

## · 基础研究 ·

# 基于 DNA 测序技术的市售地龙类药材 基原调查与考证研究<sup>△</sup>

格小光<sup>1</sup>, 蒋超<sup>1\*</sup>, 田娜<sup>1</sup>, 魏艺聪<sup>2</sup>, 黄璐琦<sup>1</sup>, 袁媛<sup>1\*</sup>, 刘小凡<sup>3</sup>, 金艳<sup>1</sup>, 赵玉洋<sup>1</sup>

1. 中国中医科学院 中药资源中心 道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700;

2. 福建中医药大学 药学院, 福建 福州 350122; 3. 中国人民大学 统计学院, 北京 100872

**[摘要]** **目的:** 进行地龙商品基原调查和本草考证, 澄清商品地龙品种情况, 提高中药质量。**方法:** 通过随机采集安国、亳州等 7 大主流药材市场的地龙商品药材, 进行 DNA 提取和 COI 片段 PCR 扩增与核酸测序, 与建立的地龙参考核酸数据库进行比对; 对主流本草进行调查和梳理。**结果:** 我国商品地龙主要来源于 34 个物种, 22% 的基原物种为参环毛蚓(参状远盲蚓 *Amyntas aspergillum*), 22% 为通俗环毛蚓(通俗腔蚓 *Metaphire vulgaris*), 稀见栉盲环毛蚓和威廉环毛蚓(<1%), 55% 的市售地龙均非 2015 年版《中华人民共和国药典》规定基原, 而以保守腔蚓 *M. magna* 为主; 各市场主流商品地龙品种具有很大区别, 具有显著的地域性特征; 本草考证结果表明, 历代本草中地龙基原并非一种, 而是以具有“白颈”特征的环毛类蚯蚓入药, 且历代本草、标准中多有变迁。**结论:** 应建立合理、有效的地龙基原与质量控制方法。

**[关键词]** 地龙; 市场调查; 分子鉴定; COI; 本草考证

**[中图分类号]** R282.74; R282.5; R284 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2019)09-1206-09

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20190418002

## DNA Sequencing to Identify Zoological Origin of Commercial Pheretima from Chinese Herbal Markets and Discussion on Its Herbal Textual Research

GE Xiao-guang<sup>1</sup>, JIANG Chao<sup>1\*</sup>, TIAN Na<sup>1</sup>, WEI Yi-cong<sup>2</sup>, HUANG Lu-qi<sup>1</sup>, YUAN Yuan<sup>1\*</sup>, LIU Xiao-fan<sup>3</sup>, JIN Yan<sup>1</sup>, ZHAO Yu-yang<sup>1</sup>

1. State Key Laboratory of Dao-di Herbs Breeding Base, National Resource Center for Chinese Materia, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

3. School of Statistics, Renmin University of China, Beijing 100872, China

**[Abstract]** **Objective:** To clarify the zoological of commercial pheretima(*Dilong*) in herbal markets and improve the quality of the traditional medicine, the zoological origin of commercial pheretima in Chinese herbal markets was identified and its herbal textual research was discussed. **Methods:** The commercial medicinal of pheretima samples was randomly collected from 7 major herbal markets, such as Anguo, Bozhou, and so on. The DNA was extracted, the COI fragment was amplified by PCR and the DNA sequencing was analyzed. The sequencing analysis results were compared with the reference database of pheretima and the major herbal was investigated and arranged. **Results:** The commercial pheretima origin from 34 species, zoological origin of 22% samples was *Amyntas aspergillum*, 22% was *Metaphire vulgaris*, and less than 1% was *M. guillelmi* or *A. pectinifera*. Zoological origin of 55% specimens are not listed in *Chinese pharmacopoeia*, and the main species origin was *M. magna*. The result of herbal textual research showed that pheretima was a multi-origin herbal in ancient herbal textual, the morphological characteristics of earthworms which with “white neck” was used in Chinese herbal medicines. The origin of pheretima changed several times in ancient herbal textual and standard documents. **Conclusion:** The study puts forward establish new reasonable, effective quality control methods for pheretima.

**[Keywords]** pheretima; market survey; molecular identification; COI; herbal textual research

<sup>△</sup> **[基金项目]** 中央本级重大增减支项目(2060302); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008); 中国中医科学院中药资源中心自主选题(ZZXT201709)

\* **[通信作者]** 蒋超, 助理研究员, 研究方向: 中药 DNA 分子鉴定; Tel: 010-64087649, E-mail: jiangchao0411@126.com  
袁媛, 研究员, 研究方向: 中药鉴定与分子生药学; Tel: 010-64087649, E-mail: y\_yuan0732@163.com

中药商品的基原调查是正本清源,确定真伪鉴别目标,提高中药质量标准的前提条件。地龙为临床常用的动物药材,来源于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<sup>[1]</sup>。前一种习称“广地龙”,后三种习称“沪地龙”。地龙属寡毛纲环毛类蚯蚓,我国此类物种极为丰富,截止到2010年,陆栖蚯蚓已达9科31属328种(含亚种)<sup>[2]</sup>,且仍存在大量环毛类新物种<sup>[3]</sup>。目前商品地龙药材多来源于野生,随着产区的增加,各地区环毛类物种均可能被采收,致使商品地龙基原极为复杂,亟需澄清。

此前的药源调查发现商品地龙基原包括参环毛蚓、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓、栉盲环毛蚓、背暗异唇蚓 *Allolobophora caliginosa trapezoides* Ant. Dugès、壮伟环毛蚓 *P. robusta* (E. Perrier)、直隶环毛蚓 *P. tschiliensis* (Michaelsen)、白颈环毛蚓 *P. californica* (Kinberg, 1867)、保宁环毛蚓 *P. magna* (Chen, 1938)等13种<sup>[4-5]</sup>,而地区习用地龙物种曾达3科4属49种<sup>[6]</sup>。由于各地龙物种形态近似,其内脏形态、雄孔、交配腔等主要鉴别特征在加工过程中常遭损坏,体色和表面纹理特征在干燥时常消失或发生改变,导致地龙商品基原的确定仍存在困难。

