

基于 DNA 条形码—产地—形态分析联用的巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA*(积雪草)的生药学研究

顾选 李妍芃 崔秀梅 王娟 韩丽 赵百孝 刘春生 马长华 崔馨云

【摘要】 目的 对巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 进行生药学研究。方法 采用 DNA 条形码技术对巴西草药的叶片提取 DNA、扩增 ITS 序列、双向测序,采用相似度法进行物种鉴定,再结合产地信息和性状特征核对 DNA 条形码鉴定结果进行验证。结果 巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 与 NCBI 核酸数据库积雪草 ITS 序列达到最高相似度,相似度为 99%,鉴定其为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica*(L.) Urban。在地理分布上,巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 符合积雪草的分布特征;从形态分析上,样品与积雪草特征相符合。结论 基于 DNA 条形码—产地—形态分析的鉴定方法能够对巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 进行鉴定,鉴定该物种来源于伞形科植物积雪草 *Centella asiatica*(L.) Urban 的干燥全草。生药学研究能够为 *CENTELHA ASIÁTICA* 品种鉴定及质量标准研究提供依据。

【关键词】 巴西草药; 积雪草; 生药学; DNA 条形码

【中图分类号】 R284 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.005

The pharmaceutical research on Brazilian herb *CENTELHA ASIÁTICA*(*Centella asiatica*) based on a combined analysis of DNA barcoding-origin-morphology GU Xuan, LI Yan-peng, CUI Xiu-mei, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

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[李妍芃(硕士研究生)、王娟(硕士研究生)、刘春生、马长华、崔馨云(本科生)]; 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、崔秀梅)

作者简介: 顾选(1990-), 女, 硕士。研究方向: 药用植物与分子生药学。E-mail: guxuan123.love@163.com

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

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

【Abstract】 Objective To study Brazilian herbal *CENTELHA ASIÁTICA* from the perspective of biological pharmacy. **Methods** By applying DNA barcoding technology, total genomic DNA was isolated from the materials, and nuclear DNA ITS sequences were amplified and sequenced; DNA fragments were collated and matched by using ContingExpress. Similarity identification of BLAST analysis was performed. Next, the DNA bar code was verified by the information of plant origin and morphology. Families and genera were identified by Molecular identification. **Results** ITS sequence of Brazil herb *CENTELHA ASIÁTICA* and *Centella asiatica* (L.) Urban was 99% identical. The results can be solidified by their similarities in geographical distribution and morphological features. **Conclusion** Based on DNA barcoding-origin-morphological analysis Brazilian herbal *CENTELHA ASIÁTICA* was identified as *Centella asiatica* L. and biological pharmacy can provide the basis for the identification and quality standard of *CENTELHA ASIÁTICA* varieties.

【Key words】 Brazilian herb; *Centella asiatica*; Pharmacognosy; DNA barcoding

巴西植物药资源丰富,但基础研究普遍起步较晚^[1],直到 2008 年,巴西首部药用植物年鉴《植物疗法目录》出版,收录了 366 种药用植物信息。*CENTELHA ASIÁTICA* 为巴西民间常用的传统药物,被视为抗炎、抗肿瘤,增强免疫系统的良药。但是,由于 *CENTELHA ASIÁTICA* 不是国际通用名称,品种来源不详,原始资料记载模糊,导致对其开发、利用造成极大的不便,本研究对其品种进行鉴定及生药学研究,为其正本清源、开发利用提供依据。

基于 DNA 条形码-产地-形态分析联用的药材鉴定方法能够准确鉴定无背景信息的药材,并且不受季节与生长发育阶段的影响,弥补了传统的基原鉴定方法前往产地采样、时间周期长、耗费大等缺点^[2-3]。本研究采用此方法鉴定巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 的基原,并对其显微特征研究,为巴西草药的品种整理和质量标准研究奠定基础,为巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 的开发利用提供品种鉴定依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2012 年 4 月于巴西隆城药材集散地采购巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 3 批,每份 200 g,样品的凭证标本保存于北京中医药大学标本室。

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),Taq 酶等 PCR 试剂(上海生工生物工程有限公司,批号:695673BE)。

