

應用Nested PCR-DNA定序方法鑑定蔓荊子藥材及其製劑

呂康祖 謝詠筌 李蕙君 劉宜祝 施養志 羅吉方

食品藥物管理局研究檢驗組

摘要

蔓荊子基原為馬鞭草科(Verbenaceae)植物單葉蔓荊[*Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. (*Vitex rotundifolia* L. f., *V. ovata* Thunb.)]或蔓荊(*Vitex trifolia* L.)之乾燥成熟果實，其常見誤用藥材為黃荊子，為蔓荊同屬植物黃荊(*Vitex negundo* L.)之乾燥成熟果實，本研究藉由分析ITS (internal transcribed spacer)基因標記的DNA，建立Nested PCR-DNA定序方法。結果顯示，56件藥材及10件製劑檢體中，52件藥材及9件製劑鑑定為單葉蔓荊，其餘檢體應為*Vitex*屬植物藥材誤用，同時建立蔓荊子藥材及其製劑Nested PCR-DNA定序方法。

關鍵詞：黃芩、Nested PCR、DNA定序、鑑定

前言

依據中華中藥典記載，本品為馬鞭草科(Verbenaceae)植物單葉蔓荊[*Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. (*Vitex rotundifolia* L. f., *V. ovata* Thunb.)]或蔓荊(*Vitex trifolia* L.)之乾燥成熟果實。單葉蔓荊主產於中國山東、江西、浙江、福建等省；三葉蔓荊主產於廣東、廣西等省區。性味辛、苦，微寒。在方劑的使用上，與黃耆、黨參、白芍等同用，治清陽不升，目生翳障，耳鳴耳聾等症，如益氣聰明湯；與羌活、獨活、川芎、防風等同用，治風濕痺痛，如羌活勝濕湯。在現代醫學的研究上，論文刊載的藥理作用有：具有血管保護活性⁽¹⁾、抑制氣喘之發炎反應^(2,3)、抑制腦垂體細胞之泌乳激素釋放⁽⁴⁾、抑制人類肺泡表皮細胞之發炎基因表現⁽⁵⁾、具有退熱劑效用⁽⁶⁾、抑制真菌之病原菌生長⁽⁷⁾、抑制嗜鹼性白血球細胞之組織胺釋放⁽⁸⁾、抗菌⁽⁹⁾、氣管解痙之活性⁽¹⁰⁾等等。

蔓荊子常見的誤用藥材為黃荊子，為蔓荊同屬植物黃荊(*Vitex negundo* L.)之乾燥成熟果實。在

本研究中，同時收集有黃荊子及本地所採集的蔓荊子藥材，與向中藥廠及全省北中南各地之中藥房價購之蔓荊子藥材檢體，進行DNA標記序列的比較分析，也收集標示含有蔓荊子藥材的中藥製劑，以建立中藥製劑中蔓荊子藥材的鑑定方法。

材料與方法

一、材料

(一)檢體

1. 藥材檢體：共56件，包括標本室3件、高雄原生植物園採集1件、中藥廠及中藥房價購51件，以及誤用藥材黃荊子1件。
2. 製劑檢體：共10件，為6種方劑包括1種單方及5種複方。

(二)試藥

1. 一般化學藥品：購自Sigma (St. Louis, MO, USA)、Merck (Darmstadt, Germany)、Amresco (OH, USA)
2. PCR純化套組：GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit購自GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)。

3. DNA聚合反應試劑：PCR Master Mix 5X (Taq polymerase 1.25U，dNTP 200 mM，reaction buffer)購自GENEMARK (Bio Basic, Canada)。
4. 引子：購自百力(臺灣)：VtF (5'-TCGAAACCTGCAAAGCAGAC-3')、VtR3 (5'-CGAGTTGAGATCA ACCACCA-3')、VtF4 (5'-AACACGTG CTTAACCGCAAC-3')及VtR4 (5'-G CGTTCAAAGACTCGATGGT-3')。
5. 瓊脂膠體：Agarose B Low EEO購自 GENEMARK (Bio Basic, Canada)
6. 100 bp ladder marker及6倍載入膠片緩衝液：GENEMARK (Bio Basic, Canada)
7. Exo-SAP IT套組：購自USB (Cleveland, OH, USA)
8. BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, USA)
9. BigDye Xterminator Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, USA)

