

## 成分分析

## 基于多元统计分析的沪地龙基原间水溶性蛋白差异研究\*

李雷<sup>1,2</sup>, 史建伍<sup>3</sup>, 刘兰玉<sup>4</sup>, 李奇璋<sup>5</sup>, 吴宇<sup>1</sup>, 于海征<sup>1</sup>, 张汉明<sup>1</sup>, 李耀昕<sup>1\*\*</sup>, 张磊<sup>1\*\*</sup>

(1. 海军军医大学(第二军医大学)药学院, 上海 200433; 2. 中国人民解放军 65655 部队, 赤峰 024000; 3. 南通大学医学院 交叉医学研究所, 南通 226001; 4. 上海中医药大学中药学院, 上海 201203; 5. 淮北师范大学生命科学院创新药物研发中心, 淮北 235000)

**摘要** 目的: 对沪地龙 3 个基原间水溶性蛋白含量和种类的差异进行评价研究, 为沪地龙的鉴定和质量评价提供参考。方法: 测定沪地龙水溶性蛋白含量, 应用非参数检验方法比较基原间含量差异; 使用 SDS-PAGE 方法建立沪地龙水溶性蛋白指纹图谱, 依据条带相对分子质量构建“条带矩阵”, 应用聚类分析、正交偏最小二乘判别分析对 3 个基原间蛋白种类差异进行比较分析。结果: 通俗环毛蚓、威廉环毛蚓水溶性蛋白含量无统计学差异, 但二者均与栉盲环毛蚓存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 栉盲环毛蚓水溶性蛋白含量高于二者。SDS-PAGE 蛋白电泳显示沪地龙 3 个基原在相对分子质量  $10 \times 10^3 \sim 250 \times 10^3$  间蛋白谱带在相对分子质量和数量间存在差异; 聚类分析、正交偏最小二乘判别分析结果表明, 沪地龙各基原能明显区分, 共有 13 个差异性蛋白成分, 根据 VIP 大小差异相对分子质量依次为  $133.7 \times 10^3$ 、 $10.4 \times 10^3$ 、 $66.9 \times 10^3$ 、 $51.9 \times 10^3$ 、 $13.4 \times 10^3$ 、 $7 \times 10^3$ 、 $29.4 \times 10^3$ 、 $14.6 \times 10^3$ 、 $62.2 \times 10^3$ 、 $81.1 \times 10^3$ 、 $89.2 \times 10^3$ 、 $7.7 \times 10^3$ 、 $101.7 \times 10^3$ 。结论: 沪地龙基原间水溶性蛋白成分存在差异, 通俗环毛蚓和威廉环毛蚓在蛋白含量和种类方面相似度高。SDS-PAGE 方法可为沪地龙鉴定和质量评价提供参考。

**关键词:** 沪地龙; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法; 蛋白质; 基原鉴定; 质量评价

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)12-2041-10

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0229

## Difference of aqueous extract protein among Hudilong origins base on multivariate statistical analysis\*

LI Lei<sup>1,2</sup>, SHI Jian-wu<sup>3</sup>, LIU Lan-yu<sup>4</sup>, LI Qi-zhang<sup>5</sup>, WU Yu<sup>1</sup>,  
YU Hai-zheng<sup>1</sup>, ZHANG Han-ming<sup>1</sup>, LI Yao-xin<sup>1\*\*</sup>, ZHANG Lei<sup>1\*\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Naval Medical University(Second Military Medical University), Shanghai 200433, China; 2. Unit 65655 of the People's Liberation Army of China, Chifeng 024000, China; 3. Institute of Interdisciplinary Integrative Medicine Research, Medical School, Nantong University, Nantong 226001, China; 4. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 5. Innovative Drug R&D Center, College of Life Sciences, Huaibei Normal University, Huaibei 235000, China)

**Abstract Objective:** To evaluate the differences of aqueous extract protein content and kinds among Hudilong origins in order to provide reference for the identification and quality evaluation. **Methods:** The protein content of aqueous extract was determined, and the differences among the origins were compared by nonparametric tests. The protein fingerprints were established by SDS-PAGE, and the band matrix was constructed based on the

\* 国家自然科学基金项目(82225047); 科技部“中医药现代化”重点研发计划(2022YFC3501703)

\*\* 通信作者 张磊 Tel:(021)81871307; E-mail:zhanglei@smmu.edu.cn

李耀昕 Tel:(021)81871306; E-mail:707762487@qq.com

第一作者 Tel:18748000918; E-mail:2101202810@qq.com

molecular weight of the bands. The differences of the protein kinds among the 3 origins were compared and analyzed by CA and OPLS - DA. **Results:** There was no statistically significant difference in the aqueous extract protein content between the *P. vulgaris* and *P. guillelmi*, but both of them differed significantly from that of *P. pectinifera* ( $P < 0.01$ ). Aqueous extract protein content. from *P. pectinifera* was higher than from *P. vulgaris* or *P. guillelmi*. The results of SDS - PAGE showed that there were differences in the molecular masses and quantities of the protein bands of the 3 origins with relative molecular masses ranging from  $10 \times 10^3$  to  $250 \times 10^3$ . The results of the CA and OPLS - DA showed that each of the origin of Hudilong could be differentiated. The differences of the protein relative molecular masses were  $133.7 \times 10^3$ ,  $10.4 \times 10^3$ ,  $66.9 \times 10^3$ ,  $51.9 \times 10^3$ ,  $13.4 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$ ,  $29.4 \times 10^3$ ,  $14.6 \times 10^3$ ,  $62.2 \times 10^3$ ,  $81.1 \times 10^3$ ,  $89.2 \times 10^3$ ,  $7.7 \times 10^3$ , and  $101.7 \times 10^3$ , respectively. **Conclusion:** There are differences in the aqueous extract protein among 3 origins of Hudilong. The *P. vulgaris* and *P. guillelmi* have high similarity in the aqueous extract protein components content and kinds. SDS - PAGE technique could be used to provide reference for the identification and quality evaluation. **Keywords:** Hudilong; SDS - PAGE; protein; origin identification; quality evaluation

