

- Biol, 2001, 13(5): 555 - 562
- 6 Jennings S, Pham T, Ireland, SK, *et al.* Bit1 in anoikis resistance and tumor metastasis[J]. Cancer Lett, 2013, 333(2):147 - 151
 - 7 Whelan KA, Caldwell SA, Shahriari KS, *et al.* Hypoxia suppression of Bim and Bmf blocks anoikis and luminal clearing during mammary morphogenesis[J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(22): 3829 - 3837
 - 8 Akaogi K, Ono W, Hayashi Y, *et al.* MYBBP1A suppresses breast cancer tumorigenesis by enhancing the p53 dependent anoikis[J]. BMC Cancer, 2013, 13:65
 - 9 Toricelli M, Melo FH, Peres GB, *et al.* Timp1 interacts with beta - 1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3 - K signaling pathway independently of Akt phosphorylation[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1):22
 - 10 Tanaka AR, Noguchi K, Fukazawa H, *et al.* p38MAPK and Rho - dependent kinase are involved in anoikis induced by anicequol or 25 - hydroxycholesterol in DLD - 1 colon cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 430(4):1240 - 1245
 - 11 Ferraro A, Mourtzoukou D, Kosmidou V, *et al.* EZH2 is regulated by ERK/AKT and targets integrin alpha2 gene to control epithelial - mesenchymal transition and anoikis in colon cancer cells[J]. J Biochem Cell Biol, 2013, 45(2):243 - 254
 - 12 Wen YY, Yang ZQ, Song M, *et al.* SIAH1 Induced Apoptosis by activation of JNK pathway and inhibited invasion by inactivation of ERK pathway in breast cancer Cells[J]. Cancer Science, 2010, 101(1): 73 - 79
 - 13 Wen YY, Yang ZQ, Song M, *et al.* The expression of SIAH1 is down - regulated and associated with bim and apoptosis in human breast cancer tissues and cells [J]. Molecular Carcinogenesis, 2010, 49(5):440 - 449
 - 14 Li Z, Zhao J, Du Y, *et al.* Down - regulation of 14 - 3 - 3 suppresses anchorage - independent growth of lung cancer cells through anoikis activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(1):162 - 167
- (收稿日期:2013 - 04 - 11)
(修回日期:2013 - 05 - 02)

广东铁皮石斛 GAP 基地的石斛鲜品茎和叶中多糖的含量比较研究

鲁芹飞 王培培 陈建南 黄松

摘要 目的 通过对不同产地铁皮石斛引种到广东饶平铁皮石斛 GAP 种植基地的铁皮石斛药材鲜品茎和叶中的多糖含量比较研究,探讨环境因素对石斛多糖的影响。**方法** 以多糖含量为指标,应用苯酚 - 浓硫酸比色法测定不同产地的铁皮石斛鲜品茎和叶中的多糖含量。**结果** 不同原产地的铁皮石斛茎和叶中的多糖含量均有一定差异,其中鲜品的茎以云南 - 5(T8)样品的多糖含量最高,达到了 5.59%,广东河源的样品的多糖含量最低,仅为 1.22%;鲜品的叶以云南 - 4(T7)样品的多糖含量最高,达到了 1.90%,福建武夷山的样品的多糖含量最低,为 0.95%;多数品种的鲜品茎中的多糖含量高于叶中的多糖含量。**结论** 原产地的生长环境对铁皮石斛多糖的积累可能有一定影响。

关键词 铁皮石斛 鲜品 多糖 含量测定 苯酚 - 浓硫酸法

Comparative Study on Polysaccharides Content in Stem and Leaf of Iron Stone Dendrobium Fresh Product from different producing place.

Lu Qinfei, Wang Peipei, Chen Jiannan, Huang Song. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510006, China

Abstract Objective To establish a method for the determination of polysaccharide content in the stems and leaves of Iron stone dendrobium Fresh Product from different producing place, and to explore the influence of environment on the polysaccharide constituents in the stems and leaves. **Methods** Phenol - sulfuric acid method was applied for the determination of polysaccharide in the stems and leaves of Iron stone dendrobium Fresh Product. **Results** Polysaccharides content in stem and leaf of Iron stone dendrobium Fresh Product from different producing place was different. Polysaccharides content in stems of Yunnan - 5(T8) sample was the highest(5.59%), while it was the lowest in Guangdong Heyuan districts sample(1.22%). Polysaccharides content in leaves of Yunnan - 4(T7) sample was the highest(1.90%), while it was the lowest in Fujian Wuyishan districts sample(0.95%). It's common that polysaccharides content in fresh stems was higher than it in leaves. **Conclusion** Different growing environment of Iron stone dendrobium could probably influence the Pol-

基金项目:广东省科技计划项目(2011A030100011);广东省科技教育部产学研结合项目(2010B090400474);广东省科技计划项目(2008A0301009)

作者单位:510006 广州中医药大学(鲁芹飞、王培培、陈建南、黄松);广州中医药大学中医药数理工程研究院(陈建南、黄松)

通讯作者:黄松,博士,副教授,硕士生导师,电子邮箱:hsl318@yahoo.com.cn

ysaccharides content in it.

