

基于环介导等温扩增技术快速鉴定脉血康胶囊中水蛭成分

邓小丽¹, 李 叶¹, 卢梦瑶¹, 葛重宇², 郑晗雪¹, 沈玉萍¹, 杨春宾³, 孙小祥³,
夏国华^{1*}, 杨 欢^{1*}

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江南大学附属医院药学部, 江苏 无锡 214122; 3. 南京中医药大学附属镇江医院药剂科, 江苏 镇江 212003)

摘要: **目的** 基于环介导等温扩增 (LAMP) 技术鉴定脉血康胶囊中水蛭成分。**方法** 根据水蛭基原动物蚂蟥、水蛭及其伪品菲牛蛭、森林山蛭的 *COI* 基因序列差异, 设计特异性引物, 通过观察正伪品特异性引物的相应扩增产物是否产生荧光进行鉴定。**结果** 水蛭及其伪品 DNA 仅与相应的特异性引物结合并扩增, 显示出较高特异性。方法检出限达 1×10^{-3} ng/ μ L, 具有较高的灵敏度。4 批市售脉血康胶囊中, MXK1 和 MXK3 检出含蚂蟥、水蛭 DNA, 鉴定为正品; MXK2 和 MXK4 检出含蚂蟥、菲牛蛭 DNA, 鉴定为掺伪品。**结论** 该方法可快速、准确地对脉血康胶囊中水蛭成分真伪进行可视化鉴别, 有助于保障其临床用药的安全性及有效性。

关键词: 脉血康胶囊; 水蛭; 化学成分; 环介导等温扩增

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)07-2441-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.051

水蛭为蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *Whitmania acranulata* Whitman 的干燥全体, 具有破血通经、逐瘀消癥的功效^[1]。现代药理研究表明, 水蛭具有抗凝血^[2-4]、抗血栓^[5-7]、抗肿瘤^[8-10]、抗动脉粥样硬化^[11-12]、抗纤维化^[13-14]等作用, 临床上常用于治疗心脑血管疾病^[15-16]。近年来, 含水蛭成方制剂的需求旺盛^[17], 水蛭原材料价格攀升, 常见菲牛蛭 *Poecilobdella manillensis*、森林山蛭 *Haemadipsa sylvestris* 等伪品^[18], 对临床用药的安全性及有效性构成了较大威胁。脉血康胶囊是以水蛭为原料的单味制剂, 但原药材以粉末入药, 无法通过性状特征鉴定其真伪。此外, 基于 PCR 的分子鉴定技术或蛋白质标记技术耗时长且对设备要求高, 大大限制了其在中成药中动物药成分现场快速鉴定中的应用。

环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是一种新型核酸扩增技术, 在约 65 °C 等温条件下利用特异性引物和链置换 DNA 聚合酶, 使得 DNA 自我循环, 从而实现靶序列的扩增^[19], 其操作简便, 特异性强, 灵敏度高, 无需昂贵的专用设备, 扩增产物可通过肉眼观察白色沉淀或荧光进行判断, 有利于现场快速检测^[20-22]。本实验根据水蛭及其伪品基原的 *COI* 基因序列差异, 设计特异性引物, 开发基于 LAMP 的现场快速检测技术, 以期对脉血康胶囊中水蛭成分的真伪鉴定提供可靠的方法。

1 材料

1.1 仪器 Dual Star 双通道 pH/ISE 台式测量仪、NanoDrop 1000 核酸蛋白分析仪 (美国 Thermo 公司); TGL-16C 台式高速离心机 (上海安亭科学仪器厂); T100 PCR 仪、Power PAC 3000 水平电泳仪、Gel Doc™ EZ 型紫外凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); JY-SPFT 水平电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); T-MS 恒温混匀仪 (宁波拓普森科学仪器有限公司)。

1.2 试剂与药物 Tris-base、dNTP Mix、Taq PCR 预混液 (2×)、盐酸胍 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司]; Tris-平衡酚、SYBR Green I (北京索莱宝科技有限公司); Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase (英国 New England Biolabs 公司); SYBR Green qPCR Mix (上海碧云天生物技术有限公司); DNA Marker (南京生兴生物技术有限公司); 其余试剂均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

