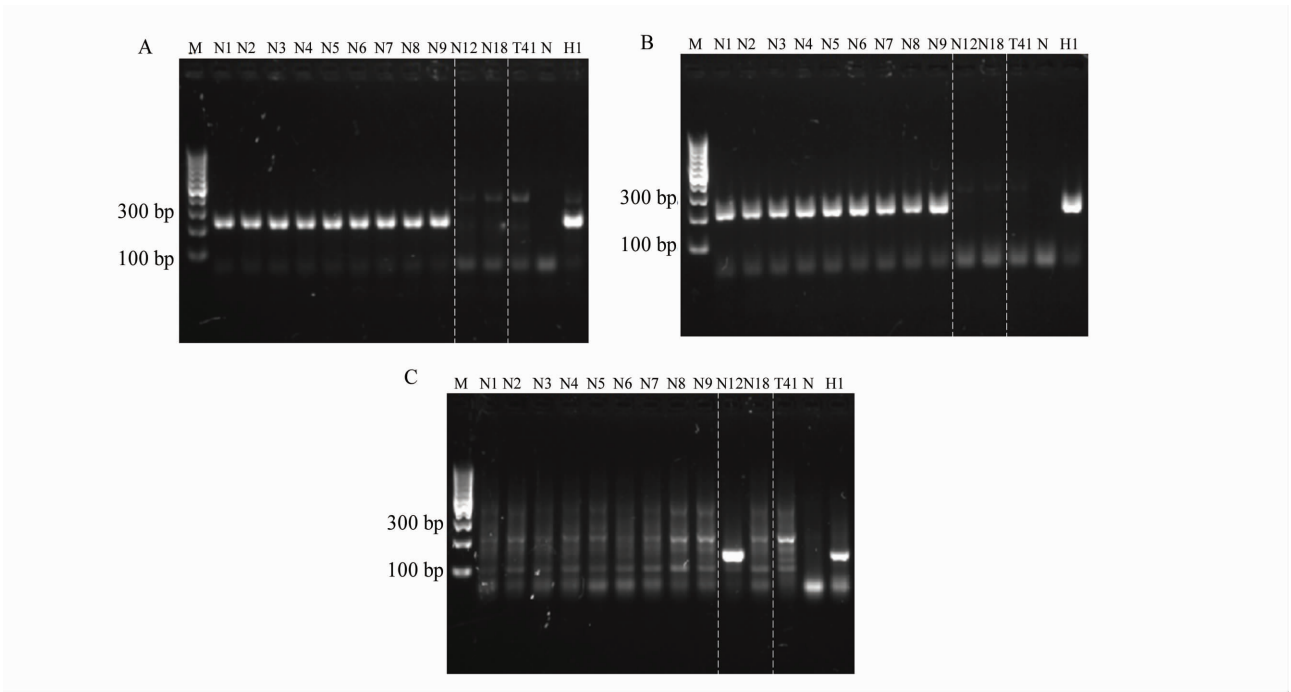


图 3 水蛭特异性引物 WF1R2（A）、WF2R2（B）和 HF1R2（C）对脑心通胶囊进行 PCR 的产物电泳检测图

Fig. 3 Electrophoregram of PCR amplification products by specific primers for Naoxintong capsules (A: WF1R2; B: WF2R2; C: HF1R2)

M: DNA 相对分子质量标记; N1 ~ N9: 脑心通胶囊; N12: 含日本医蛭的自制脑心通胶囊; N18: 含菲牛蛭的自制脑心通胶囊; T41: 缺水蛭的脑心通胶囊阴性对照; N: 空白对照; H1: 宽体金线蛭阳性对照; H13: 日本医蛭阳性对照

M: DNA marker; N1 ~ N9: Naoxintong capsules; N12: homemade Naoxintong capsule containing *H. nipponica*; N18: homemade Naoxintong capsule containing *P. manillensis*; T41: Hirudo-deficient Naoxintong capsule; N: Negative control; H1: crude drug of *W. pigra*; H13: crude drug of *P. manillensis*