地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *P. vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelsen 的干燥体,前一种习称广地龙,后三者习称沪地龙<sup>[1]</sup>。地龙的蛋白类成分占干重的 50% 以上,所含种类丰富如抗微生物蛋白、钙调素结合蛋白、脂类蛋白、蚓激酶、纤溶酶、胶原酶、抗菌肽等,具有抗脑卒中、抗凝血、抗纤维化、抗菌等药理活性<sup>[2]</sup>。蛋白质作为动物重要的初生代谢产物之一,在生长、发育、代谢、能量转换、信号传导等过程中发挥关键作用,也具有重要的药理活性,如角蛋白<sup>[3]</sup>、水蛭蛋白<sup>[4]</sup>等。对地龙蛋白的研究多见于蛋白组分和特征多肽的研究<sup>[5-6]</sup>,而对于地龙药材基原间蛋白差异研究报道较少<sup>[7]</sup>。沪地龙 3 个基原在生存环境、分布地域较为相近,其药材相似度高,传统鉴定方法难以区分<sup>[8]</sup>,在临床与研究不作基原区分的现象时有发生<sup>[9-10]</sup>,而且混用不利于质量稳定<sup>[11]</sup>。蛋白质大分子在物种体内具有稳定的含量和物种特异性,其差异在一定程度上能反映样品基原间、地域性、不同部位和加工方法的差异。

十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, SDS - PAGE) 是常用的蛋白质研究方法,将样品进行适当处理后,在适宜的电泳条件下对样品进行分析,结果以样品蛋白条带位置与标准相对分子质量蛋白位置进行比较,还可根据蛋白条带颜色深浅和条带宽度定量比较蛋白含量差异<sup>[3]</sup>。可用于中药

的真伪鉴别<sup>[12-13]</sup>、特征蛋白研究<sup>[14]</sup>、炮制前后蛋白变化<sup>[15]</sup>、不同产地蛋白差异<sup>[16-17]</sup>等方面。本研究首先对沪地龙 3 个基原样品的水溶性蛋白含量进行测定,并对基原间含量差异进行比较;再应用 SDS - PAGE 方法获得沪地龙样品水溶性蛋白图谱,通过建立条带矩阵并应用聚类分析和正交偏最小二乘判别分析对沪地龙 3 个基原进行蛋白差异分析。

## 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** 3020 型酶标仪(赛默飞公司);DYY - 6C 型电泳仪电源,DYCZ - 28C 型电泳槽(北京六一仪器厂);ChemiScope6100 型化学发光成像系统(上海勤翔公司);ME204E/02 型万分之一电子分析天平(上海梅特勒 - 托利多公司);ZC - 100S 型超声波清洗机(常州恩培公司);HH - 6 型数显恒温水浴锅(上海邦西公司)。

**1.2 试剂** BCA 蛋白测定试剂盒,南京碧云天公司;15% Precast - GLgel Tris - Glycine 电泳预制胶 15 孔,  $10 \times \text{Tris} - \text{Glycine}$  电泳缓冲液,双色  $10 \times 10^3 \sim 250 \times 10^3$  Da TureColor 预染蛋白 Marker,考马斯亮蓝 R - 250,乙酸,十二烷基硫酸钠(SDS), $\beta$  - 巯基乙醇,三羟甲基氨基甲烷(Tris),均购自上海生工生物有限公司。

**1.3 样品** 本实验所用沪地龙样品共计 40 批次,其中通俗环毛蚓 16 批次,威廉环毛蚓 12 批次,栉盲环毛蚓 12 批次。样品经海军军医大学张汉明教授鉴定,药材来源见表 1。

表1 沪地龙药材种类及来源  
Tab.1 Information of Hudilong samples from different origins

样品(sample)	收集地点(source)	批号(batch number)
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	安徽省灵璧县(Lingbi County, Anhui Province)	MV - AHLB
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	安徽省亳州市(Bozhou City, Anhui Province)	MV - AHBZ
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	河北美康药业(Hebei Meikang Pharmaceutica)	MV - HBMK
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海虹桥药业(Shanghai Hongqiao Pharmaceutica)	MV - HQYY - 1
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海虹桥药业(Shanghai Hongqiao Pharmaceutica)	MV - HQYY - 2
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海虹桥药业(Shanghai Hongqiao Pharmaceutica)	MV - HQYY - 3
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	江苏省淮安市(Huaian City, Jiangsu Province)	MV - JSHA
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	江苏省如东市(Rudong City, Jiangsu Province)	MV - JSRD
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	江苏省徐州市(Xuzhou City, Jiangsu Province)	MV - JSXZ
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	江苏省镇江市(Zhenjiang City, Jiangsu Province)	MV - JSZJ
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海康桥药业(Shanghai Kangqiao Pharmaceutica)	MV - KQYY - 1
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海康桥药业(Shanghai Kangqiao Pharmaceutica)	MV - KQYY - 2
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海雷允上药业(Shanghai Lei Yunshang Pharmaceutica)	MV - LYSYY
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海市浦东区(Pudong Direct, Shanghai City)	MV - SHPD
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海市崇明区(Chongming Direct, Shanghai City)	MV - SHCM
通俗环毛蚓( <i>P. vulgaris</i> )	上海市横沙岛(Hengsha Island, Shanghai City)	MV - SHHSD
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	河南省沈丘市(Shenqiu City, Henan Province)	MG - HNSQFJZ
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	安徽省灵璧县(Lingbi County, Anhui Province)	MG - AHLB
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	安徽省亳州市(Bozhou City, Anhui Province)	MG - AHBZ - 1
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	安徽省亳州市(Bozhou City, Anhui Province)	MG - AHBZ - 2
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	上海虹桥药业(Shanghai Hongqiao Pharmaceutica)	MG - HQYY - 1
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	上海虹桥药业(Shanghai Hongqiao Pharmaceutica)	MG - HQYY - 2
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	上海虹桥药业(Shanghai Hongqiao Pharmaceutica)	MG - HQYY - 3
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	江苏省镇江市(Zhenjiang City, Jiangsu Province)	MG - JSZJ
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	上海康桥药业(Shanghai Kangqiao Pharmaceutica)	MG - KQYY - 1
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	上海康桥药业(Shanghai Kangqiao Pharmaceutica)	MG - KQYY - 2
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	上海康桥药业(Shanghai Kangqiao Pharmaceutica)	MG - KQYY - 3
威廉环毛蚓( <i>P. guillelmi</i> )	上海市横沙岛(Hengsha Island, Shanghai City)	MG - SHHSD
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市奉贤区(Fengxian Direct, Shanghai City)	AP - SHFX - 1
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市浦东区(Pudong Direct, Shanghai City)	AP - SHPD - 1
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海益大本草园(Shanghai Yida Herbal Garden)	AP - YDBCY - 1
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市奉贤区(Fengxian Direct, Shanghai City)	AP - SHFX - 2
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市奉贤区(Fengxian Direct, Shanghai City)	AP - SHFX - 3
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市奉贤区(Fengxian Direct, Shanghai City)	AP - SHFX - 4
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市浦东区(Pudong Direct, Shanghai City)	AP - SHPD - 2
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	浙江省天目山(Tianmu Mountain, Zhejiang Province)	AP - ZJTMS
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市奉贤区(Fengxian Direct, Shanghai City)	AP - SHFX - 5
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海益大本草园(Shanghai Yida Herbal Garden)	AP - YDBCY - 2
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海市浦东区(Pudong Direct, Shanghai City)	AP - SHPD - 3
栝盲环毛蚓( <i>P. pectinifera</i> )	上海康桥药业(Shanghai Kangqiao Pharmaceutica)	AP - KQYY