硬脂酸镁 (国药集团化学试剂有限公司); 药用淀粉 (武汉兴众诚科技有限公司)。脉血康胶囊共 4 批 (编号 MXK1 ~ MXK4, 批号 20190311、20200803、20210905、20211107)。

1.3 动物 蚂蟥 (编号 WP1 ~ WP8)、水蛭 (编号 HN1 ~ HN7)、菲牛蛭 (编号 PM1 ~ PM7) 及森林山蛭 (编号 HS1 ~ HS2) 均采集于我国多个省市, 具体见表 1, 经 *COI* 条形码鉴定为相应物种。

收稿日期: 2024-08-06

基金项目: 国家自然科学基金 (82173937); 江苏省药学会-奥赛康医院药学基金 (A202133); 镇江市科技计划项目 (SH2023014)

作者简介: 邓小丽 (1999—), 女, 硕士生, 研究方向为生药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: 771183327@qq.com

* 通信作者: 夏国华 (1977—), 男, 博士, 高级实验师, 研究方向为药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: xgh-78131@yeah.net

杨 欢 (1980—), 男, 博士, 教授, 研究方向为中药学。Tel: (0511) 85038451, E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn

表 1 水蛭及其伪品信息

基原	编号	产地	收集日期
蚂蟥 (<i>Whitmania pigra</i>)	WP1	浙江温州	2019 年 6 月
	WP2	山东临沂	2019 年 7 月
	WP3	江西南昌	2020 年 3 月
	WP4	湖南常德	2020 年 3 月
	WP5	湖南仙桃	2020 年 10 月
	WP6	山东济南	2021 年 4 月
	WP7	安徽亳州	2021 年 4 月
	WP8	江苏南京	2021 年 10 月
水蛭 (<i>Hirudo nipponica</i>)	HN1	山东济南	2019 年 6 月
	HN2	湖南邵阳	2019 年 6 月
	HN3	山东济宁	2020 年 10 月
	HN4	重庆	2021 年 4 月
	HN5	山东济宁	2021 年 8 月
	HN6	辽宁大连	2021 年 8 月
	HN7	天津	2021 年 10 月
菲牛蛭 (<i>Poecilobdella manillensis</i>)	PM1	广西玉林	2019 年 6 月
	PM2	广东广州	2020 年 1 月
	PM3	广东茂名	2020 年 3 月
	PM4	山东济南	2020 年 10 月
	PM5	广东中山	2021 年 4 月
	PM6	广西玉林	2021 年 4 月
	PM7	广东东莞	2021 年 5 月
森林山蛭 (<i>Haemadipsa sylvestris</i>)	HS1	广东云浮	2021 年 10 月
	HS2	广东云浮	2022 年 5 月

2 方法

2.1 引物设计 在 GenBank 数据库搜索并下载蚂蟥 *W. pigra* (登录号 EU304459.1)、水蛭 *H. nipponica* (登录号 KC667144.1)、菲牛蛭 *P. manillensis* (登录号 OQ076767.1)、森林山蛭 *H. sylvestris* (登录号 AF003266.1) 的线粒体基因序列,使用 PrimerExplorer 在线网站和 DNAMAN 8.0 软件设计并筛选得到特异性引物,序列见表 2。

