

REFERENCES

- [1] TANKA K, HEARSE D J. Reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rabbit heart characterization of the influence of the duration of regional ischemia and the extracellular potassium concentration [J]. J Mol Cell Cardiol, 1988, 20(3): 21-7.
- [2] JIAO C W, FU R F, HAN S N, et al. Effects of pretreatment with prostaglandin E₁ on potassium channels in ischemia/reperfusion guinea pigs ventricular myocytes [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2013, 29(7): 1030-1031.
- [3] PETER J, HANLEY, JÜRGEN DAUT. K_{ATP} channels and preconditioning: A re-examination of the role of mitochondrial K_{ATP} channels and an overview of alternative mechanisms [J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 39(1): 17-50.
- [4] HAN S N, CHEN Q, ZHANG Y, et al. Inhibition of delayed rectifier K⁺ current on guinea pig ventricular myocytes and HERG K⁺ channel expressed in HEK-293 cells by fluconazole [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2010, 26(7): 861-866.
- [5] ZHANG Y X, LIU D H, JIAO C W, et al. Effect of prostaglandin E₁ on PKC and HSP70 in ischemia-reperfusion preconditioning Myocytes [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2010, 27(3): 402-405.
- [6] SKRZYPIEC-SPRING M, GROTHUS B, SZELAG A, et al. Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2007, 55(2): 113-126.
- [7] YU L, YIN Y Q, LI X, et al. Effects of taurine magnesium coordination compound on potassium current in guinea pig ventricular cardiomyocytes [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2008, 24(2): 203-205.
- [8] ZHANG D J, DU H, LIU M C, et al. Influence of *Oxytropis falcate* Bunge on NO and NOS of myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2013, 30(10): 1054-1058.
- [9] CHEN W T, LI X, NI Y J, et al. Bisoprolol reverse down-regulated I_{to} and I_{K1} in left ventricle of rabbits with heart failure [J]. Mol Cardiol China(中国分子心脏病学杂志), 2013, 13(1): 419-423.
- [10] YAO T, CAO J M, FAN X L, et al. Physiology(生理学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005: 129.
- [11] REN J T, WANG H, WANG T Z, et al. Effects of captopril on I_{to} and I_{K1} channels of volume overloaded heart failure rats [J]. J Xi'an Jiaotong Univ(Med Sci)(西安交通大学学报: 医学版), 2013, 34(1): 50-53.
- [12] LIU Q H, WU B W, ZHANG Y, et al. Zocopride enhances inward rectifier potassium current(I_{K1}) to antagonize arrhythmias [J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2010, 26(6): 1041-1046.
- [13] DIAZ R J, ZOBEL C, CHO C, et al. Selective inhibition of inward rectifier K⁺ channels (Kir2.1 or Kir2.2) abolishes protection by ischemic preconditioning in rabbit ventricular cardiomyocytes [J]. Circ Res. 2004, 95(3): 325-332.

收稿日期: 2013-10-29

地黄块根中化学成分变化规律及其组织结构相关性研究

陈随清, 陈燕, 姜迪, 张飞(河南中医学院, 郑州 450046)

摘要: 目的 研究地黄在生长过程中化学成分含量的变化, 确定地黄主要化学成分动态积累的规律及其组织结构变化的相关性, 确定最佳采收期。方法 采用 HPLC 对地黄中梓醇、毛蕊花糖苷进行含量测定; 采用 RP-HPLC-RID 对地黄中单、寡糖进行含量测定; 采用硫酸-苯酚法对地黄中多糖含量进行测定; 采用氨基酸自动分析仪测定地黄中氨基酸含量; 采用 SPSS 软件对各成分进行主成分分析; 通过制作石蜡切片、徒手切片观察地黄组织结构变化; 并采用 SPSS 软件对其化学成分含量与其组织结构间的相关性进行分析。结果 地黄 85-5 中梓醇含量与木质部比例、皮层比例有显著相关性, 多糖含量与韧皮部比例有显著相关性, 水苏糖含量与木质部比例、韧皮部占木质部比例、皮层比例、分泌细胞数目有显著相关性; 北京 3 号中氨基酸含量与皮层比例、分泌细胞数目有显著相关性。结论 地黄块根中各化学成分均在 10 月下旬至 11 月上旬含量较高, 此时块根韧皮部比例最小, 木质部比例最大, 与传统地黄采收期相吻合。

关键词: 地黄; 化学成分; 石蜡切片; 动态积累; 主成分分析

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)08-0946-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.010

基金项目: 十二五国家科技支撑计划(2011BAI06B02); 中央本级重大增减支项目(20603020222)

作者简介: 陈随清, 男, 博士, 教授 Tel: (0371)65676686 E-mail: suiqingchen@sohu.com

Correlative Analysis Between Change Regularity of Chemical Composition and Organizational Structure in *Rehmannia Glutinosa* Libosch