近年来随着分子系统学和生物信息学的发展,包含寡毛纲在内的动植物核酸数据库已逐步建立<sup>[7-13]</sup>。本研究对历代本草、地方志、药典标准进行了考证,以确定药用地龙物种基原,并通过细胞色素c氧化酶I基因(COI)序列分析结合形态分类对收集到的232批市售商品地龙进行基原调查,为地龙的真伪鉴定提供依据。

## 1 本草考证

### 1.1 名称考证

历代本草典籍中地龙名称的源流脉络较为清晰<sup>[14-48]</sup>。地龙原称蚯蚓,入药始见东汉年间的《神农本草经》<sup>[14]</sup>:“蚯蚓,主蛇瘕,去三虫,伏尸,鬼疰,蛊毒,杀长虫,仍自化作水。”地龙之名源自“土龙”(南北朝·陶弘景《名医别录》<sup>[16]</sup>:“白颈蚯蚓,一名土龙,三月取,阴干”),唐末到五代称“地龙子”(唐·梅彪《石药尔雅》<sup>[19]</sup>:“蚯蚓尿:一名龙通粉,一名蚓场土,一名地龙粉,一名寒献玉,

一名土龙屎”;五代·孟贯《药性论》<sup>[22]</sup>:“蚯蚓,亦可单用,小毒。干者熬末用之,主蛇伤毒。一名地龙子”),宋代开始以“地龙”为名入药(王怀隐《太平圣惠方》<sup>[23]</sup>:“地龙十条炙干,上捣细罗为散。夜临卧时。以冷茶调下二钱。服之”;王继先等《绍兴本草》<sup>[26]</sup>:“白颈蚯蚓,世俗呼为地龙是矣。非止白颈者可用,其实一也”)。而后历代本草中仍有沿用“蚯蚓”或“白颈蚯蚓”的名称,一直到1963年版《中华人民共和国药典》<sup>[49]</sup>(以下简称《中国药典》)将“地龙”定为蚯蚓的药材名,正式成为法定名称。

### 1.2 品种考证

历代本草均以具有“白颈”特征的蚯蚓为药用主流品种,但药用品种不仅来源于一个物种(表1)。宋代《图经本草》<sup>[24]</sup>及《证类本草》<sup>[25]</sup>开始部分医家将“白颈蚯蚓”和“蚯蚓”分开,并附有“蜀州白颈蚯蚓”药图,认为其“功同蚯蚓”。明·李时珍《本草纲目》<sup>[32]</sup>中“蚯蚓”和“白颈蚯蚓”为不同条目,清·汪绂《医林纂要探源》<sup>[39]</sup>则明确记载“蚯蚓一名寒蠕,一名地龙,色赤气香者可用,黑而易断如烂泥者勿用。白颈者另是一种,气味犹鲜香,治热更佳”,说明人们早就认识到地龙药材的原动物不止一种,存在着品种的差异。除“白颈蚯蚓”外,古代本草也有使用“紫项蚯蚓”的记录。宋·陈自明《妇人大全良方》<sup>[50]</sup>载:“产后癫狂,仍掘紫项活地龙一条入药,候地龙滚三滚,取出地龙不用,不令带药出,但欲得地龙身上涎耳”;宋·王璆原《是斋百一选方》<sup>[51]</sup>:“败血及邪气入心,如见祟物,癫狂。用大辰砂一、二钱,研细飞过,用饮儿乳汁三、四茶匙调湿,以紫项地龙一条入药滚三滚,刮净,去地龙不用,入无灰酒一盏,分作三、四次服”;王肯堂《证治准绳》、薛己《薛氏医案》、孙一奎《赤水元珠》中也载有此类用法,但其临床用于治疗产后癫狂,与今地龙功效不同,用法也有异。综上可知,中国地龙一直以“白颈蚯蚓”为主流入药,但由于古代本草药图图影不精确,难以反映准确的物种信息,需要结合其他信息一起进行考证。

明清以前,药用地龙没有明确的产地概念,多数本草著作均认为各处均有(表1)。对清明时期地方志进行检索,发现今北京、河北、辽宁、山东、江苏、浙江、江西、广东、海南地区所产地龙均有药用记录(表2)<sup>[52]</sup>,没有显著的地理和品种偏好

性,无法考证出具体药用品种。民国以来,广地龙逐渐为大家所认可,陈仁山《药物出产辩》<sup>[44]</sup>载:“地龙以产广东顺德陈村,下溜产者为佳”,其原因