1.3 仪器

热循环仪(德国 Biometrer,型号:BS97MyCycler)、

凝胶成像系统(培清科技,型号:JS-680B)、高速冷冻离心机(西格玛,型号:SK15)、电子天平(德安特,型号:ES 120)、XK96 A 快速混匀器(北京维欣仪奥科技发展有限公司)、显微镜(OLYMPUS CX-21)。

1.4 引物和测序

实验中所用引物的合成以及胶回收产物的测序均由上海生工生物工程有限公司完成。

1.5 DNA 提取和 PCR 扩增方法

取样品,观察形态,形态结果一致。取叶片进行 DNA 提取。各份样本分别用液氮冷冻后研磨成细粉,采用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。采用 ITS 序列通用引物在热循环扩增仪上进行扩增,PCR 扩增条件:50 μL 体系含 2×Taq PCR MasterMix 25 μL,引物 P1 和 P4 各加 2.5 μL(5 μmol/L),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,40 个循环后,72 ℃ 延伸 10 分钟^[4]。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检视,均由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。

1.6 序列分析方法

利用 ContigExpress 软件对测序获得的正、反向序列进行拼接,根据 BLAST(相似性搜索法)所获相似度最高物种的同属 ITS 序列边界,截取待鉴定物种的 ITS 序列,然后利用相似度法分析序列。

1.7 基于 DNA 条形码的鉴定方法

根据 NCBI 中 BLAST 功能,检索 NCBI 数据库中注册的相似度最高的物种,按照相似度最高的物种截取 ITS 全长。再利用样品的 ITS 序列检索,根据前人属间差异为 9.6% ~ 28.8%、种间差异值为

1.2% ~ 10.2%^[5], 以及本课题组前期研究结果: 70% 以上的物种最小相似度在 97% 以上的研究结果。本文以相似度 90% 为属的鉴定依据, 以相似度 97% 的最高相似度物种为物种鉴定依据, 获得鉴定结果, 相似度在 97% 以下, 认为数据库中可能未注册该序列, 鉴定到属水平。

1.8 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, 则分析第二最高相似度物种, 以此类推。分析直至相似度 97% 的物种, 低于 97% 则认为数据库未注册该序列, 此时, 根据“基于 DNA 条形码鉴定方法”鉴定到属水平; 该属中未注册序列的物种可能为鉴定结果 (在确定鉴定结果之前, 对鉴定序列进行筛选, 该序列与相同物种相似度应不低于 97%, 与同属物种序列相似度应不低于 90%)。

1.9 基于形态分析的鉴定方法

根据“1.8”项下获得的鉴定结果, 查询巴西植物志的形态信息, 核对形态特征, 进一步证实鉴定物种结果和入药部位。

1.10 *CENTELHA ASIÁTICA* 的性状和显微研究

分析草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 的性状特征, 制作显微切片^[6], 描述其横切特征和粉末特征。

2 结果

2.1 基于 DNA 条形码的鉴定

2.1.1 科属的鉴定 样品的测序峰图良好, 3 份平行样测序结果一致, 选择一对序列用于后续分析。截取 ITS 片段后, 经过 NCBI 核酸数据库局部比对 BLAST 功能检索, 以 90% 作为属水平鉴定的阈值。经 BLAST 功能检索, 样品与伞形科积雪草属 *Centella* L. 植物相似度最高, 相似度范围为 93% ~ 99%, 与其他属相似度均低于 84%。因此, 鉴定该样品来源于伞形科积雪草属植物。

2.1.2 种的鉴定 根据 DNA 条形码物种鉴定指标, 相同物种相似度在 97% 以上, 最高相似度物种为鉴定结果; 当最高相似度物种相似度低于 97% 时, 认为数据未注册该序列, 鉴定到属水平。该样品与积雪草 *Centella asiatica* (GenBank 注册号 KM887373.1) 相似度最高, 相似度为 99%。因此, DNA 条形码鉴定

方法鉴定巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 的基原为伞形科植物积雪草。

2.2 基于产地分析的验证

查询巴西植物志中记载积雪草 *Centella asiatica* 植物, DNA 条形码鉴定结果符合植物地理分布特征。因此, 根据 DNA 条形码与产地核对结果鉴定巴西草药 *CENTELHA ASIÁTICA* 来源于伞形科积雪草属植物积雪草 *Centella asiatica*。