(三)器材

1. 迷你電泳槽及鑄膠器(Mupid II, Cosmo Bio, Chuo-Ku, Tokyo, Japan)
2. 聚合酶連鎖反應器(Gradient Palm-cycler, Corbett Research Co., Australia and Astec PC320, Astec株式會社, Japan)
3. 影像系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, UK)
4. 自動定序儀自動定序儀(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)

二、方法

(一)DNA萃取與純化

DNA萃取與純化方法是依照本組已發表的論文⁽¹¹⁾的方法進行，將檢體藥材及製劑檢體磨碎或切碎，秤取100 mg置於2 mL微量離心管中，加入1 mL之lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 1% N-lauroyl sarcosine sodium salt, and 1 mg/mL proteinase

K)，56°C水浴1小時。加入與溶液等體積之phenol：chloroform：isoamyl alcohol (25：1；v/v/v)，混合萃取，以12000 x g離心5分鐘。離心後取水層，加入65°C預熱的CTAB-NaCl溶液(10% hexadecyltrimethylammonium bromide in 0.7 M NaCl)，使CTAB濃度大於1%，加入NaCl溶液使濃度大於0.7 M，混合後置於65°C水浴15分鐘，加入等體積之chloroform：isoamyl alcohol (24：1；v/v)，混合萃取，以12000 x g離心5分鐘。離心後取水層，加入0.7倍體積之isopropanol及1/10倍體積之3 M sodium acetate_(aq)，以12000 x g離心5分鐘。離心後倒去上清液，使沉澱物風乾後，加入50-100 mL之無菌水溶解。以PCR純化套組純化檢體DNA後，DNA溶液供Nested PCR之用。

(二)Nested PCR

藥材及製劑均取4 mL DNA溶液作模板，25 mM primer VtF、VtR3各0.5 mL進行第一次PCR，條件為94°C-30 sec，56°C-30 sec，72°C-30 sec共30 cycles。取第一次PCR產物取4 mL作模板，primer VtF4、VtR4各0.5 mL進行第二次PCR，PCR條件為94°C-30 sec，60°C-30 sec，72°C-30 sec共30 cycles。

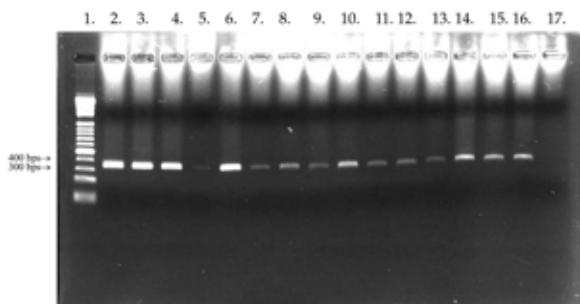
(三)電泳與定序分析

取Nested PCR產物5 mL，與6倍載入膠片緩衝液1 mL混合，置入1.8%瓊脂膠體，在電泳槽(+)極端加入0.5 mL 10 mg/mL ethidium bromide後，進行電泳，電泳條件100 V、30分鐘，以影像系統觀察，確認Nested PCR結果，並拍攝影像。結果確認後，以Exo-SAP IT套組純化，純化後，以BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit做定序反應，再以BigDye Xterminator Kit作螢光物質除去之純化(以上套組操作步驟依套組說明)，之後置入96孔盤，以自動定序儀作DNA序列分析，所得定序結果與美國國家衛生院之GenBank資料庫進行序列比對，製劑部分同時與標準藥材的定序結果比對，得到鑑定結果。

結果與討論

蔓荊子藥材之收集包括價購自藥廠及北、中、南部各地中藥房之藥材檢體共56件，經磨粉後，抽取檢體之total DNA，再進行DNA標記的篩選，當嘗試以葉綠體rbcL基因及核糖體ITS (Internal transcribe spacer) DNA序列的共通性引子 (universal primers)進行PCR擴增，但是並無足夠供定序分析的DNA片段被擴增產生。因此，再至GenBank資料庫查詢蔓荊子的序列資料，資料庫中並沒有單葉蔓荊子*Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham.或蔓荊子*Vitex trifolia* L.的序列資料，只能轉而查詢其他*Vitex*屬植物的DNA序列資料，其中*Vitex*屬植物的DNA序列資料中，以ITS序列資料較齊全，因此收集*Vitex*屬植物ITS序列，進行排序分析，設計多對對*Vitex*屬植物專一性引子，再進行PCR或Nested PCR的擴增試驗。