可能是广东所产参状远盲蚓、保宁腔蚓等品种体型较大,且环带明显,更符合古代“入药宜大而白颈,是其老者有力”的看法。

表1 历代本草中的地龙记载

来源	成书时间	内容	生境	条目	参考文献
《神农本草经》	东汉	主蛇瘕,去三虫,伏尸,鬼疰,蛊毒,杀长虫,仍自化作水。	平土	蚯蚓	[14]
崔豹《古今注》	晋	一名蜿螭,一名曲蟺。善长吟于地中,江东谓之歌女,或谓之鸣砌。	—	蚯蚓	[15]
陶弘景《名医别录》	南朝	一名土龙,三月取,阴干。	—	白颈蚯蚓	[16]
《本草经集注》	南朝	一名土龙,生平土,三月取,阴干。白颈是其老者尔,取破去土,盐之,日曝,须臾成水。	平土	白颈蚯蚓	[17]
孙思邈《千金翼方》	唐	一名土龙,生平土,三月取,阴干。	平土	白颈蚯蚓	[18]
梅彪《石药尔雅》	唐	蚯蚓屎:一名龙通粉,一名蚓场土,一名地龙粉,一名寒献玉,一名土龙屎。	—	蚯蚓屎	[19]
《日华子本草》	唐	又名千人踏,即是路行人踏杀者。	—	蚯蚓	[20]
韩保昇《蜀本草》	五代	一名土龙,生平土,三月取,阴干。	平土	白颈蚯蚓	[21]
孟贯《药性论》	五代	蚯蚓,亦可单用,小毒。干者熬末用之,主蛇伤毒。一名地龙子。	—	蚯蚓	[22]
王怀隐《太平圣惠方》	宋	地龙十条炙干,上捣细罗为散。夜临卧时。以冷茶调下二钱。服之。	—	治风赤眼	[23]
苏颂《图经本草》	宋	生平土,今处处平泽泉壤地中皆有之。白颈是老者耳。三月采,阴干,一云:须破去土盐之,日干。方家谓之地龙。	平土	白颈蚯蚓	[24]
唐慎微《证类本草》	宋	一名土龙,生平土,三月取,阴干。	平土	白颈蚯蚓	[25]
王继先《绍兴本草》	宋	世俗呼为地龙是矣。非止白颈者可用,其实一也。	—	白颈蚯蚓	[26]
寇宗奭《本草衍义》	宋	自死者良。	—	白颈蚯蚓	[27]
陈衍《宝庆本草折衷》	宋	一名地龙,一名地龙子,一名土龙,一名千人踏,一名曲蟺。生蜀州平土,今处处平泽泉壤地中皆有之。三月采。	蜀州平土	白颈蚯蚓	[28]
尚从善《本草元命苞》	元	平地地中皆有,三月采取,阴干。	平地	白颈蚯蚓	[29]
兰茂《滇南本草》	明	地龙名蚯蚓,又名曲蟺。	—	地龙	[30]
刘文泰《本草品汇精要》	明	颈白,身紫。	—	白颈蚯蚓	[31]
李时珍《本草纲目》	明	蚓之行也,引而后申,其蟻如丘,故名蚯蚓。	平土	蚯蚓	[32]
李中立《本草原始》	明	生平土,今处处平泽膏壤地中有之。白颈是老者。	平土	白颈蚯蚓	[33]
倪朱谟《本草汇言》	明	处处壤地多有之,孟夏始出,仲冬蛰结。雨则先出,晴则夜鸣。入药以白颈者良。	处处	蚯蚓	[34]
陈嘉谟《本草蒙筌》	清	穴居在泉壤,各处皆有。	各处	白颈蚯蚓	[35]
张志聪《本草崇原》	清	入药宜大而白颈,是其老者有力。	—	蚯蚓	[36]
汪昂《本草备要》	清	白颈乃老蚯蚓。	—	白颈蚯蚓	[37]
张璐《本经逢原》	清	蚯蚓即地龙,白颈者良。	—	蚯蚓	[38]
汪绂《医林纂要探源》	清	一名寒蟪,一名地龙,色赤气香者可用,黑而易断如烂泥者勿用。白颈者另是一种,气味犹鲜香,治热更佳。	—	蚯蚓	[39]

续表 1

来源	成书时间	内容	生境	条目	参考文献
刘若金《本草述钩元》	清	一名地龙, 入药用白颈, 是其老者。	—	白颈蚯蚓	[40]
赵其光《本草求原》	清	老即白颈, 又名地龙。	—	白颈蚯蚓	[41]
叶志诜《神农本草经赞》	清	生平土。	平土	蚯蚓	[42]
张秉成《本草便读》	清	地龙即蚯蚓, 此物蛰于土, 且所食者亦土, 善窞穴下行。	—	地龙	[43]
陈仁山《药物出产辨》	1933年	以产广东顺德陈村, 下溜产者为佳。二三月新。番禺喃咭等处产者, 泥多兼血积, 洗不净。	广东顺德	蚯蚓	[44]
陈存仁《中国药学大辞典》	1935年	<i>Perichaeta sieboldii</i> 或 <i>Lumbricus terrestris</i> 。属环节虫类之蚯蚓。	各处	蚯蚓	[45]
卫生部药政局《中药材手册》	1959年	本品为蚯蚓的干燥全虫。	全国各地	地龙	[46]
南京药学院《药材学》	1960年	蚯蚓科小蚯蚓 <i>Perichaeta sieboldii</i> 或蚯蚓 <i>Lumbricus terrestris</i> 及钜蚓科钜蚓 <i>Pheretima asiatica</i> 等动物。	广地龙: 广东、广西; 湖南、河北、山东、山西、江苏及其他等地	蚯蚓	[47]
中国医学科学院药物研究所等《中药志》	1961年	参环毛蚓 <i>Pheretima asiatica</i> Michaelsen 或缟蚯蚓 <i>Allolobophora caliginosa</i> Trapzoides。	广地龙产广东、广西; 土地龙产青海、河南、山东、山西	地龙	[48]

注: —表示未记载本条目内容。

表 2 地方志中的地龙药用记录

地方志	成书时间	内容
《密云县志》	清	地龙
《宛平县志》	清	地龙
《大兴县志》	清	地龙
《扬州市志》	清	白颈蚯蚓
《赣川县志》	明	地龙
《庐州县志》	清	白颈蚯蚓
《惠州县志》	明	金钱地龙
《东莞县志》	清	蚯蚓, 俗呼哦犬, 可入药
《山东通志》	清	蚯蚓, 一名曲蟥, 又名地龙, 可入药
《盛京通志》	清	蚯蚓, 俗呼曲蟥, 白颈者入药
《莒州志》	清	蚯蚓, 一名曲蟥, 又名地龙, 可入药
《定安县志》	清	蚯蚓, 一名地龙, 可治热病
《广东通志》	清	白头者老大, 可用以酒炒, 服之治瘟疫甚效
《宁都直隶州志》	清	入药用白颈者
《琼山县志》	清	白颈是其老者, 用入药
《湖雅》	清	白颈者入药, 名地龙