## 2 方法与结果

**2.1 供试品溶液的制备** 药材粉碎至粗粉,取 1.0 g,精密称定,加入 0.9% 氯化钠溶液 30 mL 浸泡 30 min,超声(300 W,40 kHz)提取 30 min,温度控制在 50 °C 以下,提取液 8 层纱布滤过,取续滤液经 3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,取上清液,即得。

**2.2 试剂溶液的制备** 5 × Loading Buffer:1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCL(pH 6.8)0.6 mL,50% 甘油 2.5 mL,10% SDS 2 mL,β-巯基乙醇 0.5 mL,1% 溴酚蓝 1 mL,加水定容至 10 mL。

脱色液:95% 乙醇 500 mL,冰乙酸 160 mL,加水定容至 2 000 mL。

染色液:考马斯亮蓝 R-250 0.60 g,加脱色液定容至 500 mL。

**2.3 线性关系** 将 BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天)中标标准蛋白液用水进行梯度稀释,以蛋白浓度( $X, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )为横坐标,以吸收度  $Y$  为纵坐标,得线性回归方程:

$$Y = 0.0009X + 0.1519 \quad r = 0.9989$$

蛋白浓度在 0 ~ 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  与吸光度呈良好的线性关系。

**2.4 含量测定** 先对样品进行蛋白浓度预测定,再根据结果将样品浓度调整到 0 ~ 500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内。16 批通俗环毛蚓蛋白含量为 44.19 ~ 106.08  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,平均含量为 68.54  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;12 批威廉环毛蚓蛋白含量为 40.81 ~ 96.50  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,平均含量为 59.08  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ;12 批栉盲环毛蚓蛋白含量为 38.43 ~ 147.04  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,平均含量为 99.43  $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,见表 2。

表 2 沪地龙水溶性蛋白含量测定结果

Tab. 2 Results of protein content of aqueous extract from Hudilong samples

序号 (No.)	批号 (batch)	含量 (content)/(mg·g <sup>-1</sup> )	序号 (No.)	批号 (batch)	含量 (content)/(mg·g <sup>-1</sup> )
1	MV-JSXZ	70.07	21	MG-JSZJ	57.09
2	MV-JSRD	44.19	22	MG-HQYY-3	54.42
3	MV-JSHA	72.27	23	MG-KQYY-1	66.15
4	MV-KQYY-1	50.88	24	MG-KQYY-2	48.94
5	MV-SHPD	106.08	25	MG-KQYY-3	67.70
6	MV-SHCM	76.21	26	MG-AHBZ-2	49.19
7	MV-AHBZ	46.61	27	MG-HNSQFJZ	96.50
8	MV-LYSYY	50.69	28	MG-AHLB	77.61
9	MV-HQYY-1	52.66	29	AP-SHKQYY	38.43
10	MV-SHHSD	80.98	30	AP-YDBCY-1	47.57
11	MV-HQYY-2	57.78	31	AP-SHPD-1	61.89
12	MV-JSXZ	92.40	32	AP-SHFX-1	129.78
13	MV-HBMK	67.98	33	AP-SHPD-2	131.56
14	MV-AHLB	103.59	34	AP-SHFX-2	118.90
15	MV-HQYY-3	59.12	35	AP-SHPD-3	124.04
16	MV-KQYY-2	65.16	36	AP-SHFX-3	147.04
17	MG-HQYY-1	40.81	37	AP-ZJTMS	86.97
18	MG-SHHSD	52.40	38	AP-YDBCY-2	64.55
19	MG-AHBZ-1	42.97	39	AP-SHFX-4	113.37
20	MG-HQYY-2	55.22	40	AP-SHFX-5	129.09

**2.5 SDS-PAGE 结果** 根据“2.4”项检测结果将样品蛋白浓度稀释到 1  $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,取待测样品 400  $\mu\text{L}$ ,5 × Loading Buffer 100  $\mu\text{L}$  置于 1.5 mL 离心管中,混匀后 100 °C 水浴 5 min,放置室温后 5 000 r·min<sup>-1</sup>离心 3 min。取上清液 20  $\mu\text{L}$ ,marker

5  $\mu\text{L}$  进行凝胶电泳。电泳条件采用恒压模式 180 V,待指示剂距玻璃板下缘约 1 cm 时停止电泳,取出电泳胶。采用考马斯亮蓝染色法进行染色,经脱色后得蛋白电泳胶片,使用勤翔 ChemiScope 6100 凝胶成像系统拍照。对电泳图谱以从上至下顺序进行条带

计数。结果通俗环毛蚓最多可得到 18 条条带(图 1, 1-B), 威廉环毛蚓最多可得 16 条条带(图 1, 2-B), 栉盲环毛蚓最多可得 18 条条带(图 1, 3-B)。