2.2 DNA 溶液制备 采用滤纸条法^[23]提取 DNA。取水蛭粉末或脉血康胶囊内容物 5.0 mg,置于 2 mL 无菌 EP 管中,加入 500 μ L 缓冲液(含 1.5 mol/L 盐酸胍、50 mmol/L Tris、100 mmol/L NaCl、5 mmol/L EDTA 和 1% Tween-20),涡旋 5 s 混匀,将滤纸条的核酸吸附区浸入提取缓冲液中 5 s 以吸附 DNA,随后浸入 500 μ L 洗涤液(含 10 mmol/L Tris 和 0.1% Tween-20)中 5 s 以洗去杂质,最后浸入 20 μ L TE 溶液中以洗脱核酸,即得,测定浓度及 A_{260}/A_{280} , -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.3 LAMP 反应体系 含 2.5 μ L 10 $\times$ Isothermal Amplification Buffer、1.5 μ L 100 mmol/L $MgSO_4$ 、1 μ L Bst 2.0 WarmStart DNA 聚合酶(8 000 U/mL)、3.5 μ L 10 mmol/L dNTP Mix、2 μ L 引物(内引物 FIP/BIP 各 0.5 μ L,外引物 F3/B3 各 0.5 μ L)、1 μ L DNA 模板和 0.1 μ L 0.4 $\times$ SYBR Green I 染料,无菌双蒸水补足至 25 μ L。扩增条件为恒温扩增 40 min;引物组 PWP、PHN、PPM、PHS 特异性扩增温度分别为 57、57、61、62 $^{\circ}$ C;85 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 以灭活 Bst 酶。

表 2 特异性引物序列

物种	编号	序列(5'→3')
蚂蟥	PWP-FIP	TGGAAGAAGTAGAAAATGAAAA-AGCGTGTAGTCTTAGTGTCTGT
	PWP-BIP	GTTTACATTAGTAATTGGGTTACC-TTCCTAAACATAAACCTAGACATC
	PWP-F3	TTGAAAGGCTATTCAATCGTTAT
	PWP-B3	GGGTAATAAATGAGCAATAAAAGTC
水蛭	PHN-FIP	CGGACTTTTCAGTTGTGCACGTAATG-AATGATATACCGAAGAATGAGCC
	PHN-BIP	GAGCATATCCTTACAGTTGCCA-TGATAGTCGTCGAGGTATCC
	PHN-F3	TGTGAATCGCAAGAAGCT
	PHN-B3	TCACTCACAGTAGACTCTCA
菲牛蛭	PPM-FIP	AACGGGCTCTATTTTCCGGG-CAAAAGAGCTCTCTCCGTAT
	PPM-BIP	AATGGGAAAGCCACTCTCTTTC-CAATTGCGCAACTGTAAGG
	PPM-F3	CCATGTGTGCAATATGAATCC
	PPM-B3	TTCCACAGAGAAAGTGTC
森林山蛭	PHS-FIP	GCCAAATGCAAGGAAAAAATAGCTA-CATTAGCAGATAATATGGGGC
	PHS-BIP	TGGAGCATCTTCAATTCTAGGATCA-ATCGATCTAGTCTTATTTCCAGG
	PHS-F3	CAGGTGAACTATTTACCTCTC
	PHS-B3	GGATTGTAGTAATAGCAACTGAT

2.4 特异性试验及灵敏度试验 水蛭及其伪品按“2.2”项下方法提取 DNA,在“2.3”项条件下扩增,考察方法特异性。提取的 DNA 先用 TE 溶液稀释至 1 ng/ μ L,然后依次稀释至 1 $\times$ 10⁻¹、1 $\times$ 10⁻²、1 $\times$ 10⁻³ ng/ μ L,在“2.3”项条件下扩增,考察方法灵敏度。所有扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分析,并在 254 nm 紫外光下观察反应液荧光。

2.5 脉血康胶囊及其伪品制剂、掺伪制剂制备 将活体水蛭洗净,-20 $^{\circ}$ C 冷冻,50 $^{\circ}$ C 以下干燥,粉碎。将 230 g 水蛭粉

末、16 g 淀粉和 4 g 硬脂酸镁混合,过 100 目筛,填充进 1 号肠溶胶囊壳,制得 1 000 粒胶囊,每个胶囊内容物重 0.25 g。将水蛭替换成伪品,同法制备伪品制剂、不同比例掺伪制剂,具体见表 3。

