

· 资源与鉴定 ·

威灵仙一种新伪品的生药学和分子生药学鉴别

张雪¹, 高雅², 杨晓涵¹, 臧艺玫³, 刘春生^{1*}

- (1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488;
2. 河北省承德市疾病预防控制中心, 河北 承德 067000;
3. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100094)

[摘要] 目的:运用生药学和分子生药学研究思路和方法,对市场上一种威灵仙新伪品进行鉴别,为保障威灵仙药材的安全使用提供实验依据。**方法:**对威灵仙及其伪品进行性状、显微等生药学研究,描述威灵仙及其伪品的生药学鉴别特征。对威灵仙及其伪品的分子生药学研究,通过试剂盒提取样品的DNA,聚合酶链式反应(PCR)扩增及双向测序获得其内转录间隔区(ITS)序列,根据美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中已收录的ITS序列进行相似度分析及DNA条形码溯源。**结果:**威灵仙及伪品的生药学鉴别特征主要有外皮颜色以及有无茎节等;横切面显微特征区别主要为有无髓。分子生药学研究表明,该伪品的基原植物为紫金牛科紫金牛 *Ardisia japonica*。**结论:**该威灵仙伪品为紫金牛的茎及根茎,该伪品与威灵仙在成分、功能主治方面差别较大,在临床应用上应严格区分。

[关键词] 威灵仙; 伪品; 生药学; 分子生药学; 紫金牛; 聚合酶链式反应

[中图分类号] R22;R282;R931 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0020-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181411

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180425.1651.011.html>

[网络出版时间] 2018-04-26 15:26

Pharmacognostical Identification and Molecular Pharmacognostical Identification on a New Adulterant of Clematidis Radix et Rhizoma

ZHANG Xue¹, GAO Ya², YANG Xiao-han¹, ZANG Yi-mei³, LIU Chun-sheng^{1*}

- (1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;
2. Chengde Center for Disease Control and Prevention, Chengde 067000, China;
3. School of Biology and Medicine, Beijing City University, Beijing 100094, China)

[Abstract] **Objective:** Research on a new adulterant of Clematidis Radix et Rhizoma was made by the ideas and methods of pharmacognosy and molecular pharmacology, in order to provide the basis for safe use of this herb. **Method:** The characters, microscopy and other pharmacognostic studies were performed on Clematidis Radix et Rhizoma and its adulterant, the characteristics of pharmacognostic identification of Clematidis Radix et Rhizoma and its adulterant were described. DNA in samples was extracted, internal transcribed spacer (ITS) sequences were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and analyzed by ContigExpress. The ITS sequences was calculated the similarity according to the ITS sequences of National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. **Result:** Pharmacognostic identification characteristics of Clematidis Radix et Rhizoma and its adulterant were skin color and the existence of the stem nodes, etc; the difference in their microscopic characteristics of transverse section was the existence of the pith. The molecular pharmacognostic

[收稿日期] 20180207(002)

[基金项目] 国家中医药管理局2015年度中医药行业科研专项(2015468002-2)

[第一作者] 张雪,在读硕士,从事药用植物与分子生药学研究,E-mail:1192778854@qq.com

[通信作者] *刘春生,博士,教授,从事药用植物与分子生药学研究,Tel:010-84738624,E-mail:max_liucs@263.net

studies showed the adulterant of *Clematidis Radix et Rhizoma* was *Ardisiae japonicae* sourced from Myrsinaceae. **Conclusion:** This adulterant of *Clematidis Radix et Rhizoma* is the stem and rhizome of *A. japonicae*. *A. japonicae* differs from *Clematidis Radix et Rhizoma* in terms of composition and function, so we should strictly distinguish them in clinical application.

[Key words] *Clematidis Radix et Rhizoma*; adulterant; pharmacognosy; molecular pharmacognosy; *Ardisiae japonicae*; polymerase chain reaction

威灵仙为毛茛科植物威灵仙 *Clematis chinensis*, 棉团铁线莲 *C. hexapetala* 或东北铁线莲 *C. manshurica* 的干燥根和根茎^[1]。威灵仙为临床常用中药,具有祛风湿、通经络的功效,常用于治疗风湿痹痛、肢体麻木、筋脉拘挛、屈伸不利。研究报道及市场品种调查显示^[2-4],一些与威灵仙药材来源不同的混伪品,曾在不同地区作威灵仙用,但在基原、药性等方面与正品有一定的差异^[5-9]。前期实验收集了来自全国 8 个不同省份的威灵仙药材样品共 26 份,发现其中 11 份为威灵仙药材的一种伪品,性状一致,所占比例较大,本实验拟对该伪品进行生药学和分子生药学鉴别研究,并与威灵仙药材的基原之一威灵仙 *C. chinensis* 的生药学和分子生药学特征进行比较,为威灵仙药材的鉴别和用药安全提供依据。