## 2 市场调查研究

### 2.1 材料

2.1.1 样品 地龙药材和饮片采集于河北安国、安徽亳州、四川荷花池、广西玉林、广东清平、广东

普宁、山东舜王城中药材市场, 共收集样品 232 批。样品经上海交通大学邱江平教授进行形态学初步鉴定后经 DNA 测序结果进一步验证。地龙对照药材购自中国食品药品检定研究院, 凭证标本保存于中国中医科学院中药资源中心, 见表 1。另有 20 种蚯蚓原动物参考样品由西南大学刘彬教授课题组提供, 60 种蚯蚓原动物样品由上海交通大学邱江平教授课题组提供。

2.1.2 试剂 蛋白酶 K (德国默克公司, 批号: 1245680100); SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶 (大连 Takara 公司, 批号: RR070A); 2000 bp DNA Marker (大连 Takara 公司, 批号: D501A); DNeasy Blood & Tissue DNA 提取试剂盒 (上海凯杰企业管理有限公司, 批号: 69506); 溴化乙锭试剂 (美国 Fluka 公司, 批号: E8751-1G)。

2.1.3 仪器 MM 400 混合型碾磨仪 (德国 Retsch 公司); Veriti 96 孔梯度 PCR 扩增仪 (美国 Applied Biosystem 公司); SYNGENE 凝胶成像系统 (香港 GENE 公司); Nanodrop 2000 微量核酸定量分析仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

### 2.2 方法

2.2.1 DNA 提取 样品除去泥土, 使用 70% 乙醇擦拭表面, 晾干。球磨粉碎, 取粉末约 50 mg, 置洁净的 2 mL 离心管中, 加液氮冷冻后经碾磨仪研磨至粉

末,按照 DNeasy Blood & Tissue DNA 提取试剂盒说明书提取总 DNA,采用 Nanodrop 2000 微量核酸定量分析仪测定其浓度,用于 PCR 反应或于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**2.2.2 PCR 扩增及电泳检测** 取所提取的 DNA,使用 COI 通用引物 LCO1490:  $5'\text{-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'}$  和 HCO2198:  $5'\text{-TTA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'}$  进行 PCR 扩增<sup>[13]</sup>。PCR 反应体系为  $25\text{ }\mu\text{L}$ , 包含无菌双蒸水  $19\text{ }\mu\text{L}$ ,  $10\times\text{FBI}$  缓冲液  $2.5\text{ }\mu\text{L}$ , dNTP( $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )  $1.5\text{ }\mu\text{L}$ , LCO1490 和 HCO2198 引物各  $0.25\text{ }\mu\text{L}$  ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶 ( $5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )  $0.3\text{ }\mu\text{L}$ , DNA 模板  $1\text{ }\mu\text{L}$ 。COI 序列扩增程序为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $30\text{ s}$ , 5 个循环;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $30\text{ s}$ ,  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  退火  $30\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $30\text{ s}$ , 35 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  终延伸  $5\text{ min}$ 。扩增结束后取  $5\text{ }\mu\text{L}$  PCR 产物,加入  $5\text{ }\mu\text{L}$   $6\times$  Loading buffer 于溴化乙锭染色的  $1.5\%$  琼脂糖凝胶电泳检测,SYNGENE 凝胶成像系统观察。

**2.2.3 测序及数据处理** 取阳性扩增产物,经纯化后以对应引物进行双向测序,测序由睿博兴科生物技术有限公司完成。使用 BioEdit 7.2.6 软件对测序峰图和序列进行校对、去除引物序列及拼接,获得对应质量合格的 DNA 序列,经将数据在 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 和地龙原动物数据库(上海交通大学建立)<sup>[7-9]</sup> 进行 BLAST 比对,获得最相似物种信息。利用 MEGA 6.0 对获得的单倍型序列进行分析,基于 Kimura-2-parameter 模型计算遗传距离,使用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,并使用 Bootstrap 自举检验法检验各分支的支持率,Bootstrap 值设定为 1000 次重复。

### 2.3 结果与分析

**2.3.1 商品地龙形态分析** 商品地龙药材根据体型大小、颜色和质地可明显分为 4 类:1) 体长超过  $30\text{ cm}$ 、背部棕黑色到紫黑色、刚毛粗糙的海南地龙类(海南地龙、海南山地龙),2) 体长  $20\sim 30\text{ cm}$ 、背部黄棕色到深棕色的广西地龙类(广西地龙、广地龙),3) 体长  $20\text{ cm}$  以下、背部黄色到棕色、质地较软的沪地龙类(沪地龙、河南地龙、山东地龙、小地龙),以及 4) 体长  $20\sim 30\text{ cm}$ 、呈板片状、全体红棕

色的进口地龙类(泰国地龙、越南地龙)(图 1)。同类地龙因加工方式不同表面颜色具有差异,环带位置和形态清晰,部分样品可见背孔或雄孔,然而多数样品缺乏准确的形态鉴别特征。为确定市售地龙药材基原,本研究对所有样品的 COI 片段进行扩增、测序及比对分析。