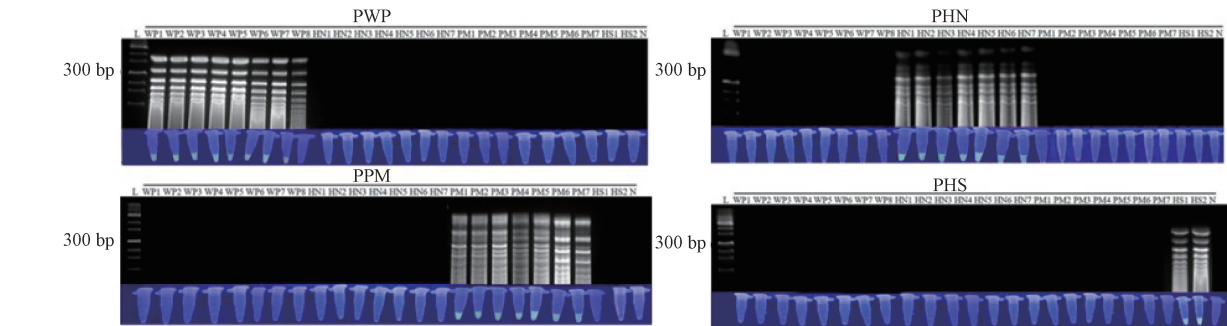
2.6 方法适用性考察 取“2.5”项下脉血康胶囊及其伪品制剂、掺伪制剂,按“2.2”项下方法提取 DNA,在“2.3”项条件下扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后分析条带,于 254 nm 紫外光下观察反应液荧光强度,考察方

表 3 脉血康胶囊及伪品制剂、掺伪制剂信息

制剂	编号	组成	比例
脉血康胶囊	MW1~MW5	蚂蟥	—
	MH1~MH5	水蛭	—
伪品制剂	MP1~MP5	菲牛蛭	—
	MS1~MS5	森林山蛭	—
不同比例掺伪制剂	MC1~MC5	蚂蟥、菲牛蛭	9：1、7：3、1：1、3：7、1：9
	MC6~MC10	蚂蟥、森林山蛭	9：1、7：3、1：1、3：7、1：9
	MC11~MC15	水蛭、菲牛蛭	9：1、7：3、1：1、3：7、1：9
	MC16~MC20	水蛭、森林山蛭	9：1、7：3、1：1、3：7、1：9

法适用性。

2.7 市售脉血康胶囊检测 取 4 批样品（编号 MXK1~MXK4），按“2.2”项下方法提取 DNA，在“2.3”项条件下扩增，扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后分析条带，于 254 nm 紫外光下观察反应液的荧光强度。



注：L 为 DNA Ladder，WP1~WP8 为蚂蟥，HN1~HN7 为水蛭，PM1~PM7 为菲牛蛭，HS1~HS2 为森林山蛭，N 为空白对照。

图 1 LAMP 扩增特异性试验结果

3.2 灵敏度试验 如图 2 所示，当样品 DNA 质量浓度达到 1×10^{-3} ng/ μ L 及以上时，通过 LAMP 扩增可观察到明显的条带，在紫外灯照射下呈现出明显的荧光。因此，以 4 组特异性引物进行 LAMP 扩增的检测限均为 1×10^{-3} ng/ μ L，表明该方法具有很高的灵敏度。

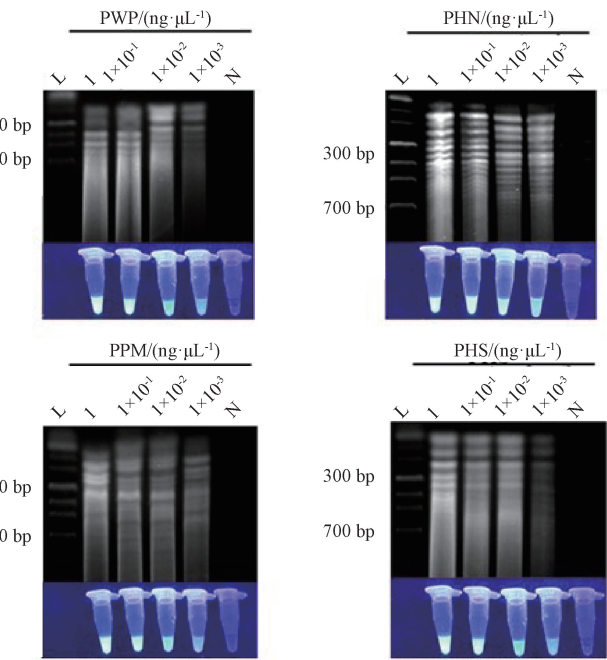
3.3 方法适用性考察 由图 3 可知，含不同基原水蛭的自制正伪品制剂经相应引物组扩增后，均可观察到清晰的条带，在紫外灯照射下显示出明亮的荧光，同时空白对照和其他物种均未检测到扩增信号，表明该方法具有很高的特异性。