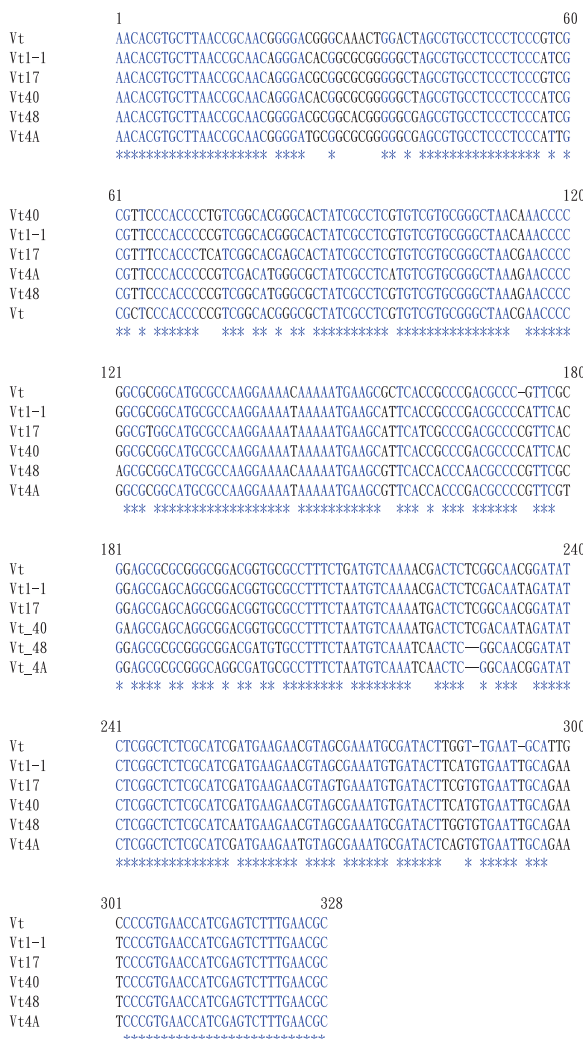
先以蔓荊子藥材為試驗標的，經過多組引子交互配合的試驗，篩選出以VtF-VtR3及VtF4-VtR4者兩對引子對進行Nested PCR時，擴增的PCR產物，可供定序分析之用。Nested PCR的產物電泳結果如圖一，長度約325 bps，經序列分析後，56件藥材檢體中，49件序列一致，同時比對外觀鑑別，確認藥材基原為單葉蔓荊子*Vitex trifolia*



圖一、蔓荊子藥材及製劑Nested PCR結果電泳
Lane 1: 100 bp ladder marker; Lane 2: VnL; Lane 3: Vt11; Lane 4: Vt12; Lane 5: Vt13; Lane 6: Vt25; Lane 7: Vt26; Lane 8: Vt32; Lane 9: Vt33; Lane 10: Vt53; Lane 11: Vt54; Lane 12: Vt55; Lane 13: VtA; Lane 14: Vt1B; Lane 15: Vt2B; Lane 16: Vt3A; Lane 17: Blank (no template)。Lane 2-12為藥材檢體，Lane13-16為製劑檢體

L. var. *simplicifolia* Cham.，由此可知本地大多數藥廠及中藥房，所販售之蔓荊子均為正品。

檢體Vt03採自高雄藥用植物園，其序列只在位置217處由鹽基C取代，推論為種內的差異。而檢體Vt02與VnL其序列只在位置210處由鹽基A取代，應為種內的變異。VnL檢體標示為黃荊子(蔓荊子之誤用品)，但因檢體已磨粉，無法從外觀做再確認，需要另外再多收集黃荊子檢體，做進一步分析，才能確認其序列。另外，有4件檢體Vt1-1、Vt17、Vt40及Vt48其序列與*Vitex trifolia*