CHEN Suiqing, CHEN Yan, JIANG Di, ZHANG Fei(Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the changes of chemical composition in *Rehmannia glutinosa* during the growth process. And to determine the correlation between the accumulation trends of main chemical composition and changes of organizational structure. To determine the best harvesting time of *Rehmannia glutinosa*. **METHODS** Content of catalpol and verbascoside in *Rehmannia glutinosa* were determined by HPLC; monosaccharide and oligosaccharide in *Rehmannia glutinosa* were determined by the method of RP-HPLC-RID; polysaccharide in *Rehmannia glutinosa* were determined by the method of phenol-sulfuric; amino acids in *Rehmannia glutinosa* were determined by automatic amino acid analyzer. SPSS software were used to have the principal components analysis for each chemical composition to observe the changes of organizational structure through the paraffin section and freehand section. SPSS software were used to analysis the correlation between the content of chemical composition and organizational structure. **RESULTS** There were significant correlations between the content of catalpol and the proportion of the xylem, the cortex; the content of polysaccharide and the proportion of the phloem; the content of stachyose and the proportion of the xylem, the phloem of xylem, the cortex, the numbers of secretory cell in 85-5. There were significant correlations between the content of amino acid and the proportion of the cortex, the numbers of secretory cell in Beijing-III. **CONCLUSION** The content of chemical composition in root tuber of *Rehmannia glutinosa* is higher from late October to early November, during this period, the proportion of phloem in root tuber is smallest and the proportion of xylem in root tuber is biggest, it is coincided with the traditional harvest of *Rehmannia glutinosa*. **KEY WORDS:** *Rehmannia glutinosa* Libosch; chemical composition; paraffin section; dynamic accumulation; the principal components analysis

中药地黄来源于玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的块根,始载于《神农本草经》,被列为上品。近年来对地黄的研究主要集中在地黄的化学成分^[1-3]、药理作用、组织结构^[4]等方面,而对其生长过程中主要化学成分动态积累规律的研究相对较少,对不同时期地黄主要成分含量变化与其组织结构之间的相关性研究更少,而化学成分的积累动态与其组织结构的相关性将为适宜采收期的确定提供理论依据。本研究测定了 2 个品种、7 个生长期地黄中不同化学成分的含量,同时将 7 个生长期的地黄做成石蜡切片以观察组织结构的变化,并对 2 个品种、7 个生长期地黄化学成分的积累动态与其组织结构相关性进行了分析研究,为地黄药材的质量评价及适宜采收期的确定提供科学依据。

1 材料、仪器与试剂

1.1 材料

地黄样品采自河南省温县宛西制药股份有限公司规范化种植基地,地黄 85-5、北京 3 号为目前河南怀地黄产区的主流品种,经河南中医学院生药学科陈随清教授鉴定为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch 的块根。用于含量测定的样品:新鲜地黄块根,切片,60℃烘干;用于显微观测的样品:新鲜地黄块根,切 0.5~0.6 cm 小

段,用 70%乙醇-冰醋酸-40%甲醛(90:5:5)固定。

1.2 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪(2998 紫外检测器,2414 示差折光检测器,美国 Waters);岛津 UV-2600 紫外可见分光光度计(日本岛津);CX31 显微镜(OLYMPUS);梓醇对照品(中国药品生物制品检定所,批号:110808-201009,纯度:100%);毛蕊花糖苷对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号:111530-200706,纯度:100%);葡萄糖对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号:110833-200503,纯度:100%);蔗糖对照品(中国药品生物制品鉴定所,批号:111507-200302,纯度:100%);水苏糖对照品(天津一方科技有限公司,批号:BBT0176,纯度:100%);棉籽糖对照品(天津一方科技有限公司,批号:BBT0177,纯度:100%);甲醇、乙醇均为色谱醇(美国 Fisher Scientific);水为双蒸水,其余所用试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 地黄化学成分的测定

2.1.1 梓醇、毛蕊花糖苷、水溶性浸出物的含量测定 根据中国药典 2010 版相关项进行。对梓醇、毛蕊花糖苷含量测定进行了方法学研究,考察稳定性试验、重现性试验、精密度试验以及加样回收率试验,结果均符合含量测定要求,含量测定

结果见表 1, 2 种成分的对照品 HPLC 图谱见图 1。

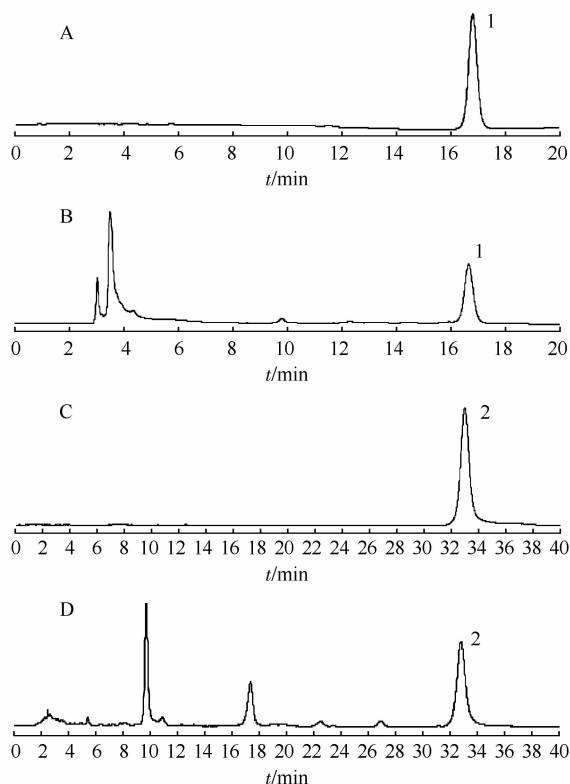


图 1 HPLC 色谱图

A-梓醇对照品; B, D-地黄样品; C-毛蕊花糖苷对照品; 1-梓醇; 2-毛蕊花糖苷。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-catalpol reference; B, D-sample of *Rehmannia glutinosa*; C-verbas-coside reference; 1-catalpol; 2-verbas-coside.