3.4 掺伪制剂检测 由图 4 可知，掺伪制剂经相应引物组扩增后均可观察到清晰的条带，并显示出明亮的荧光，伪品的掺杂并未影响正品水蛭的检测，表明所建立的 LAMP 扩增体系适用于掺伪制剂中不同基原水蛭的鉴定。

3.5 市售脉血康胶囊检测 由图 5 可知，4 批市售脉血康胶囊 DNA 用引物 PWP 进行扩增后，均观察到条带，在紫外光照射下显示出荧光，表明均含有正品；MXK3 经特异性引物 PHN 扩增后，检出正品；MXK2 和 MXK4 经特异性引物 PPM 扩增后，检出伪品菲牛蛭；4 批样品中均未检出伪品森林山蛭。综上所述，MXK1 和 MXK3 为正品，MXK2

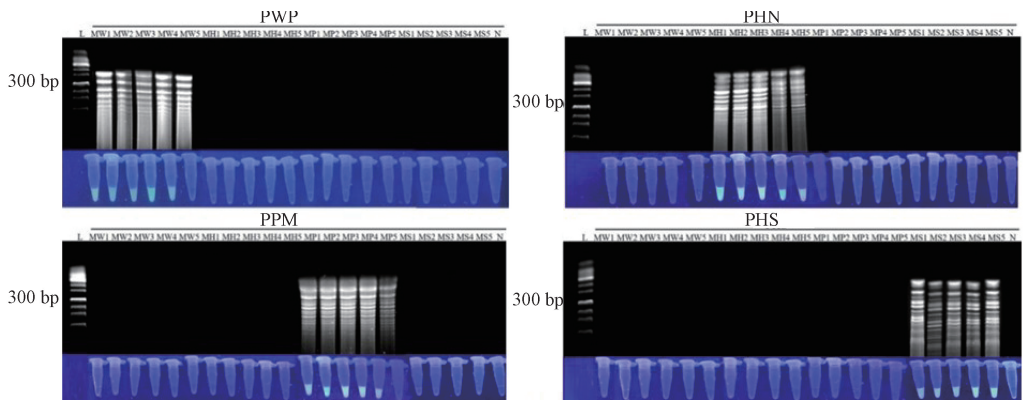
3 结果

3.1 特异性试验 由图 1 可知，4 组引物与相应物种不同批次的 DNA 样品扩增后，均可观察到清晰的条带，在紫外灯照射下显示出明亮的荧光；空白对照和其他物种均未检测到扩增信号，表明该方法特异性良好，适用于水蛭及其伪品的鉴别。



