

陕西产秦艽质量变异与遗传多样性研究

石张燕^{1,2,3}, 陈千良^{1,2,3*}, 赵宇玮^{1,2}, 孙文基^{2,3}, 赵桂仿^{1,2}

(1 西北大学 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 陕西 西安 710069; 2 西北大学生命科学学院, 陕西 西安 710069; 3 西北大学 陕西省生物医药重点实验室, 陕西 西安 710069)

摘要:目的 研究陕西省不同产地秦艽的质量差异, 对其遗传多样性进行检测, 探讨药材质量和其遗传基础的关系。方法 采用 HPLC 法测定不同产区秦艽药材中的指标成分, 进行 HPLC 指纹图谱分析, 计算并比较相似度。依据指纹图谱中的共有峰特征, 对不同药材样品进行聚类分析。对药材中提取的总 DNA 进行 RAPD 分析, 计算遗传距离并聚类。结果 陕西省不同产区秦艽药材的质量具有一定的差异, 不同产区秦艽药材也表现出一定的遗传多样性。陕西省不同产区的秦艽药材质量变异与遗传多样性之间不具有明显的相关性, 而表现出与产地的相关性。结论 产地对陕西秦艽药材质量的影响更为重要, 提示地道秦艽质量的形成可能属于生境主导型。

关键词: 秦艽; 质量变异; 遗传多样性

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)10-1705-05

Studies on quality variance and genetic diversity of *Gentianae Macrophyllae Radix* from different habitats in Shaanxi Province

SHI Zhang-yan^{1,2}, CHEN Qian-liang^{1,2,3}, ZHAO Yu-wei^{1,2}, SUN Wen-ji^{2,3}, ZHAO Gui-fang¹

(1. Key Laboratory of Resource Biology and Modern Biotechnology in Western China, Ministry of Education, Northwest University, Xi'an 710069, China; 2. College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China; 3. Biomedical Key Laboratory of Shaanxi Province, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Abstract: Objective The quality variance of *Gentianae Macrophyllae Radix* from different habitats of Shaanxi Province was studied, the genetic diversity was detected, and the relationship between quality and inheritance was discussed. **Methods** Using HPLC to measure effective components of *Gentianae Macrophyllae Radix* from different habitats, analyze HPLC fingerprint, and calculate and compare the similarity. Based on traits of common peaks in fingerprint, different samples of *Gentianae Macrophyllae Radix* were clustered. The total DNA from crude medicinal materials was analyzed by RAPD, the genetic distance was calculated and different samples were clustered at the base of the genetic distance. **Results** There were quality variance and genetic diversity at a certain degree with *Gentianae Macrophyllae Radix* from different habitats of Shaanxi Province. There was no apparent correlation between quality variance and genetic diversity of *Gentianae Macrophyllae Radix* from different habitats of Shaanxi Province, but there was correlation between quality variance and habitats. **Conclusion** The habitats are more important for the quality of *Gentianae Macrophyllae Radix* in Shaanxi Province. This suggests that the quality of *Gentianae Macrophyllae Radix* is mainly affected by the environment.

Key words: *Gentianae Macrophyllae Radix* from Shaanxi Province; quality variance; genetic diversity

秦艽是我国重要的传统中药之一, 始载于《神农本草经》, 主寒热邪气, 寒湿风痹, 肢节痛、下水、利小便。处于黄土高原腹地的陕西、甘肃两省是秦艽道地产区^[1]。在陕西省内, 关中西部靠近甘肃的宝鸡

地区陇县、太白县和凤县为秦艽的传统道地产区。由于长期以来过度采挖, 秦艽野生资源急剧减少。为解决供求矛盾, 秦艽的野生转家种研究已经开展多年, 并且取得了一定的成绩, 栽培品在商品中的比

①收稿日期: 2009-12-20

基金项目: 科技部“重大新药创制”科技重大专项(2008ZX09101-2-106); 陕西省教育厅专项科研计划项目(06JK178); 陕西省自然科学基金资助项目(SJ08ZT02-4)