2.1.2 多糖的含量测定 取地黄粉末 0.1 g 置于具塞锥形瓶中, 加 95%乙醇溶液 50 mL, 振荡 2 h, 取出过滤, 再加 80%乙醇溶液 50 mL, 振荡 2 h, 取出过滤, 滤渣晾干, 加 50 mL 蒸馏水, 放置水浴锅中温浸 3 h。取出过滤, 取续滤液 3 mL 置 10 mL 量瓶中, 加蒸馏水至刻度即得供试品溶液。取制备好的供试品溶液 2 mL, 置 10 mL 的具塞试管中, 加 5%的苯酚溶液 1 mL, 摇匀, 加浓硫酸 5 mL, 静置 5 min, 水浴加热 15 min, 取出冷却至室温, 紫外可见分光光度法测定其吸光度。对试验的稳定性、重现性、精密度以及加样回收率进行了研究, 测得结果均符合含量测定要求。线性回归方程: $Y=14.801X-0.0011$, $r=0.9999$, 线性范围: 20.2~121 μg 。含量测定结果见表 1。

2.1.3 单、寡糖的含量测定^[5] 精密称定样品粉末 1.5 g, 置具塞锥形瓶中, 加水 50 mL, 称定重量, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h, 放冷, 再称定重量, 用双蒸水补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液

20 mL, 用等量石油醚、乙酸乙酯依次萃取 2 次, 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 续滤液即为供试品溶液。高效液相色谱法测定单、寡糖的含量, 色谱条件: 色谱柱: Agilent ZORBAX-NH₂(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-水=70:30; 流速: 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量: 20 μL 。对试验的稳定性、重现性、精密度以及加样回收率进行了研究, 结果均符合含量测定要求。线性范围试验, 葡萄糖: $Y=7\,009.1X-861.79$, $r=0.9999$, 线性范围 1.555~18.66 μg ; 蔗糖: $Y=7\,133.6X-5\,972$, $r=0.9999$, 线性范围: 12.375~86.625 μg ; 棉籽糖: $Y=5\,380.4X-1\,498.5$, $r=0.9998$, 线性范围: 5.79~34.74 μg ; 水苏糖: $Y=6\,023.3X-7\,301.2$, $r=0.9997$, 线性范围 92.2~461 μg 。含量测定结果见表 1。对照品及样品 HPLC 色谱图见图 2。

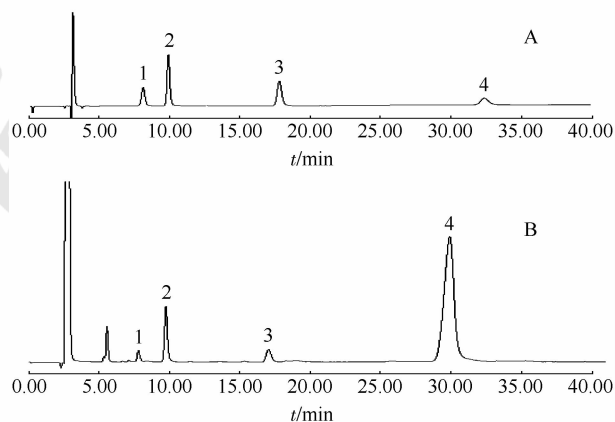


图 2 地黄中单、寡糖色谱图

A-混合对照品; B-地黄样品; 1-葡萄糖; 2-蔗糖; 3-棉籽糖; 4-水苏糖。

Fig. 2 HPLC Chromatograms of monosaccharide and oligo-saccharides in *Rehmannia glutinosa*

A-mixed control; B-sample; 1-glucose; 2-sucrose; 3-raffinose; 4-stachyose.

2.1.4 氨基酸的含量测定 精密称取药材粉末 0.1 g, 置水解管内, 加 6 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸 10 mL。加新蒸馏苯酚 3 滴, 再将水解管放入冰中, 冷冻 5 min, 抽真空后充入氮气, 重复 3 次。将水解管放入恒温干燥箱, 110 $^{\circ}\text{C}$ 水解 22 h, 取出冷却至室温滤过, 取滤液 1 mL 于 5 mL 量瓶内, 双蒸水定容。用真空干燥箱 50 $^{\circ}\text{C}$ 干燥, 残留物用双蒸水水解, 再干燥, 反复进行 2 次, 用 1 mL pH 2.2 缓冲液溶解, 供测定用。将混合氨基酸标准品用 pH 2.2 缓冲液配成浓度为 0.1 nmol $\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 用氨基酸自动分析仪测定[由农业部农产品质量监督检验测试中心(郑州)代为检测]。测定结果见表 1。