圖二、蔓荊子藥材及其製劑定序序列；Vt表示*Vitex trifolia* var. *simplicifolia*

應用Nested PCR-DNA定序方法鑑定蔓荊子藥材及其製劑

表一、蔓荊子藥材檢體與鑑定結果

藥材編碼	來源	鑑定	藥材編碼	來源	鑑定
Vt01	本局標本室	Vt ^a	Vt29	北部中藥房	Vt
Vt1-1		<i>Vitex spp.</i> (89%) ^b	Vt30		Vt
Vt02		Vt (210-A) ^c	Vt31		Vt
Vt03	高雄原生植物園	Vt (217-C)	Vt32		Vt
Vt04	中藥廠	Vt	Vt33		Vt
Vt05		Vt	Vt34	中部中藥房	Vt
Vt06		Vt	Vt35		Vt
Vt08		Vt	Vt36		Vt
Vt09		Vt	Vt37		Vt
Vt10		Vt	Vt38		Vt
Vt11		Vt	Vt39		Vt
Vt12		Vt	Vt40		<i>Vitex spp.</i> (90%)
Vt13		Vt	Vt41		Vt
Vt14		Vt	Vt42		Vt
Vt15		Vt	Vt43		Vt
Vt16		Vt	Vt44	南部中藥房	Vt
Vt17		<i>Vitex spp.</i> (90%)	Vt45		Vt
Vt18		Vt	Vt46		Vt
Vt19		Vt	Vt47		Vt
Vt20		Vt	Vt48		<i>Vitex spp.</i> (91%)
Vt21		Vt	Vt49		Vt
Vt22	北部中藥房	Vt	Vt50		Vt
Vt23		Vt	Vt51		Vt
Vt24		Vt	Vt52		Vt
Vt25		Vt	Vt53		Vt
Vt26		Vt	Vt54		Vt
Vt27		Vt	Vt55		Vt
Vt28		Vt	VnL	黃荊子	Vt (210-A)

^a Vt表示*Vitex trifolia* var. *simplicifolia* Cham.

^b “()”中百分比數字為與*Vitex trifolia* var. *simplicifolia*之序列相似百分比

^c “210-A”表在210位置的鹽基被取代為“A”

L. var. simplicifolia Cham.相似度僅89-91%，應為*Vitex*屬植物，推斷為同屬誤用。DNA定序之序列整理表示如圖二，藥材檢體鑑定結果則列示於表一。

以相同的引子組對蔓荊子製劑進行Nested PCR，結果如電泳圖所示(圖一)，製劑檢體Nested PCR產物大小與藥材檢體大致相同，經定序分析

以及序列比對，結果顯示，10件製劑檢體中，6件序列與*V. trifolia* var. *simplicifolia* Cham.一致，確認為單葉蔓荊，Vt1A及Vt2A分別在序列位置63及157，鹽基由T取代，而VtB則是同時在位置63及157，有鹽基T取代情形。另外，Vt4A序列與*Vitex trifolia* var. *simplicifolia* Cham.相似僅88%，應為同屬植物誤用。DNA定序之序列整理表示如圖二，

表二、蔓荊子製劑檢體與鑑定結果

藥材編碼	製劑名稱	鑑定
VtA	蔓荊子	V ^{1a}
VtB		Vt (63-T,157-T ^b)
Vt1A	洗肝明目湯	Vt (157-T)
Vt1B		Vt
Vt2A	益氣聰明湯	Vt (63-T)
Vt2B		Vt
Vt3A	羌活勝濕湯	Vt
Vt4A	滋腎明目湯	<i>Vitex spp.</i> (88%) ^c
Vt4B		Vt
Vt5A	清上瀾痛湯	Vt

^a Vt表示*Vitex trifolia* var. *simplicifolia*

^b “63-T,157-T”表在63及210位置的鹽基被取代為“T”

^c “()”中百分比數字為與*Vitex trifolia* var. *simplicifolia* 之序列相似百分比

製劑中蔓荊子基原鑑別結果列示於表二。由結果確認，本研究中所建立的蔓荊子Nested PCR-DNA定序方法，可應用於蔓荊子藥材，以及中藥製劑中蔓荊子藥材基原的鑑定。

結 論

研究結果顯示，蔓荊子藥材的市售品使用上，大多能使用正確的藥材，雖然蔓荊子有蔓荊及單葉蔓荊2種基原可以使用，本地仍多用單葉蔓荊，推測是受產地影響所致，值得注意的是，有少數幾件有同屬誤用的情形，顯示外觀相似的藥材，可能來自不同的基原，這已在數種藥材，如川木通、威靈仙、五味子等藥材上，發現有相同的情形，因此對於藥材的鑑別，應使用不同的鑑別方法比對，再予以區別，才能確保使用正確藥材的入藥。

參考文獻

1. Lee, S. M., Lee, Y. J., Kim, Y. C., Kim, J. S., Kang, D. G. and Lee, H. S. 2012. Vascular protective role of vitexicarpin isolated from *Vitex rotundifolia* in human umbilical vein endothelial cells. *Inflammation* 35: 584-593.

