

基于 DNA 条形码—产地—形态分析联用的巴西马钱属植物药 *QUINA* 基原鉴定研究

臧艺玫 顾选 余春霞 肖瑶 赵百孝 刘春生 马长华 韩丽

【摘要】 目的 通过 DNA 条形码—产地—形态分析联用的方法对巴西马钱属植物药 *QUINA* 进行基原鉴定研究,为这种药材的开发利用提供依据。**方法** 通过提取样品 DNA、PCR 扩增及双向测序,获得样品的内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)序列,利用 NCBI 数据库中的 BLAST 功能计算相似度,对其基原进行 DNA 条形码鉴定;根据其产地信息对 DNA 条形码鉴定结果进行筛选和分析;依据其形态特征验证鉴定结果。**结果** 本次收集的植物类药材 *QUINA* 来源于马钱科马钱属植物 *Strychnos pseudo quina* A. St. -Hil. 的根皮。**结论** DNA 条形码—产地—形态三者联用的方法可弥补单一鉴定方法的不足,能够快速、准确的对未知样品进行基原鉴定。

【关键词】 马钱属; ITS 序列; 基原鉴定

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.010

The variety identification of *QUINA* in Brazil based on a combined analysis of DNA barcoding-origin-morphology ZANG Yi-mei, GU Xuan, YU Chun-xia, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine. Beijing 100102, China

Corresponding author: ZHAO Bai-xiao, E-mail:baixiao100@gmail.com

【Abstract】 Objective To study the variety identification of *QUINA* of *Strychnos* Linn. with the combined analysis of DNA barcoding-origin-morphology and provide an evidence for the exploitation of this kind of herbal in Brazil. **Methods** ITS sequences were amplified by PCR from genomic DNA and

基金项目: 国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[臧艺玫(硕士研究生)、顾选、肖瑶、刘春生、马长华], 针灸推拿学院(赵百孝), 中医养生学研究所(韩丽); 北京华邈中药工程技术开发中心(顾选); 河南省药品审评认证中心(余春霞)

作者简介: 臧艺玫(1990-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 药用植物与分子生药学。E-mail: meiyee0810@sina.com

通讯作者: 赵百孝(1963-), 教授, 博士生导师。研究方向: 针灸推拿。E-mail: baixiao100@gmail.com

sequenced. , BLAST(basic local alignment search tool) in NCBI database was used to calculate the similarity of sequences to identify the variety of samples; then the DNA barcoding identification results were screened and analyzed in reference to its origin information; finally, the morphological characteristics of samples was used to verify the accuracy of identification. **Results** *QUINA* collected from market in Brazil was the root bark of *Strychnos pseudo quina* A. St. -Hil. **Conclusion** The combined analysis of DNA barcoding-origin-morphology could make up for the deficit of onefold identification method. It contributes to identifying the variety of unidentified samples quickly and accurately.

【Key words】 *Strychnos* Linn. ; ITS sequence; Variety identification

巴西蕴含丰富的植物资源^[1],其中许多植物具有药用价值^[2]。由于没有植物药药典,巴西植物药的品种鉴别主要依靠口授家传^[3],导致其药材市场伪品混杂。因此,建立一套规范化的基原鉴定方法对保证巴西植物药的用药安全具有重要意义。

随着分子生物学的发展,DNA 条形码技术为物种鉴定提供了新的依据,其具有准确、快速、能鉴别无背景信息物种的优点^[4-7],但由于存在相似度阈值等问题,仅依靠 DNA 条形码鉴定不能准确完成物种鉴定,还需结合该属物种在巴西的分布情况对数据库中的物种进行筛选,最终参照文献核对该物种的性状和显微特征,判断入药部位的合理性。

巴西将可以提取到奎宁成分的 29 种苦味植物药统称 *QUINA*^[8],但这些不同来源的植物药中其他的化学成分差异较大,药理作用也不甚相同,一旦混用将带来严重的安全隐患。作者在巴西市场收集药材样本时发现名为 *QUINA* 的药材,其基原可能为马钱属植物,但品种难以确定。本文尝试利用 DNA 条形码—产地—形态分析联用的方法对缺少背景信息的该马钱属植物药进行基原鉴定研究,为其安全、正确的使用提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