表 1 不同时期地黄块根中化学成分含量测定结果

Tab. 1 Determination of chemical compositions in root tuber of <i>Rehmannia glutinosa</i> in different periods											%
品 种	编号	采样时间	梓醇	毛蕊花糖苷	水浸物	多糖	葡萄糖	蔗糖	棉籽糖	水苏糖	氨基酸
85-5	1	8 月 15 日	2.67	0.07	81.49	7.91	0.73	5.62	4.22	44.50	3.05
	2	8 月 30 日	2.62	0.11	82.95	8.21	0.98	7.14	4.16	42.79	3.53
	3	9 月 15 日	2.72	0.08	85.30	6.19	0.62	7.45	4.99	48.80	2.88
	4	10 月 2 日	2.84	0.07	82.46	9.10	0.30	5.33	4.55	57.20	2.83
	5	10 月 17 日	2.67	0.08	83.50	5.12	0.30	5.39	3.98	53.91	3.52
	6	11 月 1 日	3.18	0.10	85.63	9.21	0.35	4.52	3.72	58.34	3.18
	7	11 月 20 日	3.19	0.16	78.74	6.31	0.61	6.74	3.57	54.31	3.49
北京 3 号	8	8 月 15 日	1.78	0.16	81.49	9.65	0.72	5.72	2.93	46.27	4.36
	9	8 月 30 日	2.13	0.17	79.23	8.59	0.39	3.99	3.10	49.64	4.38
	10	9 月 15 日	1.68	0.10	82.01	8.55	0.71	7.25	4.04	46.28	4.42
	11	10 月 2 日	2.04	0.11	84.42	8.30	0.74	3.41	2.35	46.52	4.22
	12	10 月 17 日	1.58	0.16	82.83	7.78	0.46	3.46	3.13	52.09	4.37
	13	11 月 1 日	2.11	0.20	80.65	7.90	0.82	7.12	3.38	56.60	4.16
	14	11 月 20 日	2.07	0.22	83.33	7.92	0.76	5.62	2.64	54.54	4.21

2.2 地黄组织结构的观测

2.2.1 石蜡切片法 将每个时期采集的不同品种地黄块根制作石蜡切片，石蜡切片制作步骤主要为：①固定→②复水→③脱水、透明→④浸蜡→⑤包埋→⑥修块、切片→⑦展开、粘片、烤片→⑧脱蜡、复水、染色、脱水、透明→⑨封片。置显微镜下观察，将地黄组织结构绘图，见图 3。

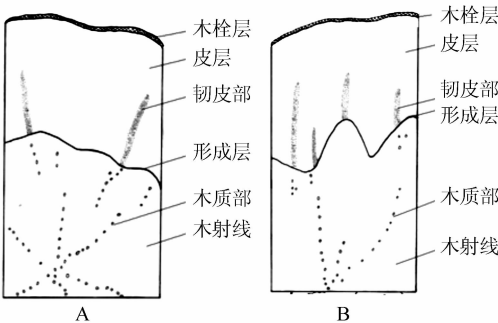


图 3 地黄块根横切面简图

A—地黄 85-5；B—地黄北京 3 号。

Fig. 3 Cross section figure of the root tuber of *R. glutinosa*

A—85-5; B—Beijing 3.

2.2.2 徒手切片法 对每个时期采集到的地黄 85-5、北京 3 号的新鲜块根做徒手切片，在显微镜下观察分泌细胞的分布情况，见图 4。对不同时期的地黄 85-5、北京 3 号韧皮部所占比例、木质部所占比例、韧皮部/木质部、皮层比例、分泌细胞数目进行观测，结果见表 2。

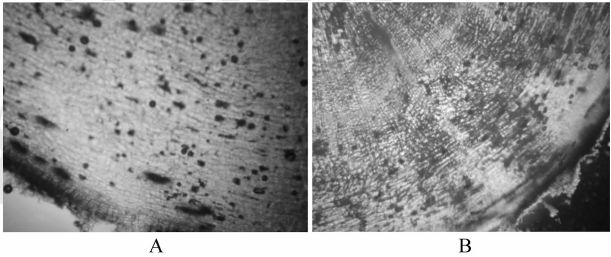


图 4 显微镜下地黄块根组织中分泌细胞分布情况

A—地黄 85-5；B—地黄北京 3 号。

Fig. 4 Secretory cell distribution characteristics in root tuber tissue of *R. glutinosa* in microscope

A—85-5; B—Beijing 3.

表 2 不同时期地黄块根横切面组织结构观测结果

Tab. 2 Observation result of transverse organizational structure in root tuber of *Rehmannia glutinosa* in different periods

品种	编号	采样时间	韧皮部比例	木质部比例	韧皮部/木质部	皮层比例	分泌细胞数目
85-5	1	8 月 15 日	0.30	0.21	1.43	0.48	82
	2	8 月 30 日	0.27	0.17	1.56	0.55	98
	3	9 月 15 日	0.24	0.24	1.00	0.49	84
	4	10 月 2 日	0.27	0.20	0.69	0.31	58
	5	10 月 17 日	0.22	0.39	0.76	0.47	87
	6	11 月 1 日	0.19	0.45	0.42	0.33	57
	7	11 月 20 日	0.26	0.38	0.73	0.33	46
北京 3 号	8	8 月 15 日	0.35	0.13	2.71	0.49	128
	9	8 月 30 日	0.28	0.21	1.33	0.49	133
	10	9 月 15 日	0.23	0.26	0.87	0.49	130
	11	10 月 2 日	0.26	0.24	1.10	0.48	177
	12	10 月 17 日	0.30	0.31	0.96	0.50	151
	13	11 月 1 日	0.23	0.32	0.74	0.47	125
	14	11 月 20 日	0.22	0.30	0.75	0.50	136