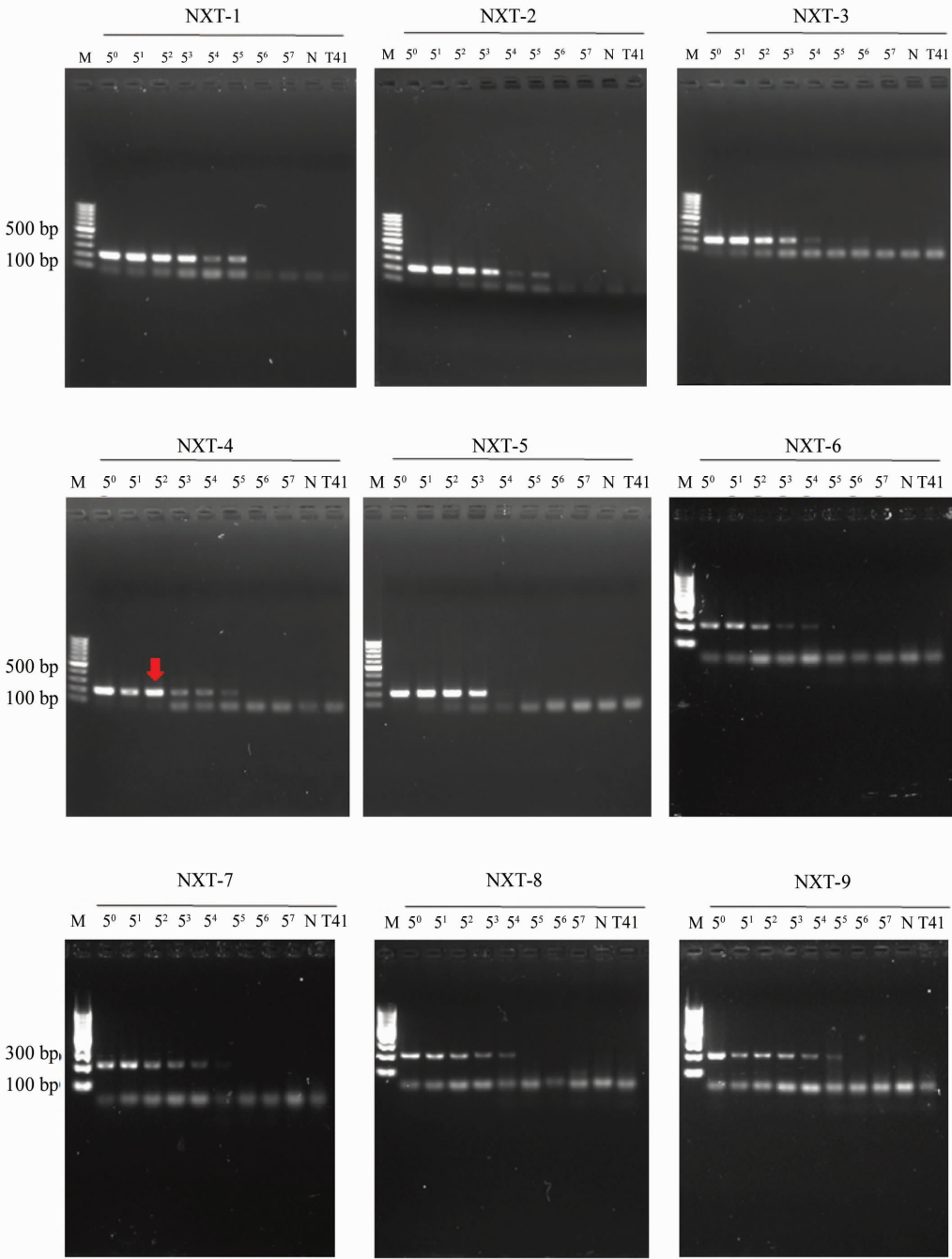


图 4 引物 WF1R2 对脑心通胶囊中水蛭鉴别的灵敏度检测

Fig. 4 Sensitivity test for the authentication of *Hirudo* in Naoxintong capsules using primers WF1R2

M: DNA 相对分子质量标记; N: 空白对照; T41: 缺水蛭的脑心通胶囊阴性对照; 5⁰ ~ 5⁷: 不同稀释倍数, 分别对应 DNA 质量浓度为 50.0、10.0、2.0、0.4、0.8 × 10⁻¹、1.6 × 10⁻²、3.2 × 10⁻³ 和 6.4 × 10⁻⁴ ng/μL

M: DNA marker; N: Negative control; T41: *Hirudo*-deficient Naoxintong capsule; 5⁰ ~ 5⁷: dilution multiple, the corresponding DNA concentration is 50.0, 10.0, 2.0, 0.4, 0.8 × 10⁻¹, 1.6 × 10⁻², 3.2 × 10⁻³ and 6.4 × 10⁻⁴ ng/μL