QUINA 药材 3 份,每份 200 g,2012 年 4 月购买于巴西隆城市场药材集散地。样品的凭证标本保存于北京中医药大学大学标本室。

1.2 试剂

广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京博迈德生物有限公司,批号:69632855);rTaq 酶(上海生工生物工程有限公司,批号:695671BE)、乙醇(北京化工厂,批号:1124120381060079);琼脂糖(BIOWEST,批号:142045);ddH₂O 等。

1.3 仪器

显微镜(OLYMPUS CX-21,中国);SY-601 超级

恒温水浴(天津欧诺仪器仪表有限公司);L-901 涡旋振荡仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);JA1103N 千分之一精密电子天平;SIGMA3K-15 低温高速离心机(SIGMA 公司);TECHNE TC-3000PCR 扩增仪,Bio-Rad 电泳仪,水平电泳槽(北京六一仪器厂);JS-680B 全自动凝胶成像分析仪(上海培清科技有限公司);GRANT 制冰机,超纯水制备系统;KQ5200E 型超声波清洗器;SANYO-80℃ 超低温冰箱(SANYO 公司);DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科学仪器有限公司)等。

1.4 DNA 提取和 PCR 扩增方法

取 3 份样品,观察形态,形态结果一致。每份样品取 40 mg 进行 DNA 提取。各份样本分别用液氮冷冻后研磨成细粉,按照广谱植物基因组 DNA 快速提取试剂盒操作步骤提取样品 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 纯度及完整性。采用内转录间隔区(internal transcribed spacer,ITS)序列通用引物对样品进行 PCR 扩增,ITS-R:5'-CGTAACAAGGTTTC-CGTAGGTGAA -3',ITS-F:5'-TTATTGATATGCTTA-AACTCAGCGGG -3'。PCR 扩增条件:50 μL 体系含 2×Taq PCR MasterMix 25 μL,ITS-R(5 μmol/L) 2.5 μL,ITS-F(5 μmol/L) 2.5 μL,DNA 模板 4 μL,ddH₂O 16 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 分钟,94℃ 变性 1 分钟,55℃ 退火 1 分钟,72℃ 延伸 1 分钟,35 个循环;72℃ 再延伸 10 分钟。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,条带单一明亮者即扩增成功。PCR 扩增产物经纯化后,送上海生工生物工程有限公司测序部测序。各样品均采用正向和反向测序,以保证测序的准确性。

1.5 DNA 条形码鉴定方法

利用 ContigExpress 软件对测序获得的正、反向序列进行拼接,以 TCGA/T 和 GACCC/TC 作为 ITS 序列边界截取 ITS 序列,然后利用相似度法分析序列。

根据 NCBI 中相似度搜索法(basic local alignment search tool,BLAST)功能,检索样品的 ITS

序列,本文以相似度 90% 以上为属的鉴定依据,以相似度 97% 以上的最高相似度物种为物种鉴定依据,获得鉴定结果。若 BLAST 比对后得到的序列相似度均在 97% 以下,则认为数据库中可能未注册该序列,此时,根据“基于 ITS 序列的鉴定方法”仅能鉴定到属水平;该属中未注册序列的物种可能为鉴定结果。

1.6 基于产地分析的鉴定方法

根据“基于 DNA 条形码鉴定方法”项下获得的科、属和种的鉴定结果,依据《巴西植物志》记载的巴西分布的该属植物物种信息,依次分析最高相似度物种的产地是否相符合,如果符合,则为产地鉴定结果,继续进行下一项分析;如果不符合,则分析第二高相似度物种,以此类推,分析直至相似度 97% 的物种。若相似度在 97% 以上的物种产地均与样品产地不相符合,则认为数据库未注册该样品序列,无法根据“基于产地分析的鉴定方法”准确鉴定到种水平。

1.7 基于性状分析的鉴定方法

根据“基于产地分析的鉴定方法”项下获得的鉴定结果,查询植物志(efloras)等数据库的形态信息,按照《中华人民共和国药典》(一部)中性状和显微鉴定的方法,核对性状特征和显微特征,进一步证实鉴定物种结果和入药部位。

2 结果

2.1 DNA 条形码分析鉴定结果

2.1.1 科属的鉴定 3 份样品的测序峰图良好,测序结果一致,选择一条序列用于后续分析。截取 ITS 片段后,经 BLAST 检索,样品与马钱科马钱属 *Strychnos* L. 植物相似度最高,相似度范围为 95% ~ 99%,与其他属相似度均低于 95%。因此,该样品来自马钱科马钱属 *Strychnos* L. 植物。