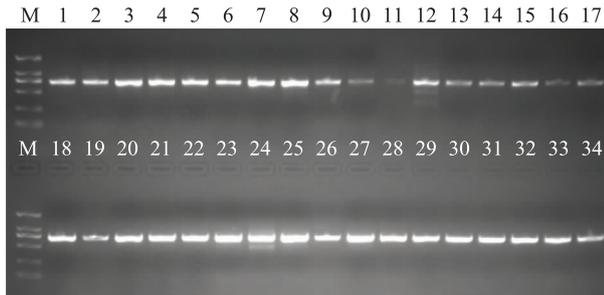


注: A. 泰国地龙; B. 沪地龙; C. 广地龙; D. 海南地龙。

图 1 商品地龙形态

**2.3.2 COI 序列分析与基原鉴定** 使用试剂盒提取的地龙类样品总 DNA 质量浓度一般为  $30\sim 220\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。232 批样品使用 LCO1490/HCO2198 引物扩增成功率为  $100\%$ (图 2)。取 PCR 扩增产物进行 DNA 测序,其中 2 批样品扩增产物测序失败,共计 230 批样品获得 COI 序列,去除引物区后长度均为  $658\text{ bp}$ 。所获得的 230 条 COI 序列经与 NCBI 数据库及地龙原动物数据库进行 BLAST 比对,共与 34 种蚯蚓物种近似,含 4 种药典品:参环毛蚓(参状远盲蚓 *A. aspergillus*)、通俗环毛蚓(通俗腔蚓 *M. vulgaris*)、威廉环毛蚓(威廉腔蚓 *M. guillelmi*)、栉盲环毛蚓(栉盲远盲蚓 *A. pectiniferus*)<sup>[53]</sup> 和 30 种非《中国药典》收录品种:阿美远盲蚓 *A. amis*、多肉远盲蚓 *A. carnosus*、皮质远盲蚓 *A. corticis*、内栖远盲蚓 *A. endophilus*、褐色远盲蚓 *A. fuscatus*、优雅远盲蚓 *A. gracilis*、海南远盲蚓 *A. hainanicus*、异骈远盲蚓 *A. incongruus*、毛利远盲蚓 *A. morrissi*、暗孔远盲蚓 *A. octopapillatus*、丘疹远盲蚓 *A. papulosus*、壮伟远盲蚓 *A. robustus*、缺管远盲蚓 *A. triastriatus*、张氏远盲蚓 *A. zhangii*、舒脉腔蚓

*Duplodicodrilus schmardae*、安德爱胜蚓 *Eisenia andrei*、加州腔蚓 *M. californica*、砺石腔蚓 *M. glareosa*、保宁腔蚓 *M. magna*、钩腺腔蚓 *M. sieboldi*、直隶腔蚓 *M. tschiliensis*、*A. arenulus*、*A. emarcidus*、*A. jiriensis*、*A. limellus*、*A. phaselus*、*A. stricosus*、*M. bahli*、*M. birmanica*。



注：泳道M为DL2000分子量标准，泳道1~34为部分市售地龙PCR扩增结果。

图2 部分地龙药材COI引物扩增凝胶电泳结果

2.3.3 商品地龙基原的市场调查 基于抽检的商品地龙检测结果，从不同商品类别、不同产地、不同市场3个维度对成功获得COI序列的230批样品进行市场调查分析(图3)。结果表明，在所收集的样品中，22%的基原物种为参环毛蚓(参状远盲蚓 *Amyntas aspergillum*)，22%为通俗环毛蚓(通俗腔蚓 *Metaphire vulgaris*)，稀见栉盲环毛蚓和威廉环毛蚓(<1%)；55%的市售地龙均非2015年版《中国药典》规定基原，而以保宁腔蚓 *M. magna* 为主。河北安国、安徽亳州和广西玉林是我国地龙交易的主要场所，而其他广东清平、广东普宁、四川荷花池、山东舜王城交易量较小。各市场交易的主流品种具有很大区别，安国药材市场地龙商品以广西地龙和海南地龙为主，主要基原为参环毛蚓和保宁腔蚓；安徽亳州以沪地龙和海南地龙为主，主要基原为通俗环毛蚓和保宁腔蚓；广西玉林和四川荷花池均以广地龙和广西地龙为主，主要基原为参环毛蚓。

基于COI的BLAST比对和系统发育树结果表明，商品地龙共来源于34种，各商品地龙具有相对固定的物种基原，其中海南地龙、海南山地龙主要来源于保宁腔蚓，广西地龙主要来源于参环毛蚓、保宁腔蚓，广地龙主要来源于参环毛蚓、保宁腔蚓，沪地龙主要来源于通俗环毛蚓。河南地龙、山东地龙、江苏地龙等虽然来源地不同，但基原均以通俗环毛蚓为主。