3 结果分析

3.1 不同时期地黄块根多个化学成分含量比较

由表 1 中各成分含量测定结果可以看出, 在一年的生长过程中, 地黄 85-5 块根中梓醇、毛蕊花糖苷的含量均呈上升趋势, 至 10 月中旬地黄地上部分开始枯萎后, 在 10 月下旬至 11 月上旬基本稳定在一个较高水平; 地黄北京 3 号块根中梓醇、毛蕊花糖苷含量呈折线变化, 但均在 11 月上旬稳定在较高水平。地黄中除总多糖外, 单糖葡萄糖、寡糖中的蔗糖、棉籽糖、水苏糖含量也比较高。测定结果表明, 地黄块根中多糖含量在一个生长周期内呈折线变化, 在 10 月中旬地上部分开始枯萎时, 达到较高值, 然后下降, 在 11 月上、中旬稳定在一个较低水平; 葡萄糖含量也呈折线变化, 在 10 月中旬 2 个品种地黄葡萄糖含量均较低, 进入 11 月份后含量升高, 并稳定在一个较高水平; 寡糖中蔗糖的含量也呈折线变化, 在地黄的 2 个品种中的变化趋势与葡萄糖相似; 寡糖中棉籽糖的含量较低, 在地黄 85-5、北京 3 号中的含量均在 5% 以下, 在地黄块根中的含量从 10 月初开始逐渐下降, 到 11 月中旬达到最低值; 寡糖中水苏糖的含量最大, 占总糖的 40% 以上, 进入 10 月份后地黄 85-5 中水苏糖的含量有一个由高到低再升高的变化, 但含量变化不大, 北京 3 号中水苏糖的含量在进入 10 月份后有一个明显的上升趋势, 到 11 月份维持在一个较高水平。另外, 2 个品种的地黄块根中, 总氨基酸、水溶性浸出物的含量总体变化不大, 特别是 10 月中旬至 11 月中旬, 含量基本维持在一个水平。

3.2 不同时期地黄块根组织结构变化比较

3.2.1 不同时期地黄块根横切面组织结构变化

由表 2 中观测结果可以看出, 从地黄 85-5、北京 3 号 2 个品种的块根横切面看, 北京 3 号横切面皮层所占比例在一个生长周期内基本不变, 而 85-5 的皮层占整个横切面的比例呈下降趋势; 而两个品种地黄块根韧皮部和木质部占整个横切面的比例发展趋势相同, 即韧皮部所占比例逐渐减少, 木质部所占比例逐渐增大, 同时, 韧/木比也呈明显降低趋势。

3.2.2 不同时期地黄块根分泌细胞变化 地黄块根组织中含有分泌细胞, 刘孟奇等^[4]通过组织化学定位研究发现, 分泌细胞与地黄中梓醇、多糖的含量有相关性, 笔者对地黄 2 个品种横切面分泌

细胞分区域和数量进行了测定。显微镜下可以观察到地黄块根坑洼处分泌细胞较多。2 个品种块根横切面分泌细胞主要分布在栓内层和皮层部位, 韧皮部少有分布, 木质部没有分布, 分泌细胞类圆形或长圆形。从每个显微镜视野(目镜 10 倍, 物镜 4 倍)下平均可见分泌细胞个数测定的结果看出, 地黄 2 个品种变化趋势也非常相似, 即在 10 月中旬有一个最大值, 11 月份又减少。

3.3 不同时期主成分分析

主成分分析是多元统计中的一种资料挖掘技术。它在不丢失主要变量信息的前提下选择为数较少的新变量来代替原来较多的变量, 以排除众多化学信息共存中相互重迭的信息。为更加准确的对地黄质量作出评价, 本研究利用主成分分析, 将 9 个单一成分指标综合成为 4 个综合指标, 根据 4 个综合指标的贡献率求出其相应隶属函数值, 并根据各综合指标的相对重要性进行加权, 得到 2 个品种、7 个时期地黄质量的综合评价值, 结果见表 4。综合评价结果表明: 2 个品种地黄均在第 6 时期综合评价排名最高, 即在 11 月初, 地黄质量评价最好, 最宜采收。

表 3 2 个品种地黄块根中 9 个成分累积贡献率

Tab. 3 The accumulated contribution rate of nine chemical compositions in root tuber of *Rehmannia glutinosa*

品种	编号	特征值(λ)	比率	累积
85-5	1	3.144 8	0.349	0.349
	2	2.966 9	0.330	0.679
	3	1.159 4	0.129	0.808
	4	0.894 8	0.099	0.907
	5	0.701 5	0.078	0.985
	6	0.132 5	0.015	1.000
	7	0.000 0	0.000	1.000
	8	0.000 0	0.000	1.000
	9	-0.000 0	-0.000	1.000
北京 3 号	1	3.337 6	0.371	0.371
	2	2.076 4	0.231	0.602
	3	1.718 5	0.191	0.793
	4	1.239 0	0.138	0.930
	5	0.534 1	0.059	0.990
	6	0.094 4	0.010	1.000
	7	0.000 0	0.000	1.000
	8	0.000 0	0.000	1.000
	9	-0.000 0	-0.000	1.000

由表 3 可知, 当地黄 85-5 主成分个数为 4 时, 累计贡献率已经有了 90.7%, 所以主成分个数取 4 个即可, 则其对应的特征向量为:

$$\begin{aligned}
Y_1 &= 0.466X_1 + 0.159X_2 - 0.003X_3 + 0.127X_4 - 0.417X_5 - \\
&0.415X_6 - 0.366X_7 + 0.509X_8 + 0.049X_9 \\
Y_2 &= -0.161X_1 - 0.514X_2 + 0.371X_3 + 0.201X_4 - 0.293X_5 - \\
&0.243X_6 + 0.382X_7 + 0.142X_8 - 0.470X_9 \\
Y_3 &= -0.191X_1 - 0.077X_2 + 0.186X_3 - 0.816X_4 - 0.38X_5 + \\
&0.091X_6 + 0.069X_7 + 0.191X_8 + 0.251X_9 \\
Y_4 &= -0.424X_1 - 0.339X_2 + 0.031X_3 + 0.114X_4 + 0.033X_5 - \\
&0.525X_6 - 0.378X_7 - 0.251X_8 + 0.457X_9
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\text{综合评价系数为: } W &= \frac{\lambda_1}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_1 + \\
&\frac{\lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_2 + \frac{\lambda_3}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_3 + \\
&\frac{\lambda_4}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_4
\end{aligned}$$