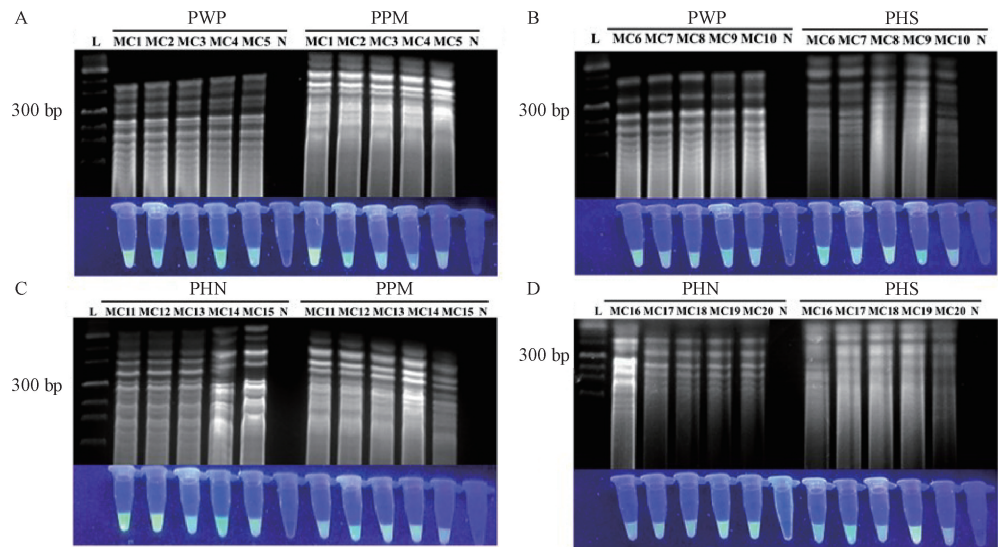
注：L 为 DNA Ladder，N 为空白对照。

图 2 LAMP 扩增灵敏度试验结果



注：L 为 DNA Ladder，MW1~MW5 为自制脉血康胶囊（蚂蟥），MH1~MH5 为自制脉血康胶囊（水蛭），MP1~MP5 为自制伪品制剂（菲牛蛭），MS1~MS5 为自制伪品制剂（森林山蛭），N 为空白对照。

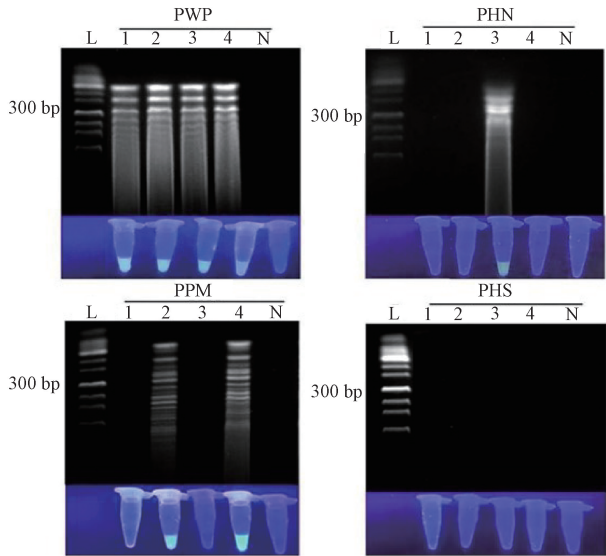
图 3 自制脉血康胶囊及其伪品制剂检测结果



注：A 为蚂蟥和菲牛蛭掺伪制剂，B 为蚂蟥和森林山蛭掺伪制剂，C 为水蛭和菲牛蛭掺伪制剂，D 为水蛭和森林山蛭掺伪制剂，L 为 DNA Ladder，N 为空白对照。

图 4 自制掺伪脉血康胶囊检测结果

和 MXK4 为菲牛蛭掺伪品。



注：L 为 DNA Ladder，1~4 为 MXK 1~4，N 为空白对照。

图 5 市售脉血康胶囊检测结果

4 讨论与结论

本实验根据水蛭及其伪品基原的 *COI* 基因序列差异设计特异性引物，并采用滤纸条法快速提取目标 DNA，建立 LAMP 关键检测技术，具有较高的特异性和灵敏度。在 4 批市售脉血康胶囊中，2 批检出蚂蟥、水蛭 DNA，鉴定为正品；2 批检出蚂蟥、菲牛蛭 DNA，鉴定为掺伪品，表明该方法能够快速、特异地对脉血康胶囊中水蛭成分的真伪进行可视化鉴别，为其他中成药中动物药饮片的专属性鉴定提供了新思路。

中药成方制剂组成复杂，所含饮片常以粉末入药，鉴定难度较大，尤其是含动物药者，缺乏专属鉴定手段。LAMP 技术能够在等温条件下短时间内进行核酸扩增，无需借助精密扩增设备对模板 DNA 进行反复热变性，可实现目标 DNA 的 1×10^9 倍扩增，通过观察荧光即可检识所含中药真伪，在中药鉴定方面具有诸多优势，展现出较好的发展前景。本实验利用 LAMP 技术对脉血康胶囊中水蛭成分进行真伪鉴定，后续将进一步开展研究，以期实现成方制剂中多种饮片成分的现场快速鉴定，更好地满足中成药检

验的实际需求。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：85-86.