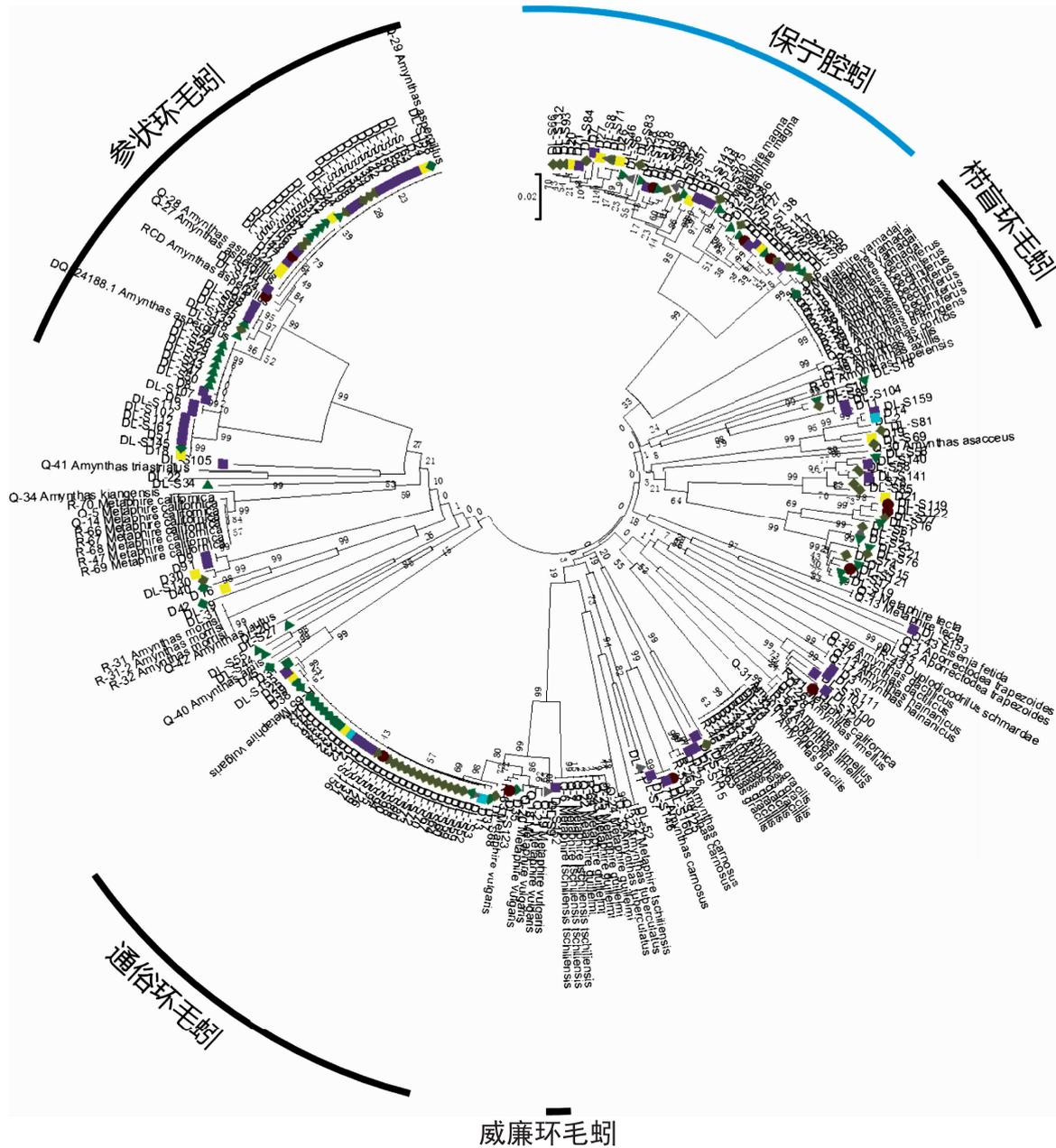
### 3 讨论

#### 3.1 市售地龙基原复杂

我国药材市场市售地龙基原非常复杂，本研究测序成功样品共230批，经DNA序列分析共检出34个不同物种。此前，陈平等<sup>[5]</sup>使用形态学对我国地龙进行药源及商品调查，认为地龙原动物有13种，90%以上为正品地龙，其余主要为背暗异唇蚓、湖北环毛蚓、秉前环毛蚓等。然而本研究发现市售地龙55%为非药典品，主要品种为保宁腔蚓，未发现背暗异唇蚓、秉前环毛蚓等基原。郭利霄等<sup>[4]</sup>使用微性状对地龙进行基原鉴定，采集了3个市场13批样品，发现其混伪品来源包括保宁腔蚓、直隶腔蚓、壮伟远盲蚓、加州远盲蚓等；孙洁等<sup>[54]</sup>使用形态鉴定和DNA测序鉴定发现广地龙主要来源于参环毛蚓、保宁腔蚓和暗孔远盲蚓等3种，本研究发现市售地龙除这些来源外，还包括褐色远盲蚓 *A. fuscatus*、优雅远盲蚓 *A. gracilis* 等30余种，表明市售地龙基原非常混乱，需要进一步澄清。

#### 3.2 历代药用地龙并非一种

我国历代医家主流以“白颈蚯蚓”入药，而“白颈蚯蚓”并非是特定的某一属一种，而是体型较大，环带白色或类白色，膨大明显的蚯蚓物种。从地理来看，历代本草大多认为药用蚯蚓“生平土”，且“处处有之”，历代地方志中北至辽宁沈阳，南至海南琼山，西至四川成都、东至浙江扬州均有地龙的药用记录。从本草药图来看，药用地龙颜色多种，且均具有显著的环带，符合钜蚓科环毛蚓属 *Pheretima* 的特点，但均缺乏物种鉴别特征，无法判定具体药用物种。民国到建国以来逐渐认可广地龙，陈仁山《药物出产辨》<sup>[44]</sup>明确提出“蚯蚓以产广东顺德陈村，下溲产者为佳”，而同时期陈存仁认为药用蚯蚓来源于“*Perichaeta sieboldii* 或 *Lumbricus terrestris*”，但其《中国药物标本图影》图片地龙药材体环清晰，先端膨大(图4A、B)，更类似于参环毛蚓(*P. aspergillum*)或保宁腔蚓的形态特征(图4C)。南京药学院《药材学》引述了陈存仁《中国药学大辞典》的观点，并进行了药源调查，认为地龙来源于“蚯蚓科小蚯蚓 *Perichaeta sieboldii* 或蚯蚓 *Lumbricus terrestris* 及钜蚓科钜蚓 *Pheretima asiatica* 等动物”，同时又认为“广地龙的干制药材，约包含秉氏蚓 *Pheretima pingi* 和参蚓 *P. aspergillum* 两种”，