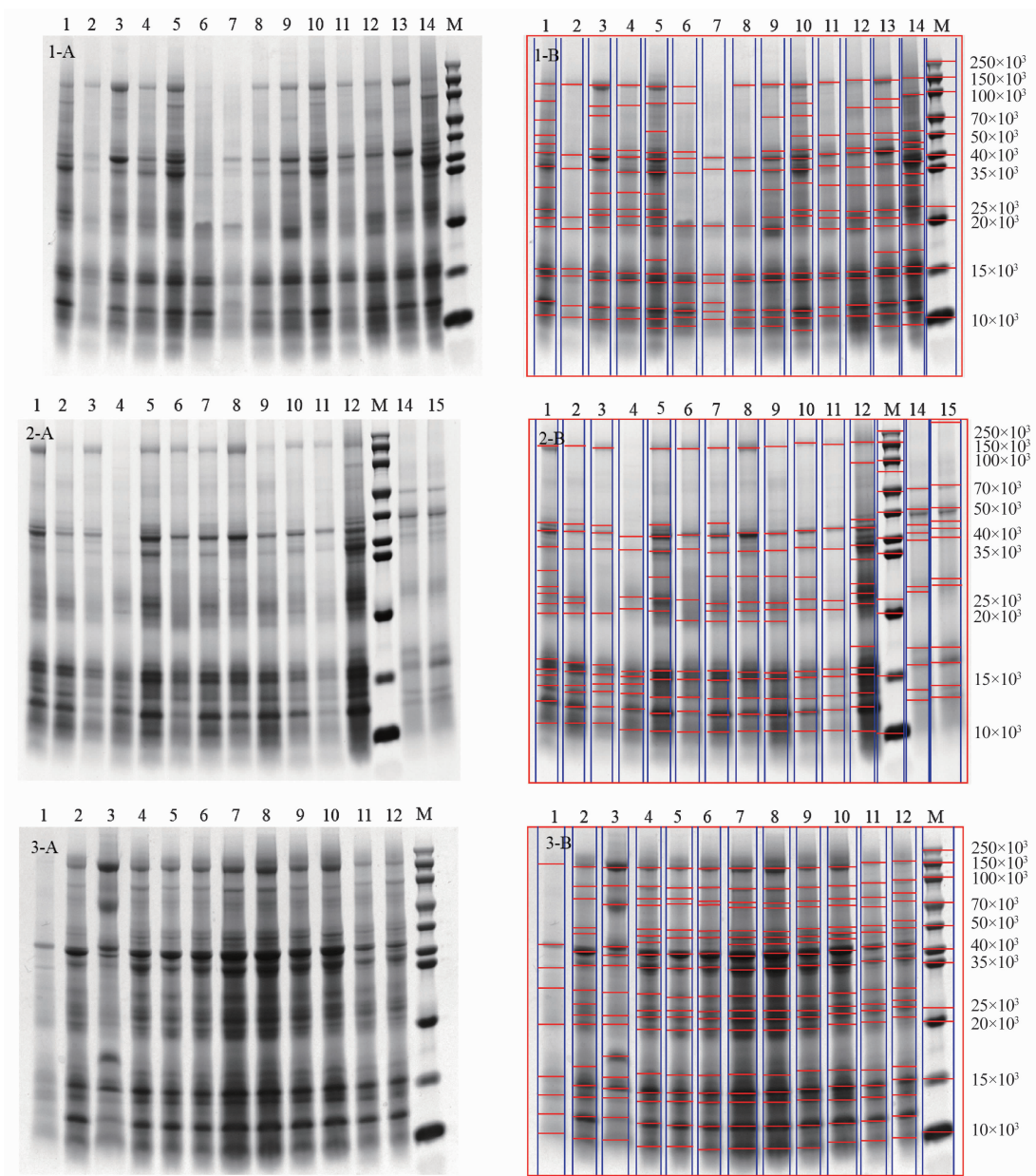
以各图谱的 Marker 比移值( $R_f$ )为横坐标, 相对分子质量的对数( $\lg M$ )为纵坐标建立标准曲线, 得 1-A 标准曲线方程、2-A 标准曲线方程和 3-A 标准曲线方程:

$$\lg M = -1.8998R_f + 2.4662 \quad r = 0.9714$$

$$\lg M = -1.6950R_f + 2.3404 \quad r = 0.9669$$

$$\lg M = -1.8295R_f + 2.4474 \quad r = 0.9634$$

将蛋白条带比移值代入标准曲线方程, 得到其相对分子质量。以蛋白谱带相对分子质量为参考, 按从大到小的顺序排列, 样品含有该条带记为“1”, 不含有该条带记为“0”, 建立条带矩阵(表 3)。



1. 1~14. 通俗环毛蚓样品(*P. vulgaris* samples) M. Marker  
 2. 1~12. 威廉环毛蚓(*P. guillelmi* samples) M. Marker 14~15. 通俗环毛蚓样品(*P. vulgaris* samples)  
 3. 1~12. 栉盲环毛蚓(*P. pectinifera* samples) M. Marker

图 1 沪地龙水溶性蛋白 SDS-PAGE 电泳图(A)和电泳条带计数图(B)

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis map(A) and the bands counting plot(B) of aqueous extract proteins of Hudilong

表 3 沪地龙水溶性蛋白条带数据矩阵  
Tab. 3 Band matrix of aqueous extract protein from Hudilong samples

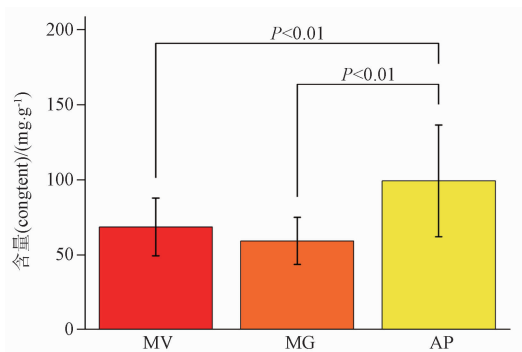
批号 (batch number)	$M_r (\times 10^3)$																								
	133.7	123.5	101.7	89	81	67	62	59	53	52	46	35	29	27	24	22	16	15	13	12	12	10	8.8	7.7	7
MV-JSXZ	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-JSRD	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-JSHA	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-KQYY-1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-SHPD	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-SHCM	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
MV-AHBZ	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0
MV-LYSYY	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-HQYY-1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-SHHS	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-HQYY-2	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-JSXZ	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-HBMK	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-AHLB	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	0
MV-HQYY-3	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
MV-KQYY-2	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0
MG-HQYY-1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
MG-SHHS	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
MG-AHBZ-1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
MG-HQYY-2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0
MG-JSZJ	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
MG-HQYY-3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
MG-KQYY-1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
MG-KQYY-2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
MG-KQYY-3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
MG-AHBZ-2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
MG-HNSQFJZ	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
MG-A.HLB	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0
AP-SHKQYY	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1
AP-YDBCY-1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHPD-1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHFX-1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHPD-2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHFX-2	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHPD-3	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHFX-3	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-ZJTMS	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-YDBCY-2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHFX-4	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
AP-SHFX-5	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1