$$\text{即: } W = 0.385\ 114Y_1 + 0.363\ 328Y_2 + 0.141\ 981Y_3 + 0.109578Y_4$$

当地黄北京 3 号主成分个数为 4 时, 累计贡献率已经有了 93%, 所以主成分个数取 4 个即可, 则其对应的特征向量为:

$$\begin{aligned}
Y_1 &= 0.378X_1 + 0.414X_2 + 0.067X_3 - 0.325X_4 + 0.232X_5 + \\
&0.053X_6 - 0.237X_7 + 0.456X_8 - 0.506X_9 \\
Y_2 &= -0.015X_1 + 0.172X_2 - 0.462X_3 + 0.063X_4 + 0.141X_5 + \\
&0.602X_6 + 0.564X_7 + 0.213X_8 + 0.083X_9 \\
Y_3 &= 0.097X_1 + 0.293X_2 - 0.444X_3 - 0.155X_4 - 0.668X_5 - \\
&0.363X_6 - 0.002X_7 + 0.238X_8 + 0.223X_9 \\
Y_4 &= -0.509X_1 - 0.097X_2 + 0.368X_3 - 0.642X_4 - 0.086X_5 - \\
&0.011X_6 + 0.307X_7 + 0.278X_8 + 0.069X_9
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
\text{综合评价系数为: } W &= \frac{\lambda_1}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_1 + \\
&\frac{\lambda_2}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_2 + \frac{\lambda_3}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_3 + \\
&\frac{\lambda_4}{\lambda_1 + \lambda_2\lambda + \lambda_3 + \lambda_4} Y_4
\end{aligned}$$

$$\text{即: } W = 0.398\ 686Y_1 + 0.248\ 032Y_2 + 0.205\ 28Y_3 + 0.148\ 002Y_4$$

由表 1 中的数据, 可计算出 2 个品种 Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 , 同时可计算出 W , 从而得出综合评价结果, 排名见表 4。

表 4 地黄块根 7 个时期的综合评价结果及排名

Tab. 4 The comprehensive evaluation results and rank of seven periods for the root tuber of *Rehmannia glutinosa*

品种	采样时间	第一主成分	第二主成分	第三主成分	第四主成分	综合评价结果	名次
85-5	8 月 15 日	20.637 17	35.903 84	17.435 52	-12.056 10	22.146 96	6
	8 月 30 日	19.090 99	35.930 34	17.474 30	-12.056 50	21.566 60	7
	9 月 15 日	21.614 16	37.901 62	20.840 87	-14.540 09	23.460 37	5
	10 月 2 日	27.494 01	39.075 85	19.275 14	-15.206 37	25.856 10	2
	10 月 17 日	25.450 72	37.660 14	22.437 99	-14.234 08	25.110 44	3
	11 月 1 日	28.878 17	40.066 37	19.858 41	-14.635 44	26.894 42	1
	11 月 20 日	25.533 84	35.503 93	20.468 19	-15.151 23	23.978 86	4
北京 3 号	8 月 15 日	21.731 41	-21.624 7	-28.036 4	36.8100 5	2.9930 4	6
	8 月 30 日	23.378 99	-20.923 6	-25.177 2	37.5176 1	4.5154 6	4
	9 月 15 日	21.851 01	-20.390 3	-28.659 2	38.0960 5	3.4093 8	5
	10 月 2 日	22.648 56	-24.749 2	-28.262 9	38.5329 7	2.7922 2	7
	10 月 17 日	24.774 70	-22.402 5	-25.979 9	40.3327 8	4.9569 7	3
	11 月 1 日	27.187 61	-18.050 6	-25.510 4	40.4246 7	7.1083 5	1
	11 月 20 日	26.471 13	-21.046 9	-26.594 5	40.6417 4	5.8891 0	2

3.4 不同时期地黄块根中化学成分的变化规律与其组织结构相关性分析

采用 SPSS 软件对 2 个品种地黄块根中梓醇、毛蕊花糖苷、多糖、葡萄糖、蔗糖、棉籽糖、水苏糖、氨基酸、水浸物的含量与地黄组织结构所占比例进行相关性分析, 分析结果再进行双侧 (Two-tailed) 显著性检验, 结果见表 5。结果表明: 地黄 85-5 块根中梓醇含量与木质部比例有显著正

相关性 ($r=0.852, P<0.05$), 与皮层比例呈显著负相关性 ($r=-0.830, P<0.05$); 多糖含量与韧皮部比例呈显著正相关性 ($r=0.762, P<0.05$); 水苏糖含量与木质部比例呈极显著正相关 ($r=0.884, P<0.01$), 与韧皮部占木质部比例呈极显著负相关 ($r=0.894, P<0.01$), 与皮层比例呈极显著负相关性 ($r=0.876, P<0.01$), 与分泌细胞数目呈显著负相关性 ($r=-0.809, P<0.05$); 其他成分无显著相关性。