2. Koh, D. J., Ahn, H. S., Chung, H. S., Lee, H., Kim, Y., Lee, J. Y., Kim, D. G., Hong, M., Shin, M. and Bae, H. 2011. Inhibitory effects of casticin on migration of eosinophil and expression of chemokines and adhesion molecules in A549 lung epithelial cells via NF-κB inactivation. *J. Ethnopharmacol.* 136: 399-405.
3. Lee, H., Han, A. R., Kim, Y., Cho, S. H., Ko, E., Lee, N. Y., Jeong, J. H., Kim, S. H. and Bae, H. 2009. A new compound, 1H,8H-pyrano[3,4-c]pyran-1,8-dione, suppresses airway epithelial cell inflammatory responses in a murine model of asthma. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 22: 591-603.
4. Ye, Q., Zhang, Q. Y., Zheng, C. J., Wang, Y. and Qin, L. P. 2010. Casticin, a flavonoid isolated from *Vitex rotundifolia*, inhibits prolactin release *in vivo* and *in vitro*. *Acta Pharmacol. Sin.* 31: 1564-1568.
5. Sohn, S. H., Ko, E., Oh, B. G., Kim, S. H., Kim, Y., Shin, M., Hong, M. and Bae, H. 2009. Inhibition effects of *Vitex rotundifolia* on inflammatory gene expression in A549 human epithelial cells. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 103: 152-159.
6. Ikram, M., Khattak, S. G. and Gilani, S. N. 1987. Antipyretic studies on some indigenous Pakistani medicinal plants: II. *J. Ethnopharmacol.* 19: 185-192.
7. Hernández, M. M., Heraso, C., Villarreal, M. L., Vargas-Arispuro, I. and Aranda, E. 1999. Biological activities of crude plant extracts from *Vitex trifolia* L. (Verbenaceae). *J. Ethnopharmacol.* 67: 37-44.
8. Ikawati, Z., Wahyuono, S. and Maeyama, K. 2001. Screening of several Indonesian medicinal plants for their inhibitory effect on histamine release from RBL-2H3 cells. *J. Ethnopharmacol.* 75: 249-256.
9. Hossain, M. M., Paul, N., Sohrab, M. H., Rahman, E. and Rashid, M. A. 2001. Antibacterial activity

- of *Vitex trifolia*. *Fitoterapia* 72: 695-697.
10. Alam, G., Wahyuono, S., Ganjar, I. G., Hakim, L., Timmerman, H. and Verpoorte, R. 2002. Tracheo-spasmolytic activity of viteosin-A and vitexicarpin isolated from *Vitex trifolia*. *Planta Med.* 68: 1047-1049.
11. Lu, K. T., Cheng, H. Y., Lo, C. F., Chang, H. C. and Lin, J. H. 2007. Discriminating between *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* in Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods. *Planta Med.* 73: 1322-1326.

Establishment of Nested PCR-DNA Sequencing Method for the Identification of *Viticis Simplicifoliae Fructus* and Its Preparations

KANG-TSU LU, YUNG-CHUAN HSIEH, HUI-CHUN LEE, YI-CHU LIU,
DANIEL YANG-CHIH SHIH AND CHI-FANG LO

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

Viticis Simplicifoliae Fructus are the dried ripe fruit of *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. (*V. rotundifolia* L. f., *V. ovata* Thunb.) and are easy confused with the dried ripe fruit of *V. negundo* L. In this study, ITS (internal transcribed spacer) was used as DNA marker and nested PCR followed by DNA sequencing was applied to authenticate *Viticis Simplicifoliae Fructus* and its preparations. The results showed that 52 out of 56 samples of raw materials were *Viticis Simplicifoliae Fructus* and 9 of 10 preparations contained *V. trifolia* L. var. *simplicifolia*. The herbs of *Vitex spp.* were misused in the other samples. The nested PCR-DNA sequencing method for *Viticis Simplicifoliae Fructus* and its preparations was also established in this study.

Key words: *Viticis Simplicifoliae Fructus*, ITS, nested PCR, DNA sequencing