作者简介: 石张燕(1975-), 女, 江苏如皋人, 助理研究员, 从事分子遗传学研究。

* 通讯作者 陈千良 T el: (029) 88302411 E-mail: cq1999@nwu.edu.cn

例逐渐升高。目前秦艽药材商品除传统产区外,有一些引种栽培产区也形成了一定的产量。影响中药材质量的因素较多,因此有必要对陕西省内不同地区的秦艽药材的质量变异进行比较。

种质遗传因素是决定中药材质量的内在重要因素。不同产区秦艽植物学上属于不同的居群,其遗传上应该具有一定的变异。随机扩增多态性 DNA 技术 (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 是目前广为应用的 DNA 多态检测技术^[2-6],在中药道地性研究中也广泛采用。本研究应用 RAPD 技术对陕西省不同产区的 5 个秦艽样品进行遗传多样性研究,从 DNA 水平上分析不同产地的秦艽,结合药材质量变异的比较进行相关性分析。研究结果可为秦艽种质的筛选提供依据,并在探索道地秦艽质量形成的基础上,进一步为优质秦艽药材的规范化生产以及秦艽的优良栽培品种育种积累数据。

1 材料和仪器

1.1 药材样品及处理:不同产区秦艽药材样品来源和时间见表 1。栽培秦艽药材在种植基地小区中、野生秦艽样品在分布区内随机挖取,根鲜质量不少于 1 kg。用湿润毛刷仔细刷净泥土,低温烘干。对于购买的干药材样品随机取出不少于 300 g。所有干燥后的药材样品,粉碎后过 3 号筛,置于干燥器中备用。所有样品经西北大学生命科学学院魏朔南教授鉴定为龙胆科植物大叶秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall. 的干燥根,标本存放于西北大学生命科学学院陕西省生物医药重点实验室。

表 1 秦艽药材样品来源及采集时间

Table 1 Source and collection time of *Gentiana macrophylla* Radix

编号	来源	采集时间	备注
1	凤县栽培秦艽	2008-07	购干药材,基地已有十几年栽培史
2	陇县野生秦艽	2008-08	采集
3	陇县栽培秦艽	2008-08	基地采集,基地已有近 30 年栽培史
4	太白县野生秦艽	2008-07	采集
5	柞水县栽培秦艽	2008-07	基地采集,引种栽培近 10 年

1.2 仪器与试剂:高效液相系统为 HITACHI 高效液相色谱仪(日本),7110 高效液相色谱泵,7420 紫外可见光检测器;指纹图谱用高效液相系统为 Waters Alliance 高效液相色谱仪(美国),2695 高效液相色谱泵、2487 紫外可见光检测器;Millipore 超纯水机(美国);KQ-500DE 型数控超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);Mastercycler PCR 扩增仪(德国 Eppendorf),DYY-6C 型电泳仪(北京

市六一仪器厂),DYC 电泳槽(北京六一仪器厂) GelDoc 型凝胶扫描成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

龙胆苦苷对照品购自中国药品生物制品检定所(批号 111607-200301),其余几种环烯醚萜苷对照品均为自制,经 MS、¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 等波谱手段鉴定。色谱纯甲醇和乙腈(TEDIA),其余试剂均为分析纯(西安化学试剂厂)。蛋白酶 K、Gold View I 型核酸染色试剂、2×Taq PCR Master Mix、DNA 相对分子质量标准购自天根生化科技(北京)有限公司,琼脂糖为西班牙 Biowest 公司原装,随机引物由上海英骏生物技术有限公司合成并分装。

2 方法与结果

2.1 药材中龙胆苦苷测定:测定方法参见文献报道^[7]。陕西 5 个产区秦艽药材中龙胆苦苷测定结果见表 2。

表 2 不同产区秦艽药材中龙胆苦苷($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Gentiopicroside in *Gentiana macrophylla* Radix from different habitats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

编号	样品	龙胆苦苷/%
1	凤县栽培秦艽	5.97 ± 0.121
2	陇县野生秦艽	8.64 ± 0.255
3	陇县栽培秦艽	7.58 ± 0.230
4	太白县野生秦艽	5.67 ± 0.034
5	柞水县栽培秦艽	5.60 ± 0.289