2.1.2 种的鉴定 经 BLAST 检索,相似度达到 97% 以上的物种有 *Strychnos pseudo quina* A. St. -Hil. (JF938028. 1, 99%)、*Strychnos ecuadoriensis* (JF937975. 1, 98%)、*Strychnos cogens* (JF937962. 1, 98%) 及 *Strychnos mitscherlichii* (JF938007. 1, 98%)。故上述植物可能为巴西植物药 *QUINA* 的基原,其中,最佳鉴定结果为 *Strychnos pseudoQuina* A. St. -Hil.。

2.2 基于产地分析的鉴定结果

巴西植物志记载马钱科马钱属共有 35 种植物,ITS 序列的最佳鉴定结果 *Strychnos pseudoQuina* A. St. -Hil. 在巴西分布^[8-9],因此,根据产地分析巴西植

物药 *Quina* 的基原为 *Strychnos pseudoQuina* A. St. -Hil.。

2.3 基于形态分析的鉴定结果

样品的性状特征如下:浅槽状,有的为不规则片状或块状。厚 1.0 ~ 10.0 mm。外表面红棕色或棕褐色,多刮去外层栓皮,具“龟裂状”浅沟纹,和“疙瘩状”突起,粉性;内表面偶见根痕,纤维性。质脆,易折断,断面多分为两层,内层棕黄色或浅棕红色,外层红棕色或棕褐色,有时两层分开。气微,味极苦,见图 1。可知本样品与马钱属植物性状特征较为符合,入药部位为根皮。



图 1 *QUINA* 的性状图

样品的粉末显微特征如下:粉末黄棕色;木栓细胞黄棕色,表面观多角形,侧面观呈栅栏状;石细胞类圆形、多角形、长方形或少数呈纺锤形,纹孔及孔沟明显;晶鞘纤维纤维束周围薄壁细胞中常含草酸钙方晶,形成晶鞘纤维,见图 2。

由于以上显微特征专属性不强,且缺少参考资料,无法根据显微特征对该样品基原进行准确鉴定。



1. 木栓细胞 2. 石细胞 3. 晶鞘纤维

图 2 *QUINA* 的显微图

3 讨论

DNA 条形码分子鉴定技术为植物药基原物种的鉴定提供了强有力的科技支撑,但也存在如下问题:由于生物进化机制的复杂性,如多倍化现

象,基因水平转移,基因渗入和物种谱系分选不完全等,经常造成物种树与基因树不一致,导致 DNA 条形码序列在一些物种间没有鉴别力^[10];一些物种序列尚未登录 NCBI 核酸数据库,因此通过分子鉴定技术仅能够鉴定到属,但不能准确鉴定到物种水平;一些物种没有准确的鉴定阈值且参比对照序列时常变化,导致鉴定标准难以统一;一些物种在 NCBI 核酸数据库中比对后会出现相似度在 99% 以上物种有两个甚至多个的情况,构建邻接树时则会出现不同物种聚为一支的现象,因而无法准确进行物种鉴定。综上所述,仅依靠 DNA 条形码技术还不能满足植物药溯源及鉴定的要求。产地适宜性是大部分药用植物的固有性质,不同物种在不同国家的分布有所不同,因此产地信息对植物药的基原鉴定起到了辅助作用;植物的形态特征,包括性状特征及显微特征,是判断入药部位的重要依据。先利用分子鉴定的方法对无背景信息的药材进行品种溯源,再结合该药材的产地及形态信息对分子鉴定结果进行筛选和验证,最后利用形态特征判断药材的入药部位,三种方法相互补充,弥补了单一鉴定方法的不足,能够快速、准确地对未知样品进行基原鉴定。

本研究结果表明,本次收集的巴西植物药 QUINA 来源于马钱科马钱属 *Strychnos pseudo quina* A. St. -Hil. 的根皮。在巴西, *Strychnos pseudo quina* A. St. -Hil. 的根皮一直是提取奎宁的原料之一,用以治疗发热、疟疾等症^[8]。因此,中国也可以此为依据,尝试在马钱属植物中提取奎宁。