地黄北京 3 号块根中氨基酸含量与皮层比例呈显著正相关($r=0.861$, $P<0.05$), 与分泌细胞数目呈

显著正相关($r=0.852$, $P<0.05$); 其他成分无显著相关性。

表 5 不同时期地黄块根化学成分变化与组织结构相关性

Tab. 5 The correlation between the changes of chemical composition and organizational structure

品种	组织结构	梓醇	毛蕊花糖苷	水浸物	多糖	葡萄糖	蔗糖	棉籽糖	水苏糖	氨基酸
85-5	韧皮部比例	-0.311	-0.628	0.291	0.762 ¹⁾	0.166	-0.382	0.269	-0.297	-0.472
	木质部比例	0.852 ¹⁾	0.440	-0.243	0.094	-0.654	-0.391	0.448	0.884 ²⁾	-0.046
	韧/木比	-0.729	-0.372	0.105	0.226	0.746	0.289	0.335	-0.894 ²⁾	<0.0001
	皮层比例	-0.830 ¹⁾	-0.264	0.168	-0.344	0.669	0.532	0.363	-0.876 ²⁾	0.647
	分泌细胞	-0.728	-0.138	0.245	-0.245	0.539	0.425	0.124	-0.809 ¹⁾	0.678
北京 3 号	韧皮部比例	-0.453	-0.363	-0.075	0.607	-0.452	-0.474	-0.239	0.111	-0.206
	木质部比例	0.711	-0.276	0.281	-0.475	-0.054	-0.029	0.221	0.509	-0.520
	韧/木比	-0.693	0.049	-0.185	0.706	0.652	-0.085	-0.218	-0.674	0.224
	皮层比例	-0.666	-0.341	-0.257	-0.149	0.558	0.554	<0.000 1	-0.735	0.861 ¹⁾
	分泌细胞	-0.697	-0.154	0.175	-0.153	0.486	0.265	0.164	-0.749	0.852 ¹⁾

注: ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

4 讨论

地黄为块根入药, 块根的大小、形状、产量等是长期栽培过程中品种选育的重要指标, 地黄块根显微构造形成机理的研究引起学者的广泛重视; 同时地黄有效成分积累动态与块根生长发育时期是确定地黄块根适宜采收期的 2 个重要指标^[6]。因此, 本研究结果可为地黄的规范化种植提供参考依据。研究结果证明地黄不同组织结构中, 化学成分含量明显不同, 地黄生长初期, 木质部比例增长缓慢, 且梓醇、毛蕊花糖苷含量较低, 10 月之后木质部比例增长较快, 11 月达到最大值, 而在 10 月下旬梓醇、毛蕊花糖苷含量也迅速增高, 11 月初达到最大值。地黄块根生长初期多糖含量较高, 随着时间的推移, 含量逐渐降低, 这与地黄块根韧皮部占横切面总面积比例变化基本一致, 从根的解剖结构来分析, 韧皮部是营养物质的运输组织, 所以可溶性糖的含量相对较高。鲜地含有 20 多种氨基酸, 本研究还发现氨基酸含量变化与分泌细胞数目变化基本一致, 均在十月中旬达到较高水平。通过主成分分析发现地黄 85-5 在 10 月初至 11 月初期, 各成分含量较高, 地黄北京 3 号在 10 月中旬至 11 月中旬, 各成分含量达到较高水平, 2 个品种最佳采收期虽有一定差异, 但与传统采收期基本一致, 且 2 个品种均在 11 月初各成分含量达到最高值。

根据文献报道, 王太霞等^[7]利用化学组织定位研究发现地黄块根的韧皮部和木质部的薄壁细胞是梓醇的贮存场所, 木质部中梓醇含量高于韧皮

部; 李建军等^[8]研究发现怀地黄块根中梓醇的积累与块根中木质部的发育有密切的关系, 而本研究发现, 地黄 85-5 块根中梓醇的变化规律不仅与木质部比例呈显著正相关性, 还与皮层比例呈显著负相关性。即: 块根中木质部所占比例越大, 梓醇的含量就越高; 块根中皮层所占比例越小, 梓醇含量越高。出现这种结果的原因可能是怀地黄不同品种之间有差异性。王太霞等^[9]研究发现怀地黄块根有效成分的含量高峰与其产量高峰一致, 均在 11 月初时, 其时期与本研究结果一致, 且与传统采收期相符合。李建军等^[10]研究发现, 地黄总糖在块根中的分布比较广, 有可能集中于韧皮部和木质部的输导组织中, 本研究发现, 地黄多糖含量与韧皮部所占横切面比例有显著相关性, 可知, 地黄多糖含量与韧皮部比例密切相关。另外, 本研究还发现地黄块根中氨基酸含量与皮层比例、分泌细胞数目有较强相关性, 这将为地黄质量的鉴定及药理研究提供理论依据。

REFERENCES

[1] QIU J G, ZHANG R X, JIA Z P, et al. Determination of content of oligosaccharide and catalpol in Rehmannia root by HPLC [J]. Chin J Exper Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(17): 110-113.

[2] LIU Y, YANG J, WANG J. Determination of rehmannioside A in Rehmannia glutinosa oligosaccharide by HPLC-ELSD [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国药学杂志), 2013, 30(11): 1223-1225.

[3] LI J J, WANG Y, CHEN X J, et al. Determination and analyses of yield and component indices of Rehmannia glutinosa from different producing areas by HPLC [J]. J Henan Agri Univ(河南农业大学学报), 2011, 45(4): 387-390.