市场上曾有玄参科植物草本威灵仙、显脉旋覆花、芍药须根、桃耳七等作威灵仙使用,对这些混伪品的鉴别集中在基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定等生药学研究方面;近年来则发展为对混伪品进行以 DNA 条形码鉴定为手段的分子生药学鉴别。然而生药学研究和分子生药学研究是一种互补关系,二者使用的手段有所不同,解决的关键问题和取得的效果也不尽相同^[10],要解决威灵仙复杂混伪品的鉴别问题,不同技术联用或从中选择几种手段配合使用才是更全面和更有效的办法。本实验拟根据性状、显微这两方面的生药学特征进行观察、比较和描述,对威灵仙及该伪品进行生药学研究,较为简便快速地对两者进行区分,总结两者的主要生药学鉴别特征,并在器官水平对伪品进行鉴定;同时,通过分子生药学研究方法^[11-12]将该伪品准确、客观地鉴定到种,结合生药学研究结果,最终确定该种威灵仙药材的伪品是紫金牛的茎及根茎。

1 材料

CX23 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),3K-15 型低温高速离心机(德国 Sigma 公司),JY300C 通用型电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司),DYCP-31E 型水平电泳槽(北京六一仪器厂),JS-

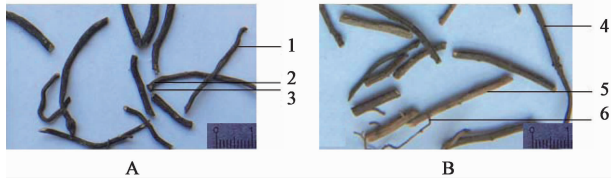
680B 型全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司),T100 Thermal Cycler 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),FMB50 型制冰机(上海比朗仪器制造有限公司),JA1103N 型精密电子天平(上海天平仪器有限公司),QL-901 型涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

威灵仙药材 1 份,从广东省的药材市场收集得到,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为威灵仙 *Clematis chinensis*;威灵仙药材的伪品 11 份,分别来自辽宁省、安徽省、河北省、广东省的药材市场。样品凭证均保存于北京中医药大学标本室。广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(批号 72612163),2 × Taq PCR MasterMix(批号 726285AC),dNTP Mixture(批号 726471CC)和 DNA Marker(BM2000 + 1.5k,批号 716084CC)均购于北京博迈德生物技术有限公司,引物合成及测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司北京测序部完成。

2 方法与结果

2.1 性状特征及比较 根据 2015 年版《中国药典》中关于威灵仙的性状描述,分别观察记录威灵仙^[13-14]及伪品^[15]的性状特征,并比较两者性状特征的区别,见图 1。结果发现伪品呈不规则的段,其中部分略呈扁圆柱形,稍卷曲或扭曲,表面略呈红棕色,可见细纵纹,有的具分支和互生叶痕;其质硬,易折断。该部分符合双子叶植物茎的结构特征,初步判断为茎。其余部分呈圆柱形,有节,疏生须根。须根为不定根,初步判断该部分为根茎。与威灵仙的主要区别在于伪品略呈扁圆柱形,或呈圆柱形,而威灵仙呈柱状;伪品表面呈红棕色,而威灵仙药材表面颜色黑褐色或棕黑色,有的皮部脱落,露出黄白色木部;伪品有的具分支和互生叶痕,而威灵仙无此特征;伪品中的根茎部分呈圆柱形,疏生须根。威灵仙根茎呈柱状,上端残留茎基;伪品气微,味微涩,而威灵仙气微,味淡。

2.2 横切面显微特征及比较 分别制作威灵仙及伪品的石蜡切片,在显微镜下观察其显微特征,描述威灵仙及伪品的根茎横切片特征,并比较两者的差

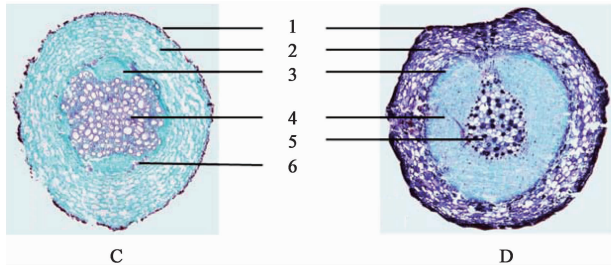


1. 根; 2. 根茎; 3. 茎基; 4. 茎; 5. 不定根

图 1 威灵仙(A)和伪品(B)的性状特征比较

Fig. 1 Comparison of characteristics of *Clematidis Radix et Rhizoma*(A) and this adulterant(B)