### 3 结果分析

3.1 基原间蛋白含量差异分析 应用 SPSS 26.0 对结果进行了方差齐性检验和正态分布检验,结果显

著性均 <0.05,即不满足 ANOVA 分析条件,因此选择非参数独立样本检验方法。应用 Original Pro (2024 版)得到非参数独立样本克鲁斯卡尔-沃利斯

检验(K-W)检验结果  $P = 0.021 < 0.05$ , 表明3个基原间存在差异, 应用 Bonferroni 法进行两两比较, 结果通俗环毛蚓与栉盲环毛蚓间, 威廉环毛蚓与栉盲环毛蚓间  $P$  均  $< 0.01$ , 即通俗环毛蚓与威廉环毛蚓间水溶性蛋白含量差异无统计学意义, 通俗环毛蚓、威廉环毛蚓与栉盲环毛蚓间水溶性蛋白含量均存在显著性差异(图2)。



MV. 通俗环毛蚓 (*P. vulgaris*) MG. 威廉环毛蚓 (*P. guillelmi*) AP. 栉盲环毛蚓 (*P. pectinifera*)

图2 沪地龙基原间蛋白含量比较分析

Fig. 2 The analysis of protein content among Hudilong origins

**3.2 条带矩阵聚类分析** 应用 NTSYSpc2.10e 软件对所得“条带矩阵”数据进行聚类分析。沪地龙3个基原中栉盲环毛蚓单独聚为1支, 通俗环毛蚓和威廉环毛蚓聚为1支, 而后二者又各单独聚为1支(除样品 MV-HQYY-3 和 MV-KQYY-2), 从整体上看, 3个基原的蛋白谱带具有种内相似性和种间差异性, 且种间差异大于种内差异(图3)。

**3.3 蛋白条带差异分析** 先将沪地龙3个基原所得的“条带矩阵”数据导入软件 SIMCA14.1, 建立 OPLS-DA 分析总体模型 M1, 以筛选3个基原间的差异性蛋白质 ( $VIP > 1$ ); 然后以2个基原为1组建立 OPLS-DA 分析模型 M2 (MV + MG)、M3 (MV + AP) 和 M4 (MG + AP), 筛选基原间的差异性蛋白质。各模型的  $R^2X$ 、 $R^2Y$  和  $Q^2$  均  $> 0.67$ , 见表4。

通过200次置换检验对4个模型进行评价, 均无过拟合现象, 说明模型稳定且具有良好的解释及预测能力(图4)。在M1模型得分图中, 沪地龙各基原在95%置信区间内, 区分明显, 单独聚集成簇(图5, 1-A); 在M2~M4模型得分图中, 各基原分别位于2侧, 说明不同基原间差异明显, 可被区分(图5, 2~4-A)。