2.3 基于形态分析的验证

本品茎为黄棕色或棕褐色, 细长弯曲, 具细皱纵纹, 茎断面多中空或有髓。叶多破碎, 为绿色或灰绿色, 叶片可见网状叶脉及钝圆锯齿。根少见, 圆柱形, 淡黄色或灰黄色, 有纵皱纹, 如图 1。该样品特征与积雪草的特征相符合, 因此鉴定该样品为伞形科植物积雪草 *C. asiatica* (L.) Urban. 的干燥全草。



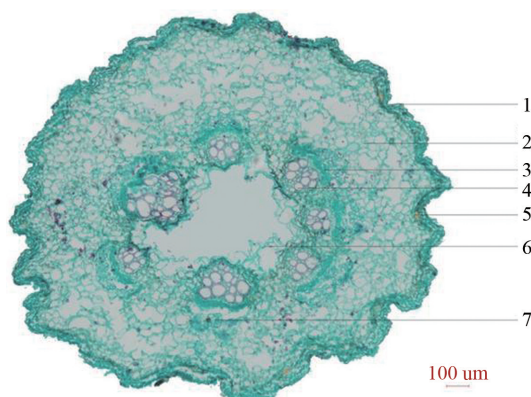
图 1 *CENTELHA ASIÁTICA* 的性状图

2.4 *CENTELHA ASIÁTICA* 的性状和显微研究

2.4.1 性状特征 本品经过加工, 加工品多为茎叶, 茎多切成长短不一的段, 为黄棕色或棕褐色, 细长弯曲, 具细皱纵纹, 茎断面多中空或有髓。叶多破碎, 为绿色或灰绿色, 叶片可见网状叶脉及钝圆锯齿。根少见, 圆柱形, 淡黄色或灰黄色, 有纵皱纹。体轻质脆, 气微而特异, 味甜特异微辛。

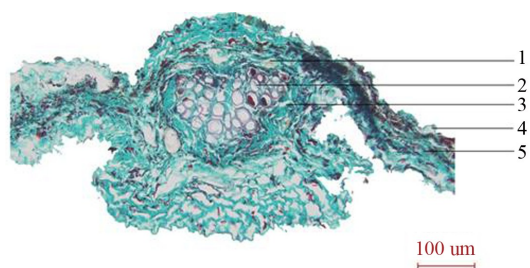
2.4.2 显微特征 显微横切面: 茎表皮细胞近方形。皮层为数列薄壁细胞, 约占茎横切面半径的 1/2, 外侧数列细胞的壁呈不均匀增厚。外韧型维管束 6 ~ 7 个, 排列成环, 韧皮部外侧为微木化的中柱鞘纤维, 木质部导管较发达, 束内形成层为 2 ~ 3 列细小细胞。髓部由较大的类圆形薄壁细胞组成, 或中空。皮层和射线中散在扁圆形的油管, 内填充黄色分泌物, 见图 2。

叶的上、下表皮细胞均为 1 列扁方形细胞, 排列紧密, 可见多细胞非腺毛。无栅栏组织和海绵组织之分, 叶肉细胞内有较多小维管束。主脉维管束外韧型, 木质部发达, 呈半月形, 近韧皮部可见油管, 见图 3。