异,见图 2。观察伪品横切面显微特征,表皮细胞类长方形,细胞排列较为整齐、紧密,细胞壁增厚。皮层细胞类圆形,细胞排列疏松,外侧细胞可见草酸钙方晶。韧皮部狭窄。木质部细胞全部木化,导管大多数单行排列。具髓部,较宽广,内含有分泌腔。与威灵仙的主要区别为伪品皮层细胞类圆形,而威灵仙皮层宽,均为薄壁细胞,外皮层细胞切向延长;伪品韧皮部较窄,无石细胞,而威灵仙韧皮部外侧有石细胞;伪品髓部较大,具有分泌腔。而威灵仙木质部所占比例比皮部大,中央无髓。



1. 表皮; 2. 皮层; 3. 韧皮部; 4. 木质部; 5. 髓部; 6. 石细胞

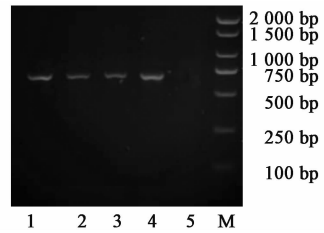
图 2 威灵仙(C)和伪品(D)的横切片显微特征

Fig. 2 Microscopical characteristics of transverse section of *Clematidis Radix et Rhizoma*(C) and this adulterant(D)

生药学研究发现,威灵仙与该伪品的生药学鉴别特征主要有外皮颜色以及有无茎节等;横切面显微特征主要区别为伪品有髓,威灵仙无髓。虽然通过“有无茎节、有无叶痕”等性状特征可区别根和茎,初步判断该伪品为茎及根茎部位,但由于药材及伪品经过加工运输,长短不一,有的皮部脱落,不能完全根据性状特征进行准确判断。结合横切面显微特征,威灵仙横切面无髓,伪品有髓,最终得以确定和验证,即伪品取材部位为茎和根茎。

2.3 DNA 提取及序列扩增 取威灵仙及伪品各约 0.2 g,置于预冷的研钵中,倒入液氮后迅速研磨成粉末。采用广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取样品的 DNA。以样品 DNA 为模板,以 P₁, P₄ 引物(P₁:5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3',

P₄:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')进行 PCR 扩增^[10-11]。反应体系为 50.0 μL,内含缓冲液 5.0 μL, dNTP Mixture 3.0 μL, Mg²⁺ 2.0 μL, P₁ 引物(浓度 5 μmol·L⁻¹)2.0 μL, P₄ 引物(浓度 5 μmol·L⁻¹)2.0 μL, DNA 模板 4.0 μL, Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, 双蒸水 31.5 μL。反应程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。威灵仙样品及伪品均各扩增 2 次。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,合格者送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,为保证测序的准确性,所有样本均采用双向测序,见图 3。结果发现电泳图条带清晰明亮,长度正确,说明 PCR 效果良好,可用于后续实验。



1, 2. 威灵仙样品; 3, 4. 伪品; 5. 空白; M. DNA Marker

图 3 威灵仙及伪品的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of *Clematidis Radix et Rhizoma* and this adulterant

2.4 序列拼接及内转录间隔区(ITS)序列数据分析 利用 ContigExpress 软件对测序得到的序列进行拼接及人工校对,去除低质量序列及引物区。根据 GenBank 中相似度最高物种的 ITS 序列边界,截取待鉴定样本的 ITS 序列。屈良鸽等^[16]通过对国际分子生物学数据库中的序列分析后,得出被子植物的大多数科属 ITS 序列的属间差异 9.6% ~ 28.8%, 种间差异 1.2% ~ 10.2%, 而种内的差异则 < 1%, 故以相似度 > 90% 作为属的溯源依据,以相似度 > 99% 作为种的溯源依据,通过相似度分析和 DNA 条形码溯源鉴定威灵仙药材及伪品的植物来源。测序得到的峰图良好,可用于下一步的分析。将拼接后截取好的威灵仙序列输入 GenBank 中进行 BLAST 比对,与威灵仙样品序列相似度 > 99% 的有 *C. chinensis* (AB775167.1) 和 *C. chinensis* (AB775174.1),验证结果可靠,表明分子生药学方法能够准确鉴别威灵仙正品。

威灵仙伪品拼接后截取的 ITS 序列相同,输入 GenBank 中进行 BLAST 比对,相似度 > 99% 的为 *Ardisia japonica* (JN645201.1, 99%) 和 *A. japonica* (FJ482143.1, 99%), 即与该伪品相似度最高的植