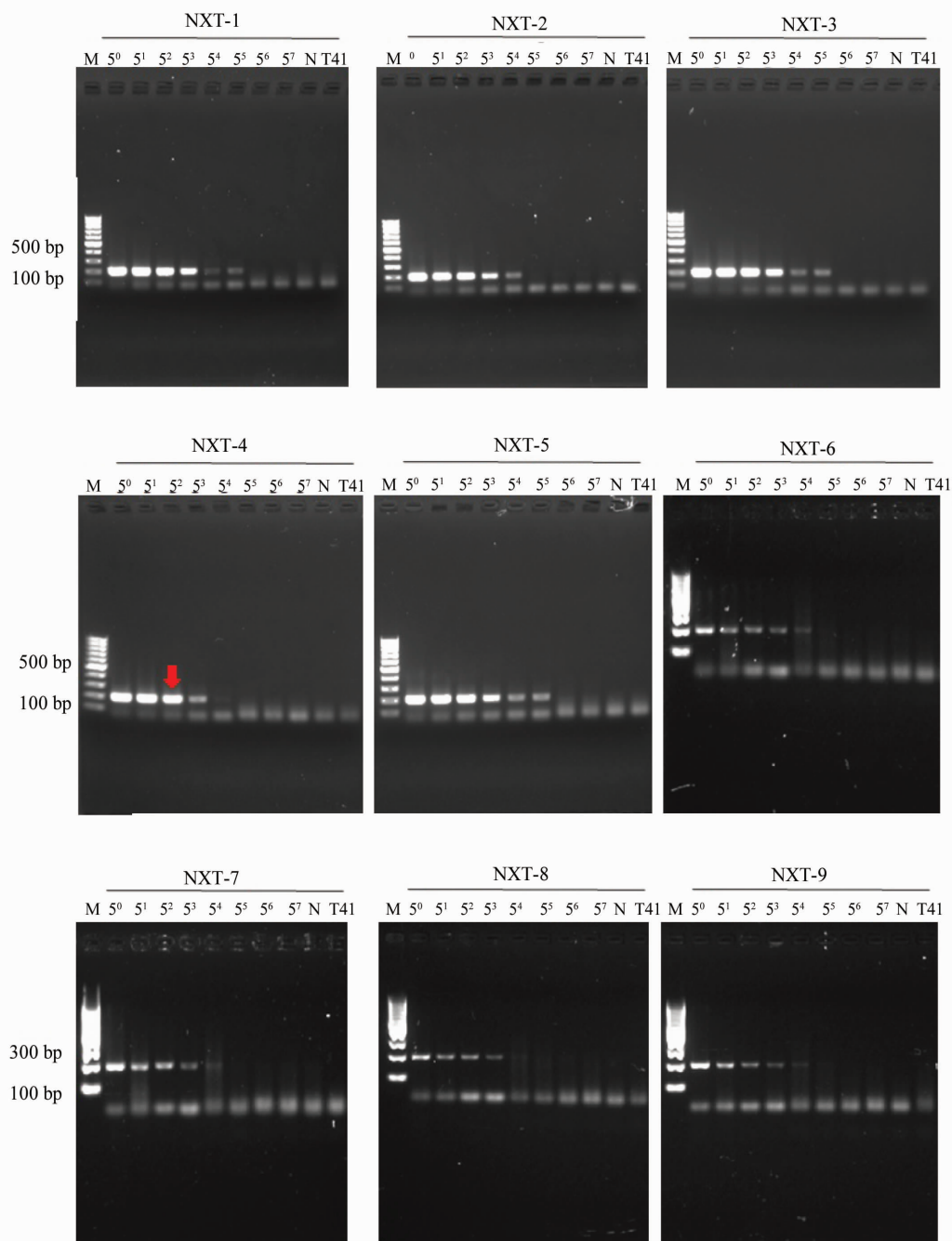


图 5 引物 WF2R2 对脑心通胶囊中水蛭鉴别的灵敏度检测

Fig. 5 Sensitivity test for the authentication of *Hirudo* in Naixintong capsules using primers WF2R2