2010 版《中国药典》收录的马钱属药材为马钱 *Strychnos nux-vomica* L. 的干燥成熟种子^[11]。马钱子的主要成分是单萜吲哚类生物碱,包括马钱子碱 (brucine)、伪马钱子碱 (pseudobrucine)、番木鳖碱 (strychnine)、4-羟基土的宁 (4-hydroxystrychnine) 等^[12-15]。药理研究显示,马钱子提取物具有肌松、中枢神经系统兴奋、镇痛、治疗风湿性关节炎等作用且疗效显著^[16-19]。*Strychnos pseudo quina* A. St. -Hil. 的根皮中也含有生物碱类^[8],具体的化学成分还鲜有报道,但已有研究表明,皮刺马钱 (*strychnos aculeata*)、里渥马钱 (*strychnos castelneana*) 等马钱属其他植物的根皮中也含有多种吲哚类生物碱,如黑马钱碱 (*nigritanins*)、裸籽土的宁 (*spermostrychnine*)、N-乙酰基异华采马钱碱 (*n-acetyl-isostrychnosplendine*)^[20]等,与马钱子的主要成分相

似。因此,可对 *Strychnos pseudo quina* A. St. -Hil. 和其他马钱属植物根皮提取物的化学成分及药理活性进行深入研究,以期扩大马钱属植物的药用资源。

参 考 文 献

- [1] 李雷鹏. 巴西主要药用植物资源及利用[J]. 东北林业大学学报, 2002, 30(2): 103-104.
- [2] 许利嘉, 肖伟, 马培, 等. 具开发前景的南美洲常用植物药简介[J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 84-90.
- [3] 顾逢祥. 中医中药在巴西[J]. 世界科学技术—中药现代化, 2002, 4(1): 67-68.
- [4] 裴英才, 陈步峰. 生物 DNA 条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能[J]. 生物多样性, 2013, 21(5): 616.
- [5] 王川易, 郭宝林, 肖培根. 中药分子鉴定方法评述[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(3): 237.
- [6] 蒋明, 周英巧, 李嵘嵘. 铁线莲属 8 种药用植物 ITS 序列分析[J]. 中植物药, 2011, 42(9): 1802-1806.
- [7] 程芳婷, 李忠虎, 刘春艳, 等. 地黄属植物的 DNA 条形码研究[J]. 植物科学学报, 2015, 33(1): 26-32.
- [8] Cosenza G P, Somavilla N S, Fagg C W, et al. Bitter plants used as substitute of Cinchona spp. (Quina) in Brazilian traditional medicine [J]. Journal of ethnopharmacology, 2013, 149(3): 790-796.
- [9] Andrade-Neto V F, Brandão M G L, Stehmann J R, et al. Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2003, 87(2): 253-256.
- [10] 黄璐琦, 袁媛, 袁庆军, 等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3663-3667.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 234.
- [12] 周玲, 孙汉斌, 邓旭坤, 等. 高效液相色谱法测定 3 种马钱属药材中土的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32(16): 1301-1302.
- [13] Galeffi C, Nicoletti M, Messana L, et al. 15-Hydroxystyridine, a new alkaloid from *Strychnos nux-vomica* L. [J]. Tetrahedron, 1979, 35(21): 2545-2549.
- [14] Baser K C, Bisset N G, Hylands P J. Protostrychnine, a new alkaloid from *Strychnos nux-vomica* [J]. Phytochemistry, 1979, 18(3): 512-514.
- [15] Rodriguez F, Bemadou J, Stanislas E. 3-Methoxyicajine: a new alkaloid from *Strychnos nux-vomica* [J]. Phytochemistry, 1979, 18(12): 2065-2068.
- [16] 马密霞, 胡文祥, 刘接卿, 等. 马钱子属植物的药理毒理作用及临床应用进展[J]. 中国医院药学杂志, 2007, 27(12): 1725-1727.
- [17] 殷武. 马钱子生物碱类成分镇痛作用研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2000.
- [18] 李明华, 张艳, 刘巨源. 马钱子碱对大鼠海马神经元钠通道的影响[J]. 新乡医学院学报, 2003, 6(20): 359-393.
- [19] 熊禄, 沙力. 沙海汶教授中医辨治假肥大型进行性肌营养不良症经验[J]. 环球中医药, 2014, 7(1): 50-51.
- [20] 苏中武. 马钱属植物的生物碱[J]. 国外医学药学分册, 1982(2): 113-116.

(收稿日期: 2015-08-18)

(本文编辑: 蒲晓田)