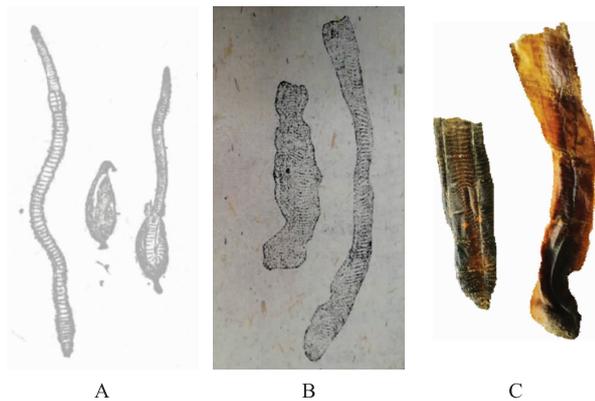


注：紫色方框．来源于玉林；绿色三角形．来源于安国；土黄色菱形．来源于亳州；灰色三角形．山东舜王城；红色圆形．来源于广州清平；黄色方框．来源于四川荷花池；蓝色方框．来源于广东普宁。

图3 市售地龙样品 COI 序列物种分析

而后《中药志》采用了《药材学》和《中国药典大辞典》的部分观点，认为地龙来源于参环毛蚓或缟蚯蚓，但其错将参环毛蚓拉丁学名定为《中国药典大辞典》中的钜蚓 *Pheretima asiatica*，实际 *Pheretima asiatica* 为直隶腔蚓 *Metaphire tschiliensis* 的异名，而非 *Pheretima aspergillum*。而后 1963 年版《中国药典》沿袭了《中药志》的做法，认为地龙来源于参环毛蚓或缟蚯蚓，也同样将参环毛蚓定为 *Pheretima*

*asiatica*。1977 年版《中国药典》对此进行了修订，认为地龙来源于参环毛蚓或缟蚯蚓，同时将参环毛蚓拉丁学名定为 *Pheretima aspergillum*。1995 年版《中国药典》取消了缟蚯蚓的用药标准，同时采纳《上海市中药材标准》的做法将“沪地龙”列入，规定广地龙基原为参环毛蚓，沪地龙基原为通俗环毛蚓、威廉环毛蚓或栉盲环毛蚓，而后一直沿用至今。



注: A. 中国药典大辞典(1935年出版); B. 中国药物标本图影(1935年编); C. 市售保宁腔蚓和参环毛蚓照片。

图4 本草中的地龙图片

《中药志》认为土地龙基原为缟蚯蚓 *Allolobophora caliginosa* (Savigny) *trapzoides*, 产河南中牟、山东梁山、山西等地。但缟蚯蚓 *Allolobophora caliginosa* 为梯形流蚓 *Aporrectodea trapezoides* 的异名, 梯形流蚓是新疆、河北、北京等地的优势物种, 而其环带不明显, 呈半环状, 形态上并非“白颈蚯蚓”。而通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris* 是河南中牟、山东梁山等地的优势蚯蚓, 从河南、山东等地采集的地龙药材经检测均为通俗环毛蚓 *Pheretima vulgaris*, 地方志(《山东通志》《莒州志》)也表明历来有蚯蚓药用记录, 1995年版《中国药典》取消了缟蚯蚓的用药标准, 加入通俗环毛蚓具有合理性。

### 3.3 《中国药典》基原及质控的探讨

从考证结果可看出, 历代药用地龙并非一种, 而是所有具有“白颈”特征的环毛类蚯蚓的统称, 且均缺乏准确的形态特征描述。首先, 历代北至辽宁沈阳, 南至海南琼山, 西至四川成都、东至浙江扬州均有药用地龙的出产, 而《中国药典》收录的4种地龙在很多产地并无分布。其次, 自清末部分本草引入拉丁学名以来, 地龙基原拉丁学名不断更替, 包括 *Perichaeta sieboldii*、*Lumbricus terrestris*、*Pheretima aspergillum*、*Pheretima asiatica*、*Pheretima pingi*、*Allolobophora caliginosa* 等物种均有药用记录, 难以确定药用物种的基原。此外, 历版《中国药典》收录地龙基原从 *Pheretima asiatica*、*Allolobophora caliginosa trapzoides* 到 *Pheretima aspergillum*、*Allolobophora caliginosa trapzoides* 再到 *Pheretima aspergillum*、*P. vulgaris*、*P. guillelmi*、*P. pectinifera*, 历经多次修订, 尤其是无“白颈”的背暗异唇蚓 *A. caliginosa*

*trapzoides* 的收载, 表明中医药工作者对其基原可能难以达成共识, 其基原的确定可能既有本草考证, 也有资源蕴藏量和质量控制的考量。尤其是本研究表明, 目前我国市售地龙至少来源于34个物种, 而随着传统产地资源的萎缩, 地龙产地扩大化, 以及新地龙物种的不断发现, 未来市售地龙基原可能进一步增多, 目前的性状、显微、理化手段均无法准确判定市售地龙的物种基原, 未来地龙的基原鉴定将更为困难。为进一步控制, 可考虑引入DNA分子鉴定等准确的鉴别手段, 并加大地龙养殖力度, 逐渐引导用地龙向参环毛蚓等传统药用品种靠拢, 从资源和检测两个角度入手解决地龙品种混乱问题。