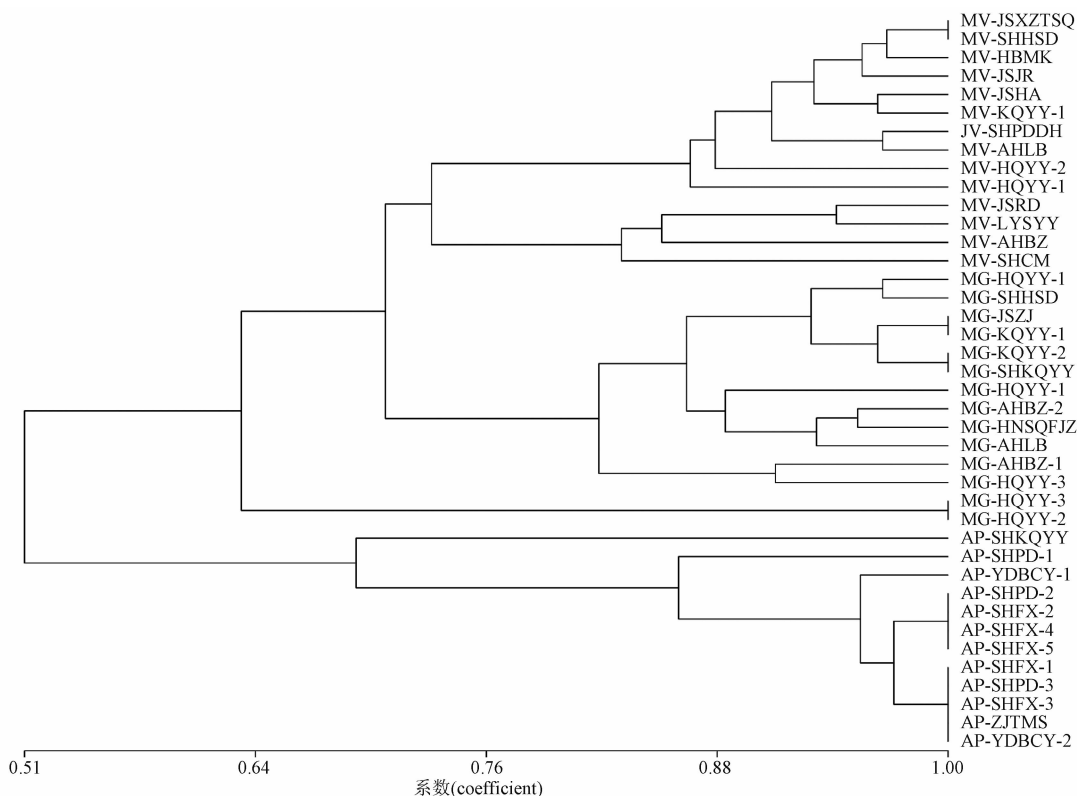


图3 沪地龙蛋白条带聚类分析

Fig. 3 Results of protein batches by CA from Hudilong samples

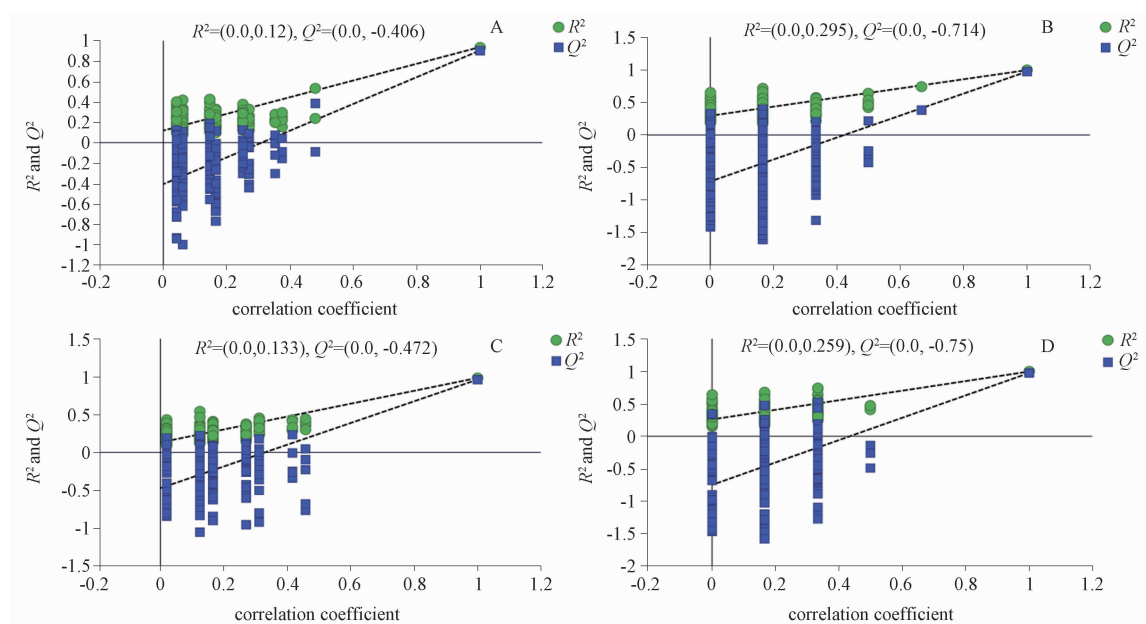
表4 沪地龙 OPLS-DA 模型信息

Tab. 4 Information of model OPLS-DA from Hudilong

模型(model)	分组(group)	$R^2X$	$R^2Y$	$Q^2$
M1	MV + MG + AP	0.694	0.955	0.928
M2	MV + MG	0.746	0.988	0.964
M3	MV + AP	0.671	0.983	0.961
M4	MG + AP	0.792	0.966	0.973

注 (note): MV. 通俗环毛蚓 (*P. vulgaris*); MG. 威廉环毛蚓 (*P. vulgaris*); AP. 栉盲环毛蚓 (*P. vulgaris*)

以  $VIP > 1$  为提取差异蛋白标准, 沪地龙 3 个基原间差异蛋白相对分子质量依次为  $133.7 \times 10^3$ 、 $10.4 \times 10^3$ 、 $66.9 \times 10^3$ 、 $51.9 \times 10^3$ 、 $13.4 \times 10^3$ 、 $7 \times 10^3$ 、 $29.4 \times 10^3$ 、 $14.6 \times 10^3$ 、 $62.2 \times 10^3$ 、 $81.1 \times 10^3$ 、 $89.2 \times 10^3$ 、 $7.7 \times 10^3$ 、 $101.7 \times 10^3$  (图 4-10, 1-B); 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓间主要差异蛋白相对分子质量为  $133.7 \times 10^3$ 、 $10.4 \times 10^3$ 、 $66.9 \times 10^3$ 、 $89.2 \times 10^3$ 、 $101.7 \times 10^3$ 、 $11.8 \times 10^3$ 、 $8.8 \times 10^3$ 、 $7.7 \times 10^3$ 、 $16.4 \times 10^3$ 、 $35.4 \times 10^3$ 、 $27.1 \times 10^3$ 、 $24.1 \times 10^3$