- [4] LIU M Q, CHEN S Q, DONG C M, et al. Microscopic and histochemical analysis of the root tuber of *Rehmannia glutinosa* Libosch. ex Fisch (Fam. Scrophulariaceae) [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2013, 36(11): 1771-1773.
- [5] YU L, LI X K, ZHANG H F, et. Simultaneous determination of monosaccharide and oligosaccharides by RP-HPLC-RID in the Huai-Radix *Rehmannia* [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2013, 33(6): 977-982.
- [6] WANG T X. Morphogenesis and structural development of the root tuber and the accumulation of catalpol in vegetative organs of *Rehmannia glutinosa* f. Hueichingensis(Chan et Seih)Hsiao together with its forming of genuineness [D]. Shanxi: Northwest University, 2004.
- [7] WANG T X, SI Y, LI J Y, et al. Catalpol histochemistry and ultrastructure in tuberous roots of *Rehmannia glutinosa* f. hueichingensis [J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sin(西北植物学报), 2005, 25(5): 928-931.
- [8] LI J J, SUN H, WANG T X, et al. Comparison of characters of root tubers and contents of effective components of several cultivars in *R. glutinosa* Libosch f. hueichingensis Hsiao [J]. J Henan Univ(河南师范大学学报), 2007, 35(3): 140-142.
- [9] WANG T X, LI J J, HU Z H. Accumulation trends of catalpol in vegetative organs of *Rehmannia glutinosa* var. hueichingensis [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2004, 35(2): 208-209.
- [10] LI J J, SUN H, WANG T X, et al. Comparisons of micro structures of root tubers and sugar contents of several cultivars in *Rehmannia glutinosa* Libosch f. Hueichingensis Hsiao [J]. J Henan Univ(河南大学学报), 2007, 37(5): 505-508.

收稿日期: 2013-11-06

鲜铁皮石斛提取物抗 Lewis 肺癌的机制研究

王杰¹, 葛颖华¹, 周萃¹, 童晔玲², 任泽明²(1.宁波市中医院, 浙江 宁波 315000; 2.浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要: 目的 考察鲜铁皮石斛生物碱、多糖提取物对小鼠 Lewis 肺癌的抑制作用, 并探讨其作用机制。方法 制备 Lewis 肺癌实体瘤小鼠模型, 将 80 只实体瘤模型小鼠均分为模型组、环磷酰胺(CTX)组、鲜铁皮石斛生物碱提取物高、中、低剂量(20, 10, 5 g·kg⁻¹)组、鲜铁皮石斛多糖提取物高、中、低剂量(20, 10, 5 g·kg⁻¹)组。除 CTX 组在开始给药后第 3, 6, 9 天腹腔注射 CTX(40 mg·kg⁻¹)外, 其余各组连续给药 20 d。观察鲜铁皮石斛生物碱、多糖提取物对荷瘤小鼠瘤重、脾脏指数、血清中白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平的影响。结果 鲜铁皮石斛生物碱、多糖各剂量组的瘤体重量均低于模型组, 多糖高剂量组, 生物碱高、中剂量组抑制瘤重效果显著($P<0.05$); 鲜铁皮石斛生物碱、多糖各剂量组的脾脏重量、脾脏指数均高于模型组, 多糖高、中剂量组效果最好($P<0.05$); 不同剂量生物碱和多糖组均能提高 TNF-α、IL-2 水平, 生物碱高剂量组, 多糖高、中剂量组提高效果显著($P<0.05$)。结论 鲜铁皮石斛生物碱、多糖提取物对 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤有明显的抑制作用, 其作用机制可能与提高脾脏指数, 调节血清中 TNF-α、IL-2 水平有关。

关键词: 鲜铁皮石斛提取物; Lewis 肺癌; 白细胞介素-2; 肿瘤坏死因子-α

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2014)08-0953-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.08.011

Study on the Mechanism of Extracts from Fresh *Dendrobium Candidum* against Lewis Lung Cancer

WANG Jie¹, GE Yinghua¹, ZHOU Cui¹, TONG Yeling², REN Zeming²(1. Ningbo Municipal Hospital of TCM, Ningbo 315000, China; 2. Zhejiang Institute of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310007, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibition of mice's Lewis lung cancer from the polysaccharides and alkaloid extracted from fresh *Dendrobium candidum*, and reveal the anti-tumor mechanism. **METHODS** Lewis tumor-bearing mice models were established. Mice were divided into eight groups: model group, cyclophosphamide(CTX)group, high(20 g·kg⁻¹), middle(10 g·kg⁻¹) and low(5 g·kg⁻¹) dose of polysaccharides extracted from fresh *Dendrobium candidum*, high(20 g·kg⁻¹), middle(10 g·kg⁻¹) and low(5 g·kg⁻¹) dose of alkaloid extracted from fresh *Dendrobium candidum*. CTX group was injected intraperitoneally with CTX(40 mg·kg⁻¹) on day 3, 6 and 9 following the administration started, the other groups were given successively for 20 days, then the effects of polysaccharides and alkaloid extracted from fresh *Dendrobium candidum* on tumor growth, spleen index, interleukin-2 (IL-2) and tumor necrosis factor-α(TNF-α) levels were determined. **RESULTS** Compared with model group, the tumor weight in different doses of polysaccharides and alkaloid groups was lower. The tumor weight could be obviously inhibited in high dose of polysaccharides, high and middle dose of alkaloid($P<0.05$). Spleen weight and

基金项目: 宁波市医学科技计划项目(2011B15)

作者简介: 王杰, 男, 副主任中药师 Tel: (0574)87089095 E-mail: wangjie607@yeah.net