### 参考文献

- [1] 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,2015:122.
- [2] 徐芹,肖能文. 中国陆栖蚯蚓[M]. 北京:中国农业出版社,2010:17.
- [3] 赵琦. 中国海南岛环毛类蚯蚓分类学、系统发育学和古生物地理学研究[D]. 上海:上海交通大学,2015.
- [4] 郭利霄,王乾,张丹,等. 不同产地地龙药材的显微性状鉴别及品质研究[J]. 中药材,2018,41(1):67-70.
- [5] 陈平,叶叶祥,严宜昌,等. 中药地龙的药源调查与商品鉴定[J]. 中草药,1997,10(8):492-495.
- [6] 李廷利,李玉萍,冯翰. 地龙的化学成分与临床应用概况[J]. 黑龙江医药,2006,19(4):303-304.
- [7] SUN J, JAMES S W, JIANG J, et al. Phylogenetic evaluation of *Amyntas* earthworms from south China reveals the initial ancestral state of spermathecae[J]. Mol Phylogenet Evol, 2017,115:106-114.
- [8] ZHANG L, SECHI P, YUAN M, et al. Fifteen new earthworm mitogenomes shed new light on phylogeny within the *Pheretima* complex[J]. Sci Rep, 2016,6:20096.
- [9] ZHAO Q, CLUZEAU D, JIANG J B, et al. Molecular phylogeny of pheretimoid earthworms (Haplotaxina; Megascolecidae) based on mitochondrial DNA in Hainan Island, China[J]. Mol Biol, 2015,4(4):1-6.
- [10] ASPE N M, KAJIHARA H, JAMES S W. A molecular phylogenetic study of pheretimoid species (Megascolecidae) in Mindanao and associated islands, Philippines[J]. Eur J Soil Biol, 2016,73:119-125.
- [11] JERATTHITIKUL E, BANTAOWONG U, PANHA S. DNA barcoding of the Thai species of terrestrial earthworms in the genera *Amyntas* and *Metaphire* (Haplotaxida: Megascolecidae)

- dae)[J]. Eur J Soil Biol, 2017, 81: 39-47.
- [12] 马梅, 李薇, 龚玲, 等. 基于 COI 和 16S rRNA 基因的地龙药材及其混淆品的 DNA 条形码鉴定[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(5): 595-598.
- [13] 张辉, 姚辉, 崔丽娜, 等. 基于 COI 条形码序列的《中国药典》动物药材鉴定研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2013, 15(3): 371-380.
- [14] 侯名. 神农本草经[M]. 吴普, 述. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 123.
- [15] 崔豹. 古今注[M]. 北京: 中华书局, 1985: 16.
- [16] 侯名. 名医别录[M]. 尚志钧, 辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1986: 324.
- [17] 陶弘景. 本草经集注[M]. 尚志钧, 尚元胜, 辑校. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 445.
- [18] 孙思邈. 千金翼方[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 43.
- [19] 梅彪. 石药尔雅[M]. 北京: 中华书局, 1985: 3.
- [20] 佚名. 日华子本草[M]. 芜湖: 皖南医学院科研处, 1983: 105.
- [21] 韩保升. 蜀本草[M]. 尚志钧, 辑复. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2005: 190.
- [22] 侯名. 药性论[M]. 尚志钧, 辑. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2006: 60.
- [23] 王怀隐. 太平圣惠方: 卷三十五[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 167.
- [24] 苏颂. 图经本草[M]. 福州: 福建科学出版社, 1988: 463.
- [25] 唐慎微. 重修政和经史证类备用本草[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1957: 445.
- [26] 王继先. 绍兴本草所有注[M]. 尚志钧, 校注. 北京: 中医古籍出版社, 2007: 493.
- [27] 寇宗奭. 本草衍义[M]. 颜正华, 点校. 北京: 人民卫生出版社, 1990: 127.
- [28] 陈衍. 宝庆本草折衷[M]. 郑金生, 张同君, 编校. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 151.
- [29] 尚从善. 中国本草全书: 第 22 卷 本草元命苞[M]. 北京: 华夏出版社, 1999: 311.
- [30] 兰茂. 滇南本草[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 87.
- [31] 刘文泰. 本草品汇精要: 卷三十一[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 742.
- [32] 李时珍. 本草纲目: 下册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 2353.
- [33] 李中立. 本草原始[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 658.
- [34] 倪朱谟. 本草汇言[M]. 戴慎, 陈仁寿, 虞舜, 点校. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 1040.
- [35] 陈嘉谟. 本草蒙筌[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 418.
- [36] 张志聪. 本草崇原[M]. 刘小平, 点校. 北京: 中国中医药出版社, 1992: 145.
- [37] 汪昂. 本草备要[M]. 陈赞育, 点校. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1997: 81.
- [38] 张璐. 本经逢原[M]. 赵小青, 裴晓峰, 校注. 北京: 中国中医药出版社, 1996: 229.
- [39] 汪绂. 医林纂要探源[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 249.
- [40] 杨时泰. 本草述钩元: 37 卷[M]. 上海: 上海科技卫生出版社, 1958: 578.
- [41] 赵其光. 本草求原[M]. 广州: 广东科技出版社, 2009: 948.
- [42] 叶志洗. 神农本草经赞[M]. 王加峰, 展照双, 杨海燕, 校注. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 154.
- [43] 张秉成. 本草便读[M]. 上海: 上海卫生出版社, 1958: 116.
- [44] 陈仁山, 蒋森, 陈思敏. 药物出产辨(二十四)[J]. 中药与临床, 2014, 5(6): 69.
- [45] 陈存仁. 中国药学大辞典[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1956: 1230.
- [46] 卫生部药政管理局. 中药材手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1959: 484.
- [47] 南京药学院药材教研组. 药材学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1960: 1180.
- [48] 中国医学科学院药物研究所等. 中药志: 第 4 册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1961: 31.
- [49] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 96.
- [50] 陈自明. 妇人大全良方[M]. 王咪咪, 整理. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 541.
- [51] 王璆. 是斋百一选方[M]. 刘耀, 张世亮, 点校. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 172.
- [52] 王祖望. 中华大典·生物学典·动物分典: 第 1 册[M]. 昆明: 云南教育出版社, 2015: 698.
- [53] 蒋超, 黄璐琦, 袁媛, 等. 《中国药典》动物药材基原物种中文名和拉丁学名引证规范[J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(7): 772-782.
- [54] 孙洁, 魏劲恒, 毛润乾, 等. 广地龙古今入药品种对比研究[J]. 中药材, 2018, 41(6): 1312-1316.

(收稿日期: 2019-04-18 编辑: 戴玮)