M: DNA 相对分子质量标记; N: 空白对照; T41: 缺水蛭的脑心通胶囊阴性对照; 5⁰ ~ 5⁷: 不同稀释倍数, 分别对应 DNA 质量浓度为 50.0、10.0、2.0、0.4、0.8 × 10⁻¹、1.6 × 10⁻²、3.2 × 10⁻³ 和 6.4 × 10⁻⁴ ng/μL

M: DNA marker; N: Negative control; T41: *Hirudo*-deficient Naixintong capsule; 5⁰ ~ 5⁷: dilution multiple, the corresponding DNA concentration is 50.0, 10.0, 2.0, 0.4, 0.8 × 10⁻¹, 1.6 × 10⁻², 3.2 × 10⁻³ and 6.4 × 10⁻⁴ ng/μL

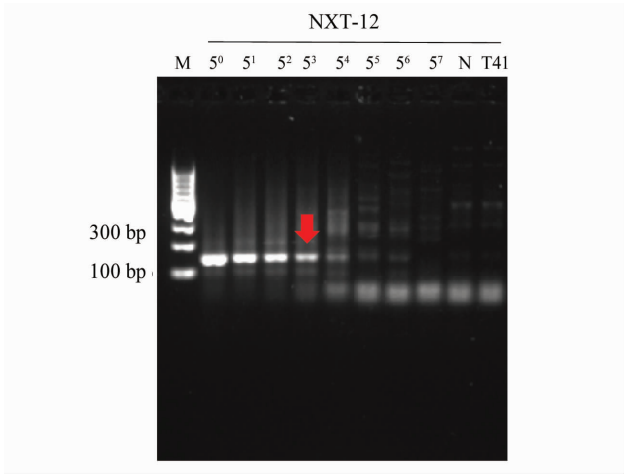


图 6 引物 HF1R2 对脑心通胶囊中水蛭鉴别的灵敏度检测

Fig. 6 Sensitivity test for the authentication of Hirudo in Naoxintong capsules using primers HF1R2

M: DNA 相对分子质量标记; N: 空白对照; T41: 缺水蛭的脑心通胶囊阴性对照; 5⁰~5⁷: 不同稀释倍数, 分别对应 DNA 质量浓度为 50.0、10.0、2.0、0.4、0.8 × 10⁻¹、1.6 × 10⁻²、3.2 × 10⁻³ 和 6.4 × 10⁻⁴ ng/μL
M: DNA marker; N: Negative control; T41: Hirudo-deficient Naoxintong capsule; 5⁰~5⁷: dilution multiple, the corresponding DNA concentration is 50.0, 10.0, 2.0, 0.4, 0.8 × 10⁻¹, 1.6 × 10⁻², 3.2 × 10⁻³ and 6.4 × 10⁻⁴ ng/μL

3 讨 论

基原鉴定是中药质量控制过程中最基础且最重要的一环。水蛭等动物类中药因其缺乏特征成分, 且多数在加工过程中外部形态被破坏, 组织细胞特征不明显, 很难对其进行物种鉴定和质量评价^[12]。而当其中以中成药形式入药, 在含多味中药材的脑心通胶囊中对水蛭进行基原鉴定则难上加难, 也少有

人研究。DNA 分子鉴定技术以 DNA 作为标记物, 不受外在形态的影响, 具有特异性高、灵敏度好的特点。在 2015 年版《中国药典》(一部) 中, 正式收载了蕲蛇、乌梢蛇和川贝母的 DNA 分子鉴别方法及中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则^[1], 标志着 DNA 分子鉴定方法成为继 基原、性状、显微和薄层鉴别等四大经典鉴别方法之后的第五大国家法定鉴别方法。