2.2 药材化学指纹图谱分析

2.2.1 色谱条件:色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);以乙腈-0.2% 冰醋酸水溶液为流动相,梯度洗脱见表 3;体积流量 1 mL/min;柱温 25 °C。

表 3 HPLC 指纹图谱洗脱梯度

Table 3 Gradient elution of HPLC fingerprint

时间/min	乙腈/%	0.2% 冰醋酸/%
0	5	95
25	16	84
30	28	72
35	39	61
39	50	50
44	5	95
60	5	95

2.2.2 检测波长选择:对比 214、254、270 nm 等几个波长检测的色谱图,其中 254 nm 检测所得色谱图信息最丰富。又因龙胆苦苷在秦艽中的量很高,远高于其他成分,在所考察的几个波长下其峰面积均是最大。而在 254 nm 下,其他成分的峰面积占整个图谱的总面积的比重还是相对最大的,所以确定检测波长为 254 nm。

2.2.3 对照品溶液的制备: 同秦艽药材中龙胆苦苷测定。

2.2.4 供试品溶液的制备: 取药材粉末约 0.5 g, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加入甲醇近刻度, 超声振荡 30 min, 取出放至室温, 用甲醇定容, 摇匀, 静置。微孔滤膜滤过作为供试品溶液。

2.2.5 测定: 精密吸取供试品溶液各 5 μ L 注入液相色谱仪测定。秦艽药材的高效液相色谱图见图 1。

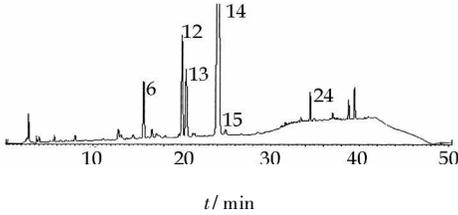


图 1 陇县野生秦艽高效液相色谱图

Fig 1 HPLC Chromatogram of wild *Gentiana Macrophyllae Radix* from Long County

2.2.6 方法学考察

精密度试验: 同一样品溶液连续 5 次指纹图谱分析, 所得色谱图中各峰相对保留时间 RSD 为 0.1% ~ 0.3%。用相似度评价软件计算相似度, 5 次的色谱图与共有模板的相似度均为 0.999。

稳定性试验: 同一样品溶液分别在 0、1、2、4、8、12、24 h 进行指纹图谱分析, 所得色谱图直观观察形貌完全一致。用相似度评价软件计算相似度, 与共有模板的相似度分别为 1.000、1.000、1.000、0.999、0.999、0.999。

重现性试验: 同一样品平行制备 5 份样品溶液, 进行指纹图谱分析, 所得色谱图直观观察形貌完全一致。用相似度评价软件计算相似度, 与共有模板的相似度分别为 0.998、0.999、0.998、0.998、0.999、0.999, 均大于或等于 0.998。

2.2.7 特征峰指认: 秦艽药材高效液相色谱图中, 单峰面积占总图谱面积 1% 以上的较大色谱峰共有 6 个(均为共有峰), 分别是 6、12、13、14、15、24 号峰。在指纹图谱的色谱条件下, 测定 6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷对照品, 并将它们的保留时间与指纹图谱中相应的色谱峰对照, 结果样品指纹图谱中共有峰中第 6、13、14、15 号峰分别与上述对照品吻合, 故指纹图谱中 6、13、14、15 号峰依次为 6'-O- β -D-葡萄糖基龙胆苦苷、獐牙菜苦苷、龙胆苦苷、獐牙菜苷。

2.2.8 相似度分析: 将色谱仪采集的样品指纹图谱数据导入国家药典委员会指纹图谱相似度分析软件(2004A 版), 进行相似度分析。经相似度软件相似

度计算生成对照图谱。5 个样品相似度最高为 1, 最低为 0.996。

2.2.9 指纹图谱数据聚类分析: 将高效液相工作站给出的数据导入指纹图谱相似度软件匹配后, 得出 32 个共有峰。从软件中获取 5 个样品的 32 个共有峰的峰面积数据。将这些数据导入 SPSS15.0 软件形成 5 \times 32 矩阵, 按照样品进行聚类分析, 以欧氏距离为测度, 软件给出聚类图, 见图 2。