A. M1 模型 (M1 model) B. M2 模型 (M2 model) C. M3 模型 (M3 model) D. M4 模型 (M4 model)

图4 OPLS-DA 模型置换检验评价

Fig. 4 Permutation test of model OPLS-DA

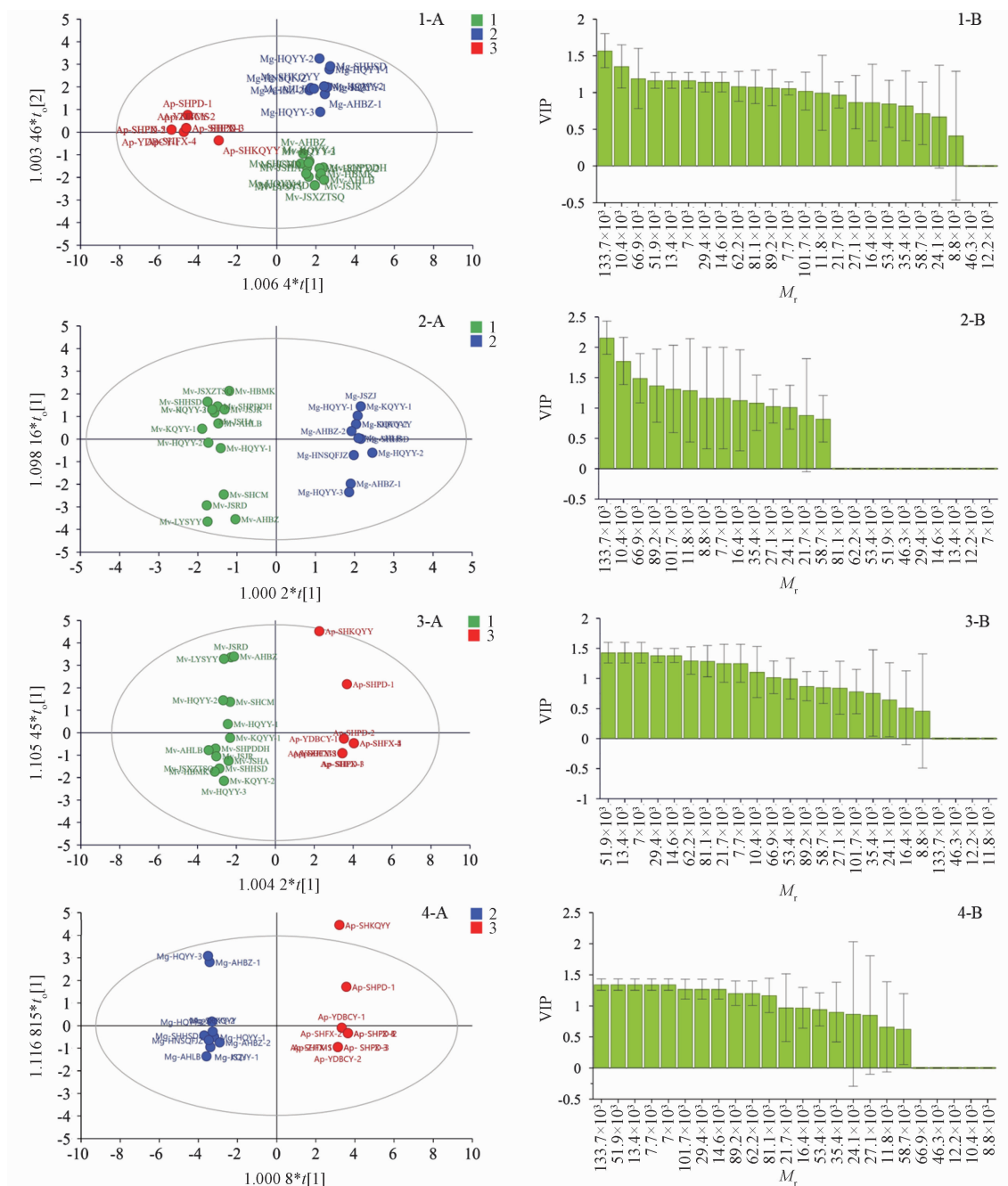
(图 4-10, 2-B); 通俗环毛蚓与栉盲环毛蚓间主要差异蛋白相对分子质量为  $51.9 \times 10^3$ 、 $13.4 \times 10^3$ 、 $7 \times 10^3$ 、 $29.4 \times 10^3$ 、 $14.6 \times 10^3$ 、 $62.2 \times 10^3$ 、 $81.1 \times 10^3$ 、 $21.7 \times 10^3$ 、 $7.7 \times 10^3$ 、 $10.4 \times 10^3$ 、 $66.9 \times 10^3$  (图 4-10, 3-B); 栉盲环毛蚓与威廉环毛蚓间主要差异蛋白相对分子质量为  $133.7 \times 10^3$ 、 $51.9 \times 10^3$ 、 $13.4 \times 10^3$ 、 $7.7 \times 10^3$ 、 $7 \times 10^3$ 、 $101.7 \times 10^3$ 、 $29.4 \times 10^3$ 、 $14.6 \times 10^3$ 、 $89.2 \times 10^3$ 、 $62.2 \times 10^3$ 、 $81.1 \times 10^3$  (图 5, 4-B)。

#### 4 讨论

蛋白质是生命组成和发挥功能的重要物质, 地龙的蛋白含量可达一半以上, 其含量多少在一定程度上能反映药材质量的高低。从对沪地龙 3 个基原水溶性蛋白含量结果看, 各基原内样品批次间蛋白含量 RSD 在 25.6%~32.4%, 最高和最低相差可达

2~3 倍, 推测其差异主要来自产地、加工方式、储存条件等因素的影响。对 3 个基原间蛋白含量统计分析结果表明, 通俗环毛蚓与威廉环毛蚓在总体含量上不存在统计学差异, 但二者均与栉盲环毛蚓存在显著性差异, 而蛋白含量以栉盲环毛蚓最高。

SDS-PAGE 图谱中蛋白条带的位置与其相对分子质量相关, 与其蛋白构象无关, 其颜色深浅与蛋白含量成正比。由图 4-6 可知, 各基原可见 5 条明显主条带, 颜色较深所占总蛋白含量比例较高, 位于 Marker 的  $150 \times 10^3$ 、 $40 \times 10^3$ 、 $20 \times 10^3$ 、 $15 \times 10^3$ 、 $10 \times 10^3$  附近。3 个基原在相对分子质量  $20 \times 10^3$  以下条带数目大多为 5 条条带, 但条带位置存在明显差异, 可作为鉴别依据; 此外栉盲环毛蚓在  $20 \times 10^3 \sim 35 \times 10^3$  大多可见 4 条条带,  $70 \times 10^3 \sim 100 \times 10^3$  大多



1 - A, 1 - B. M1 模型(M1 model) 2 - A, 2 - B. M2 模型(M2 model)  
3 - A, 3 - B. M3 模型(M3 model) 4 - A, 4 - B. M4 模型(M4 model)

图 5 OPLS-DA 模型得分图及 VIP 值

Fig. 5 OPLS-DA scores plot and VIP value

可见 3 条条带,此处与另外 2 个基原有明显差异,可作为区分栉盲环毛蚓的标志区。PLS-DA 也结果表明,根据条带位置或相对分子质量可对 3 个基原进行有效区分。CA 结果中通俗环毛蚓和威廉环毛蚓聚为 1 支,栉盲环毛蚓单独聚为 1 支,说明通俗环毛蚓与威廉环毛蚓在蛋白种类上较为相似,但二者均

与栉盲环毛蚓存在差异,这与蛋白含量结果具有一致性。由上述可知,沪地龙 3 个基原 SDS-PAGE 图谱中条带位置与数量存在基原差异,而 SDS-PAGE 方法特征性强、归类准确,可对沪地龙进行鉴定。