1. 表皮; 2. 皮层; 3. 韧皮部; 4. 木质部;
5. 油管; 6. 髓; 7. 中柱鞘纤维

图 2 *CENTELHA ASIÁTICA* 的显微图



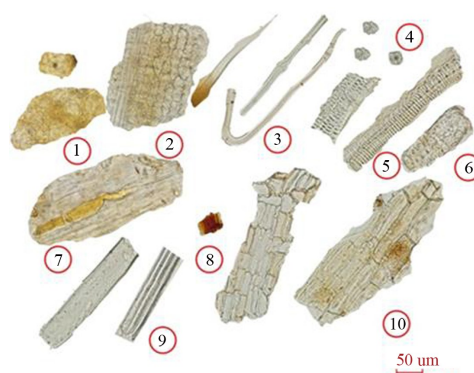
1. 油管 2. 木质部导管 3. 韧皮部 4. 表皮 5. 叶肉组织

图 3 *CENTELHA ASIÁTICA* 的叶(主脉)显微图

粉末灰色。(1)气孔不定式,副卫细胞形状多样。(2)叶表皮细胞类长方形,垂周壁波状弯曲。(3)非腺毛为多细胞非腺毛,细长,弯曲,常破碎,可见连接处多膨起。(4)草酸钙簇晶较大,多数散在。(5)导管为具缘纹孔导管、螺纹导管、网纹导管。(6)石细胞近圆形或长方形,腔较大,或有少量纹孔。(7)油管多含条形黄色分泌物,位于外皮层较厚的薄壁组织附近或维管束附近。(8)棕色块形状不一,略透明,具光泽。(9)纤维成束或散在,成束纤维较细,胞腔较小,散在纤维较大,胞腔较大,内具散在纹孔。(10)茎表皮细胞近长方形,排列整齐,壁较厚,微波状弯曲,见图 4。

3 讨论

积雪草是中国和巴西同时分布的物种,在中国,积雪草为伞形科植物积雪草 *Centella asiatica* (L.) Urban 的干燥全草,为 2010 版《中华人民共和国药典》(一部)收载品种,具有清热解毒、消肿利湿等功效,临床上用于跌打损伤、传染性肝炎、流行性脑脊髓膜炎、皮肤疾病等。近年来药理研究表明,积雪草具有抗氧化、促进伤口愈合、抗肿瘤、抗抑郁、增强记忆和中枢调节等作用^[7-8]。除了中国,积



1. 气孔; 2. 叶表皮细胞; 3. 非腺毛; 4. 簇晶; 5. 导管;
6. 石细胞; 7. 油管; 8. 棕色块; 9. 纤维; 10. 茎表皮细胞

图 4 *CENTELHA ASIÁTICA* 的显微图

雪草在泰国、印度等东南亚和南亚国家也被广泛应用。因此,深入研究积雪草及其资源具有重大意义。

与中国的积雪草相比,巴西积雪草的特征有一定的差别,从性状上看,巴西积雪草颜色较中国积雪草颜色深^[9];从显微上看,巴西积雪草的表皮细胞微波状,簇晶明显较多,方晶较少,中国产积雪草表皮细胞较平直,簇晶明显较少,方晶较多^[10]。药用植物的内、外部形态及化学成分等常由于遗传和环境因素而发生不同程度的变化。在巴西积雪草品种鉴定的基础上,对其成分、药效等进行研究,对扩大积雪草临床应用和药源具有重要价值。

参 考 文 献

- [1] 贾敏如. 国际传统药和天然药物[M]. 北京:中国中医药出版社,2006,211.
- [2] 顾选,张晓芹,宋晓娜,等. 基于 DNA 条形码-产地-形态联用的药材溯源新方法研究-以黑果枸杞一种伪品为例[J]. 中国中药杂志,2014,39(24):4759.
- [3] 韩建萍,李美妮,石林春,等. 砂仁及其混淆品的 ITS2 序列鉴定[J]. 环球中医药,2011,4(2):99.
- [4] 程小丽,廖彩丽,刘春生,等. 基于 NCBI 核酸数据库的紫荆皮混淆品种华中五味子的 DNA 鉴定研究[J]. 中国中药杂志,2012,37(17):2534.
- [5] 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):11.
- [6] 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,2010.
- [7] 李国栋,曹芳,吴志松,等. 周安平教授病症结合治疗硬皮病经验[J]. 环球中医药,2015,8(6):747.
- [8] 殷林虹. 积雪草的化学成分分析及药理作用研究进展[J]. 化工管理,2015,(6):48.
- [9] 陈瑶,秦路平,郑汉臣,等. 积雪草的资源分布和生药鉴别[J]. 中国中药杂志,2005,25(4):199.
- [10] 张宏意,田素英. 连钱草、积雪草、天胡荽的生药学比较研究[J]. 中医药导报,2008,14(2):78.

(收稿日期: 2015-08-22)

(本文编辑: 董历华)