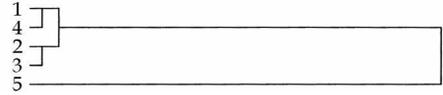


图 2 成分指纹图谱聚类图

Fig 2 Dendrogram of HPLC fingerprint

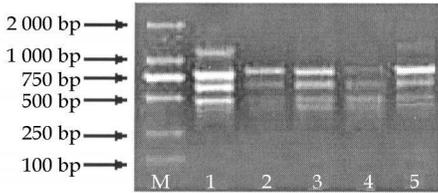
2.3 秦艽 RAPD 分析方法和结果

2.3.1 基因组总 DNA 的提取及检测: DNA 提取在参考文献^[5]的基础上略加改进。称取 0.2 g 药材样品粉末, 加液氮进一步研成极细粉末; 将粉末倒入 2 μ L Eppendorf 管, 加入 900 μ L 提取缓冲液(100 mmol/L Tris \cdot Cl, 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -巯基乙醇)和 10 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL), 55 $^{\circ}$ C 水浴 20 min; 加入 160 μ L KAc (5 mol/L), 置于 4 $^{\circ}$ C, 30 min, 12 000 \times g 离心 15 min; 取上清液, 加入等体积氯仿-异戊醇(24:1), 8 000 \times g 离心 10 min; 取上清液, 加入 2/3 体积的异丙醇, 置-20 $^{\circ}$ C, 30 min, 8 000 \times g 离心 10 min; 弃去上清液, 将沉淀用吸水纸吸干, 并用 70% 乙醇洗涤; 8 000 \times g 离心 5 min; 弃去上清液, 将沉淀吸干, 加入 50 μ L TE 充分溶解, 置 4 $^{\circ}$ C 备用。提取出的基因组 DNA 经紫外分光光度计检测并计算浓度, 用灭菌无离子水稀释成 10 ng/ μ L。

2.3.2 PCR 扩增: 扩增体系为 25 μ L, 其中含 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 引物(10 μ mol/L) 2.0 μ L, DNA 模板(10 ng/ μ L) 1.0 μ L, 用灭菌无离子水补足反应体积。扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后进行 45 个循环, 每一循环由 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 37 $^{\circ}$ C 复性 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 组成, 循环结束后在 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 7 min。

2.3.3 扩增产物检测: PCR 结束后, DNA 扩增产物用 1.0% 琼脂糖胶(含 Gold View I 型核酸染色剂)进行电泳, 电泳电压 5 V/cm, 45 min 后在凝胶扫描成像仪上检测。

用 40 条随机引物对 5 个产区的秦艽样品进行 RAPD 实验, 共有 9 条引物的扩增谱带具有多态性(图 3)。根据相对分子质量标准的迁移率, 统计同



1~ 5 泳道分别为凤县、陇县野生、陇县栽培、太白县和柞水样品;

引物序列为 5' GAGCCCTCCA 3'

1- 5 are samples from Feng Xian, Long Xian (wild), Long Xian (cultivated), T aibai Xian and Zhashui, respectively; primer sequence is 5' GAGCCCTCCA 3'

图 3 5 产区秦艽 RAPD 图谱

Fig 3 RAPD Chromatogram of samples from five habitats

一位点的条带,有带记为 1,无带记为 0,清晰且稳定的条带均记入统计结果。使用这 9 条引物共扩增出 43 条谱带,即检测了秦艽基因组中的 43 个位点。每条引物扩增出的谱带数在 4~ 6 条之间,平均为 4.8 条;多态性条带共计 32 条,占总带数的 74.42%;多态比率在 20.00% ~ 100%,平均为 72.78%。

采用 Lynch 的方法计算,得到不同产区秦艽的遗传相似性系数 (F)。在相似性系数的基础上进一步得到不同产区秦艽的遗传距离 (D) 矩阵,见表 4。

表 4 1~ 5 号秦艽样品的遗传距离

Table 4 Genetic distance of samples 1- 5

样品	1	2	3	4	5
1					
2	0.389 8				
3	0.151 5	0.333 3			
4	0.448 3	0.302 3	0.440 0		
5	0.242 4	0.254 9	0.172 4	0.360 0	