物为紫金牛科紫金牛属植物紫金牛 *A. japonica*, 该伪品的基原植物均为紫金牛。分子生药学方法将该伪品准确、客观地鉴定到种, 且伪品的性状、显微特征与紫金牛一致。表明分子生药学方法能够准确鉴别该伪品。紫金牛产于陕西及长江流域以南各省区, 为我国民间常用的中草药, 也是常见的花卉。紫金牛为小灌木或亚灌木, 近蔓生, 具匍匐生根的根茎; 直立茎长达 30 cm, 稀达 40 cm, 不分枝^[17]。综合对该伪品的生药学和分子生药学研究, 确定该种伪品为紫金牛的茎及根茎。紫金牛以干燥全草入药, 治肺结核、咯血、咳嗽、慢性气管炎效果很好, 与威灵仙药材的功能主治相差较大。

3 讨论

本研究通过生药学和分子生药学鉴别研究表明, 这种威灵仙伪品为紫金牛的茎及根茎, 生药学和分子生药学鉴别相结合实现了威灵仙与该伪品在性状、显微、分子 3 个层次的鉴别, 可为威灵仙及该伪品的准确、客观、快速鉴别提供实验依据。威灵仙在我国有悠久的临床应用历史, 用药广泛, 其药材质量好关系直接关系到临床用药的有效性及其安全性, 本实验发现的新伪品紫金牛在市场上所占比例很大, 且与威灵仙的来源、性味、归经、功能与主治不同, 药理疗效差别较大, 混用会严重影响用药安全。紫金牛与前人报道过的威灵仙伪品(如显脉旋复花、芍药须根、桃耳七等)相比, 与威灵仙的外观更为接近, 鉴别难度较大。本实验虽然准确鉴别出了威灵仙的该种伪品为紫金牛, 但是威灵仙的异物同名品多, 不同科属地方习用品作威灵仙使用的现象也较为普遍, 威灵仙的市场品种较为复杂, 规范威灵仙药材市场还需要进一步广泛的市场调查和研究。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 250-251.
[2] 王均理. 威灵仙及其伪品芍药须根的鉴别[J]. 现代

中药研究与实践, 2001, 15(1): 40.

[3] 彭菩本, 林怡如. 威灵仙伪品桃耳七[C]//中华中医药学会. 中国中医药学会建会 20 周年学术年会专辑: 1999 年卷. 北京: 中国学术期刊(光盘版)电子杂志社, 1999: 2.
[4] 徐涛, 杨永健, 赵汝能. 威灵仙的植物来源及主要伪品[J]. 兰州大学学报: 医学版, 1995, 21(1): 12-13.
[5] 赵阳, 梁丽珍, 李厚金, 等. 威灵仙的化学成分研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, 51(3): 63-67.
[6] 徐小云, 王云霞, 李智勇. 威灵仙化学成分和药理作用研究进展[J]. 现代中医药, 2003(4): 67-69.
[7] 李佳, 刘继永. 中药威灵仙的化学成分及药理作用研究进展[J]. 特产研究, 2011, 33(1): 67-71.
[8] 刘伟林, 杨东爱, 余胜民, 等. 矮地茶药理作用研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(12): 3002-3003.
[9] 靳志娟. 紫金牛属植物化学成分和药理作用的研究进展[J]. 实用医技杂志, 2008, 15(25): 3432-3436.
[10] 黄璐琦, 肖培根, 郭兰萍, 等. 分子生药学: 一门新兴的边缘学科[J]. 中国科学(C 辑: 生命科学), 2009, 39(12): 1101-1110.
[11] 许亮, 刘春生, 杨燕云, 等. DNA 条形码技术鉴定一种植物样品的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 127-129.
[12] de Vere N, Rich T C G, Trinder S A, et al. DNA Barcoding for Plants[M]. New York: Springer, 2015: 101-118.
[13] 黄颖雅. 威灵仙的原植物考查[J]. 广东药学, 2005, 15(4): 4-6.
[14] 李家实, 肖培根, 楼之岑. 中药威灵仙的原植物和生药学研究[J]. 药学学报, 1980, 15(5): 288-297.
[15] 田振华, 骆红梅, 何燕. 贵州紫金牛属药用植物的种类与分布[J]. 华西药学杂志, 1996, 11(3): 193-195.
[16] 屈良鹄, 陈月琴. 生物分子分类检索表——原理与方法[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(1): 1-6.
[17] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 第 58 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 90-91.

[责任编辑 刘德文]