[2] Zheng X B, Li J, Chen Z W, *et al.* Purification and characterization of an anticoagulant oligopeptide from *Whitmania pigra* Whitman[J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11 (43) : 444-448.

[3] Huang Q Y, Gao Q X, Chai X, *et al.* A novel thrombin inhibitory peptide discovered from leech using affinity chromatography combined with ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectroscopy[J]. *J Chromatogr B*, 2020, 1151: 122153.

[4] 瞿新艳. 水蛭的抗凝血作用研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(13): 1582-1583.

[5] Liu X, Wang C H, Ding X, *et al.* A novel selective inhibitor to thrombin-induced platelet aggregation purified from the leech *Whitmania pigra*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 473(1): 349-354.

[6] Yao X L, Liu H, Li P, *et al.* Aqueous extract of *Whitmania pigra* Whitman alleviates thrombus burden *via* Sirtuin 1/NF-κB pathway[J]. *J Surg Res*, 2020, 245(1): 441-452.

[7] 张紫月. 宽体金线蛭抗血栓活性成分研究[D]. 广州：暨南大学，2022.

[8] 李小菊, 卢宏达, 陈卫群, 等. 水蛭抑制肿瘤血管生成的作用及其机制[J]. 肿瘤防治研究, 2013, 40(1): 46-50.

[9] 肖移生, 侯吉华, 廖夫生, 等. 水蛭提取物对 HL-60 细胞增殖与分化的影响[J]. 江西中医药, 2014, 45(9): 32-34.

[10] 张广美, 姜 梅. 水蛭抗肿瘤作用探讨[J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(11): 2257-2258.

[11] Hu B, Xu L X, Li Y, *et al.* A peptide inhibitor of macrophage migration in atherosclerosis purified from the leech *Whitmania pigra*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112723.

[12] 韩文博, 孙爱军, 孟丽君, 等. 水蛭抗动脉粥样硬化作用研究进展[J]. 天津中医药, 2019, 36(7): 724-727.

[13] Wang C H, Pandey S, Sivalingam K, *et al.* Leech extract: a candidate cardioprotective against hypertension-induced cardiac hypertrophy and fibrosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113346.

[14] 王家兴, 任 桐. 水蛭及其活性成分治疗脏器纤维化研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(5): 213-216.

[15] 黄秋阳, 冷 静, 甘奇超, 等. 水蛭及其制剂在心脑血管疾病中的应用[J]. 中成药, 2019, 41(8): 1915-1920.

[16] 方心怡, 吴浩然, 丁齐又, 等. 破血逐瘀通络治法的临床应用概况[J]. 中成药, 2021, 43(9): 2448-2452.

[17] 刘晓帆, 刘春生, 杨瑶琨, 等. 基于 COI 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.

[18] 卢富华. 中药材水蛭市场调查及 DNA 分子鉴定研究[D]. 北京：北京协和医学院，2022.

[19] Tomita N, Mori Y, Kanda H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products[J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(5): 877-882.

[20] 石 磊, 王 曼, 时国强, 等. 环介导等温扩增技术研究进展[J]. 河北大学学报 (自然科学版), 2021, 41(5): 565-571.

[21] Li M, Wong Y L, Jiang L L, *et al.* Application of novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid authentication of the herbal tea ingredient *Hedyotis diffusa* Willd[J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2522-2525.

[22] 胡超逸, 邓 犇, 张景景, 等. 基于可视化环介导等温扩增技术快速检测中药材蜈蚣真伪[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2022, 24(4): 1459-1465.

[23] 杨 璐, 吴文如, 付 菲, 等. 新型快速中药材 DNA 提取方法的探索与应用[J] 中草药, 2019, 50(2): 502-509.