根据遗传距离矩阵,应用不加权算术平均组对法 (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 对不同产区秦艽之间的亲缘关系进行聚类分析,见图 4。

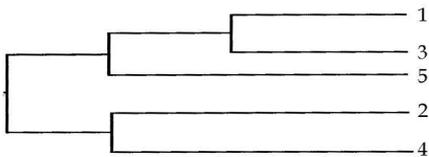


图 4 5 产区秦艽的亲缘关系聚类图

Fig 4 Dendrogram of sample relationship from five habitats

3 讨论

3.1 不同产区秦艽药材质量变异:从龙胆苦苷测定结果可以看出,不同产区的秦艽药材中龙胆苦苷的量有一定的差别。并且陇且秦艽药材无论是栽培还是野生,其量均明显高于其他产地药材。将陇县样

品与其他样品分为两组,进行方差分析,结果表明差异达到显著水平,说明陇县作为传统道地药材产区,是得到指标成分量的证据支持的。而且在各产地中,除陇县位于秦岭以北外,其他产地均在秦岭南坡。这提示药材龙胆苦苷的量与产地具有一定的相关性。另外,陕西其他产地药材的龙胆苦苷的量虽然低于陇县,但仍然高于多数外省所产药材^[9]。《中国药典》2005 年版中规定秦艽含龙胆苦苷应不低于 2%。因此,陕西各产区药材的量均远远超过药典标准。从有效成分的角度看,陕西产秦艽药材质量是较优的。

在药材化学成分指纹图谱分析中,所有样品化学指纹图谱相似度均在 0.996 以上,说明陕西不同产区的秦艽药材化学成分的整体相似程度是非常高的。单从相似度一个指标上不容易反映出彼此之间的差异。这也说明陕西各产区药材化学成分有较大程度的一致性。在指纹图谱数据聚类分析中可以看出凤县、陇县和太白县的 4 个样品(1、2、3、4)与柞水样品(5)分为两大类。在本实验的几个产区中,柞水是近年来引种栽培的新产区,位于陕西关中的东部,而陇县、太白和凤县均在关中西部接近甘肃的宝鸡地区,是老产区。所以指纹图谱数据聚类的两大类与产地关联很明显。进一步看,在第一大类中陇县野生和栽培样品(2 和 3)聚在一起,凤县和太白县样品(1 和 4)聚在一起。这 3 个产地中陇县在秦岭以北,而聚在一起太白和凤县则在秦岭南坡,所以在老产区样品聚类中也体现出与地域的较强相关性。

3.2 遗传多样性分析:陕西省 5 个产区秦艽的 RAPD 标记具有一定的多态性,说明用 RAPD 分析来区分和鉴定不同产地的秦艽是可行的。不同省份所产秦艽之间在 DNA 水平上的差异应当更为明显。本实验的聚类分析最终将陇县人工栽培样品(3)、凤县栽培样品(1)和柞水栽培样品(5)聚在一起,而将陇县野生样品(2)和太白县野生样品(4)聚在一起,这是由于凤县、柞水两地的秦艽均是从陇县人工栽培秦艽引种所致。但凤县、柞水与陇县栽培样品三者之间的 RAPD 图谱不尽相同,据此计算出的遗传距离分别为: $D_{\text{陇县-凤县}} = 0.515 5$, $D_{\text{陇县-柞水}} = 0.172 4$, $D_{\text{凤县-柞水}} = 0.242 4$,提示秦艽在引种后,在栽培过程中由于留种,人为地对群体进行了一定程度的选择。因此,经过一段时间发生了遗传上的分化。陇县野生样品与太白县野生样品相似程度较高,而与陇县人工栽培样品差异较大,提示秦艽在由野生转为家栽的过程中,也是由于人工选择等因素