本研究对地龙水溶性成分中的蛋白类成分进行了含量测定和 SDS-PAGE 电泳分析,从分析结果来

看,沪地龙3个基原中通俗环毛蚓和威廉环毛蚓蛋白含量方面不存在统计学差异,但二者均与栉盲环毛蚓存在显著性差异。水溶性蛋白种类方面,通俗环毛蚓和威廉环毛蚓间蛋白种类相似度高于栉盲环毛蚓。从本研究可知,沪地龙3个基原间水溶性蛋白成分存在差异,可为后续沪地龙研究和临床应用提供参考。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 127  
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 127
- [2] 商焯, 齐丽娜, 金华, 等. 地龙化学成分及药理活性研究进展[J]. 药物评价研究, 2022, 45(5): 989  
SHANG Y, QI LN, JIN H, *et al.* Research development of *Pheretima* on chemical composition and pharmacological activity [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(5): 989
- [3] 曾榕, 刁丽梅. 动物药蛋白多肽类成分抗癫痫作用及机制的研究进展[J]. 中医学报, 2022, 50(9): 99  
ZENG R, DIAO LM. Research progress on antiepileptic effect and mechanism of animal drug protein polypeptides [J]. *Acta Chin Med Pharmacol*, 2022, 50(9): 99
- [4] 马琳, 马莉, 欧阳罗丹, 等. 基于 SDS-PAGE 技术的不同水蛭炮制品中水溶性蛋白的差异性研究[J]. 时珍国医国药, 2016, 27(6): 1379  
MA L, MA L, OUYANG LD, *et al.* Study on the difference of water-soluble proteins in different Leech processed products based on SDS-PAGE Technology [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2016, 27(6): 1379
- [5] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术的广地龙化学成分分析[J]. 中草药, 2017, 48(2): 252  
ZHANG Y, DONG WT, HUO JH, *et al.* Analysis on chemical constituents of *Pheretima aspergillum* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *China Tradit Herb Drugs*, 2017, 48(2): 252
- [6] 董洪霜, 张静娴, 胡青, 等. 基于纳升高效液相色谱-四极杆-线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱技术研究广地龙中的蛋白质[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(2): 324  
DONG HS, ZHANG JX, HU Q, *et al.* Study on proteins in *Guangdilong* by nano LC/orbitrap fusion lumos HR-MS [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(2): 324
- [7] 吴文如, 李薇, 赖小平, 等. 地龙药材蛋白质电泳鉴定的初步研究[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 267  
WU WR, LI W, LAI XP, *et al.* The study of SDS-PAGE protein electrophoresis of *Dilong* [J]. *Acad J Guangdong Coll Pharm*, 2011, 27(3): 267
- [8] 李雷, 孙为婕, 张汉明, 等. 地龙鉴定方法的研究现状与展望[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(1): 285  
LI L, SUN WJ, ZHANG HM, *et al.* Current status and prospect of identification methods of Chinese medicine *Pheretima* [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(1): 285
- [9] 周恒, 曹依敏, 苗水, 等. HPLC 法测定沪地龙中 7 个核苷类成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(1): 97  
ZHOU H, CAO YM, MIAO S, *et al.* Determination of 7 nucleosides in Shanghai *Pheretima* by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(1): 97
- [10] 黄帅, 徐风, 杨平, 等. 地龙的 HPLC 特征图谱研究[J]. 中国药房, 2015, 26(21): 2971  
HUANG S, XU F, YANG P, *et al.* Study on the HPLC characteristic chromatogram of *Pheretima* [J]. *China Pharm*, 2015, 26(21): 2971
- [11] 贺翠, 范巧佳, 宋民宪, 等. 多基原中药材对中成药的影响[J]. 华西药理学杂志, 2017, 32(5): 559  
HE C, FAN QJ, SONG MX, *et al.* Effect of multi-original Chinese medicinal materials on proprietary Chinese medicines [J]. *West China J Pharm Sci*, 2017, 32(5): 559
- [12] 李晶峰, 兰梦, 边学峰, 等. 基于聚类分析与多元统计分析的东北林蛙油及其类似品、伪品的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 111  
LI JF, LAN M, BIAN XF, *et al.* Discrimination of *Rana dybowskii*, its analogues and counterfeits based on polyacrylamide gel electrophoretograms combined with cluster analysis and multivariate statistical analysis [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2019, 25(24): 111
- [13] 徐清, 李梦, 罗雪梅, 等. 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术鉴别龟甲及其混伪品[J]. 中国现代中药, 2019, 21(9): 1251  
XU Q, LI M, LUO XM, *et al.* Identification of tortoise shells and counterfeit products by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [J]. *Mod Chin Med*, 2019, 21(9): 1251
- [14] 刘姣, 蒋超, 黄凯伟, 等. 基于特征蛋白的僵蚕配方颗粒鉴定方法[J]. 中国现代中药, 2023, 25(8): 1692  
LIU J, JIANG C, HUANG KW, *et al.* Identification method for *Jiangcan* formula granules based on characteristic proteins [J]. *Mod Chin Med*, 2023, 25(8): 1692
- [15] 唐雪梅, 魏琪, 陈璐, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析五种种子类中药炒制前后蛋白质成分的变化[J]. 成都中医药大学学报, 2021, 44(1): 66  
TANG XM, WEI Q, CHEN L, *et al.* Analysis of the changes of protein components before and after stir-frying of five kinds of seed of TCM by SDS-PAGE [J]. *J Chengdu Univ Tradit Chin Med*, 2021, 44(1): 66
- [16] 朱丽, 肖文浚, 李新霞, 等. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法同时测定不同产地大蒜药材中的蒜酶与凝集素[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(6): 948  
ZHU L, XIAO WJ, LI XX, *et al.* Simultaneous determination of alliinase and lectin in garlic from difference origins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(6): 948
- [17] 张秋红, 于姗姗, 李磊. 酸枣仁中蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析[J]. 中国现代中药, 2017, 19(7): 972  
ZHANG QH, YU SS, LI L. Analysis of protein in *Semen Ziziphi Spinosae* by polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Mod Chin Med*, 2017, 19(7): 972

(本文于 2024 年 4 月 7 日收到)