相较于其他线粒体基因, CO I 基因包含的系统发育信号更为广泛^[13]; 且 GenBank 数据库中现存大量的水蛭 CO I 基因序列可做参考, 故本研究基于 CO I 基因进行物种鉴定。此外, 相较于他人的研究, 本研究的不同之处在于分别针对宽体金线蛭、日本医蛭设计了物种特异性引物以互相区分, 而非采用 CO I 的通用引物进行鉴别, 原因有二: 一是由于脑心通胶囊组成复杂, 所含其他两味动物药(地龙和全蝎) 均可被 CO I 基因的通用引物扩增, 易对水蛭的鉴别产生干扰; 二是该胶囊中药材均经粉碎后入药, DNA 多有降解, 而 CO I 通用引物所得扩增片段较长(约 650 bp), 不易在该胶囊中对水蛭进行扩增。研究结果显示, 本研究所设计的这 3 对引物成功地应用于水蛭单味药材和脑心通胶囊中水蛭药材的鉴定。其中, 引物 WF1R2 或 WF2R2 可以特异性鉴别宽体金线蛭, 而引物 HF1R2 可以特异性鉴别日本医蛭; 并且, 这三对引物均可以将水蛭正品与市场常见的伪品菲牛蛭区分开。本实验采用 DNA 作为标记物, 不受实验材料的整体性影响, 具有专属性和特异性, 且灵敏度高, 弥补了传统的性状、显微鉴别等方法不足, 同时也进一步证实了将 DNA 分子鉴定技术应用于中成药原料药材鉴定的可行性, 或可成为对水蛭药材或含水蛭的中成药进行现场鉴别的关键技术。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2015: 83-84,1379.
Chinese-Pharmacopoeia-Commission. Pharmacopoeia of People's Republic of China (Part 1)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:83-84,1379.

[2] 刘飞, 杨大坚. 中国水蛭人工养殖的现行模式调研[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2014, 16(10): 2170-2173.
LIU F, YANG D J. Study on artificial breeding model of medical leech in China[J]. World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, 2014, 16(10): 2170-2173.

[3] MING L I, CAO H, BUT P H, et al. Identification of herbal medicinal materials using DNA barcodes[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2011, 49(3): 271-283.

[4] FAN Y, FEI D, HONG C, et al. DNA Barcoding for the Identification and Authentication of Animal Species in Traditional Medicine[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018:1-18.

[5] 刘晓帆, 刘春生, 杨瑶琨, 等. 基于 CO I 基因的水蛭及其混伪品的 DNA 条形码研究[J]. 北京中医药大学

- 学报, 2013, 36(1): 63–66.
- LIU X F, LIU C S, YANG Y J, et al. DNA barcodes of Shuizhi (*Hirudo*) and its adulterants studied based on CO I gene[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2013, 36(1): 63–66.
- [6] 徐云玲, 聂晶. 水蛭及其近缘物种的 rDNA-ITS 序列分析[J]. 中药材, 2013, 36(6): 874–879.
- XU Y L, NIE J. Sequence analysis of rDNA-ITS gene in medicinal leeches and their closely related species (*Euhirudinea*; *Arhynchobdellida*) [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2013, 36(6): 874–879.
- [7] 刘飞, 郭巧生, 史红专, 等. 蚂蟥和水蛭种间遗传变异和系统关系的 ITS 序列分析[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(4): 414–419.
- LIU F, GUO Q S, SHI H Z, et al. Analysis of genetic differentiation and phylogenetic relationship between *Whitmania pigra* and *Hirudo nipponia* based on ITS sequence [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011, 36(4): 414–419.
- [8] 肖凌. 水蛭 DNA 鉴定、活性多肽分离及其作用机制的研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.
- XIAO L. Research on the DNA barcoding, activity peptide isolation and its anticoagulation mechanism of leeches [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2015.
- [9] 郑晰, 张永杰. 脑心通胶囊治疗稳定型心绞痛的临床效果[J]. 中国医学导报, 2016, 13(32): 137–140.
- ZHENG X, ZHANG Y J. Clinical efficacy of Buchang Naoxintong Capsules in the treatment of stable angina pectoris[J]. China Medical Herald, 2016, 13(32): 137–140.
- [10] 钟飞, 李伟, 李艳红. 脑心通胶囊对心肌梗死二级预防的疗效观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(4): 416–418.
- ZHONG F, LI W, LI Y H, et al. Effect of Naoxintong Capsule on secondary prevention of myocardial infarction [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio/Cerebrovascular Disease, 2014, 12(4): 416–418.
- [11] 杨柳, 郭毅. 脑心通胶囊治疗短暂性缺血性脑发作的 Meta 分析[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 202–207.
- YANG L, GUO Y. Meta-analysis of naoxintong capsules on transient ischemic attack[J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Meteria Medica, 2015, 31(4): 202–207.
- [12] 王孟虎, 许亮, 康廷国, 等. 动物类中药 DNA 条形码鉴定研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 227–234.
- WANG M H, XU L, KANG T G, et al. Advances in animal medicine DNA Barcoding[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(15): 227–234.
- [13] HEBERT D N, CYWINSKA A, BALL L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270: 313–321.

(责任编辑 张 冰)