而逐渐产生了一定的变异。综上所述,笔者认为 RAPD 聚类结果与不同产地秦艽的实际亲缘关系是比较吻合的。

3.3 秦艽药材质量变异与遗传多样性和产地的关系:目前对药材质量的评价一般是在对其有效成分或指标成分进行分析的基础上做出的。此类成分基本上都是药用植物的次生代谢产物。它们的合成与积累不仅与遗传有关,而且与环境有关,这是由于调控次生代谢的基因在表达时要受到环境的影响。本实验中陕西不同产区秦艽药材质量的变异情况与其遗传变异之间未显示出比较明显的关联,而与产地有较强的相关性。在几个产区中,环境条件差异较大,药材之间质量差异也较大,环境条件差异较小则质量比较接近。这些反映出与秦艽药材质量相关的基因在表达时可能受到不同产地环境的影响。在对道地药材质量形成机制的研究中,有学者认为主要的机制有:种质主导型、生境主导型、技术主导型、传媒主导型和多因子关联决定型^[9]。从本实验的研究

结果看,陕西产秦艽药材的质量影响因素中,环境条件应当是一个重要的因素,提示陕西产道地秦艽质量的形成机制可能属于生境主导型。

参考文献:

- [1] 权宜淑. 秦艽的本草学研究[J]. 西北药学杂志, 1997, 12(3): 113-115
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535
- [3] 石张燕, 蒙世杰, 丁长青. 随机扩增多态性 DNA 技术的原理与应用[J]. 西北大学学报, 2003, 33(专辑): 102-105
- [4] 南晓洁, 郝媛媛, 赵良贵, 等. 柴胡药材干根 DNA 提取及 RAPD 分析[J]. 中草药, 2009, 40(3): 447-451
- [5] 丁平, 刘瑾, 仰铁锤, 等. 巴戟天遗传多样性的 RAPD 研究[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1869-1872
- [6] 唐学芳, 蒋舜媛, 孙辉, 等. 川产羌活种质遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1387-1392
- [7] 陈千良, 孙文基. 不同产地秦艽中龙胆苦甙含量的初步考察[J]. 西北大学学报, 2002, 32(专辑): 219-221
- [8] 曹雅男, 李庆章, 孙岳, 等. 正品龙胆遗传多样性的 RAPD 及 ISSR 分析[J]. 中草药, 2005, 36(1): 100-103
- [9] 肖小河, 夏文娟, 陈善壖. 中国道地药材研究概论[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(6): 323-326

黄芪皂苷成分与环境因子的灰色关联度分析

王宗权, 贾继明*, 宋剑

(河北以岭医药研究院, 河北石家庄 050035)

摘要:目的 通过灰色关联度分析方法系统研究了黄芪皂苷成分与环境因子之间的关系。方法 采用 HPLC-ELSD 测定了黄芪药材中的黄芪甲苷、黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II, 应用灰色关联度公式进行数据分析。结果 灰色关联度分析表明影响黄芪甲苷的主导环境因子是年平均气温, 而影响黄芪皂苷 I 和黄芪皂苷 II 的主导环境因子是年平均无霜期。结论 为道地药材黄芪引种提供科学依据。

关键词:黄芪; 皂苷; 环境因子; 灰色关联度分析

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)10-1709-04

Analysis of grey correlation between saponins and environmental factors in *Astragali Radix*

WANG Zongquan, JIA Jieming, SONG Jian

(Hebei Yiling Medicine Institute, Shijiazhuang 050035, China)

Abstract: Objective To analyze the relationship between saponins of *Astragali Radix* and environmental factors by using grey correlation analysis. **Methods** To establish an HPLC-ELSD method for the determination of the astragaloside IV, astragaloside I, and astragaloside II in *Astragali Radix* from various habitats, the data were analyzed by using grey correlation. **Results** Grey correlation analysis showed the annual average temperature was the dominant climatic factor on the content of astragaloside IV. Annual

①收稿日期: 2010-03-03

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI08B04-09); 国际科技合作计划项目(2008DFA30810); “重大新药创新”科技重大专项(2009ZX09102-140)

作者简介:王宗权(1977-), 男, 黑龙江省双城市人, 工程师, 硕士, 长期从事中药创新药物开发工作。

Tel: (0311)85901304 E-mail: wzq03yjs@163.com

* 通讯作者 贾继明 Tel: (0311)85901304 E-mail: jjm_0451@163.com