Key words Stems and leaves of Iron stone dendrobium; Fresh product; Polysaccharide; Assay; Phenol - sulfuric acid method

铁皮石斛是我国传统名贵中药材,性微寒、味甘,有滋阴益胃、清热生津、益智安神、强精壮骨之功效,近年大量药理实验也表明铁皮石斛有增强免疫力、抗氧化、抗疲劳、降血糖、护肝等作用^[1-6],所以鲜品铁皮石斛越来越多的被作为保健食品应用。多糖是铁皮石斛的主要成分,与药理作用有着密切的联系,多糖质量分数的高低是目前判断铁皮石斛质量的主要依据。本研究采用苯酚-浓硫酸测定不同产地铁皮石斛引种到广东饶平铁皮石斛 GAP 种植基地的铁皮石斛药材鲜品茎和叶中的多糖含量,为铁皮石斛鲜品的综合应用提供科学依据,最大程度的利用这一名贵中药材^[7-8]。

材料与方法

1. 实验材料:铁皮石斛新鲜药材均来自于广东永生源生物科技有限公司铁皮石斛 GAP 种植基地(广东饶平),采集于 2012 年 7 月(茎和叶分别采集,共收集 11 份叶的鲜品样品,12 份茎的鲜品样品),药材信息见表 1,药材留样现保存于广州中医药大学中药学院,药材经广州中医药大学陈建南研究员鉴定。5% 苯酚、浓硫酸、无水乙醇,无水葡萄糖(中国药品生物制品检定所提供 批号:0833-9501)。

2. 实验仪器:BlueStar 紫外-可见分光光度计(北京莱伯泰科),XiangYi L-530 离心机, Sartorius CP225D 电子天平(德国),Aquapro 艾科浦 U 系列纯水机,EYELA M-旋转蒸发器(日本),SHZ-D(Ⅲ)循环水式真空泵。

3. 方法:(1)多糖的提取与精制:分别取鲜品铁皮石斛茎和叶,剪成不超过 3mm 的小段,混合均匀,称取 50g,置 500ml 圆底烧瓶中,加石油醚 250ml 90℃ 水浴回流 1h,抽滤,滤渣挥干溶剂,加入蒸馏水浸提 2 次,趁热过滤,滤液减压浓缩至 150ml,加 0.1% 活性炭脱色,抽滤,滤液浓缩后,加 95% 乙醇(4-5BV),静置 12h、抽滤,得粗多糖,粗多糖加热水溶解,Sevage 法脱蛋白,脱蛋白溶液浓缩后,加 95% 乙醇(4-5BV),静置 12h,抽滤,沉淀依次用无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤 3 次,沉淀按以上步骤再次脱色、醇沉,得精制多糖 60℃ 烘干备用。(2)标准曲线的制备:精密称定 105℃ 干燥至恒重的葡萄糖对照品 9.92mg,置于 100ml 量瓶中,加水适量使溶解,稀释至刻度,摇匀。精密移取对照品溶液 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.4ml,分别置于 10ml 具塞试管中,各加水至 2.0ml,精密加入 5% 苯酚溶液 1.0ml,摇匀,加硫酸 5.0ml,摇匀,置沸水浴中加热 20min,取出,置冰浴中冷却 5min,以相应试剂为空白,在 488nm 的波长处测定吸光度。(3)换算因素的测定:精密称定干燥至恒重的自制多糖 10.37mg,加水溶解,定容至 100ml,摇匀,作储备液,吸取储备液 0.3ml 于具塞试管中,加水至 1ml,按“标准曲线的制备”项下的方法,自“精密加入 5% 苯酚溶液

1.0ml”起,测定吸光度。从回归方程中求得多糖供试液中葡萄糖的浓度,计算换算因子 f。按下式计算换算因素(f)。f = 多糖溶液的浓度(μg/ml)/[多糖溶液中的葡萄糖浓度(μg/ml) × 稀释倍数]。结果得到铁皮石斛多糖的换算因素为 0.9864。(4)供试品溶液的制备:取鲜品铁皮石斛茎,剪成不超过 3mm 的小段,混合均匀,称取 8.0g,经石油醚脱脂后药渣置 250ml 圆底烧瓶中,加水 200ml 加热回流 2h,抽滤,滤液转移至 250ml 量瓶中,加水至刻度,摇匀。从 250ml 容量瓶中精密移取溶液 2ml,置 15ml 离心管中,精密加入无水乙醇 10ml,摇匀,冷藏 1h,取出,离心 20min,弃去上清液,沉淀加 80% 乙醇洗涤两次,每次 8ml,离心,弃去上清液,沉淀加热水溶解,转移至 25ml 量瓶中,放冷,加水至刻度,摇匀。(5)回收率实验:精密称取已知多糖含量的石斛鲜品样品的 6 份,加入相同量葡萄糖对照品,按“供试品溶液的制备”项下的方法制备供试品溶液,依法测定,结果回收率为 97.6%,RSD = 2.43%。(6)精密度实验:精密移取供试溶液 6 份,每份 0.30ml,加水至 2ml,按“标准曲线的制备”项下的方法,自“精密加入 5% 苯酚溶液 1.0ml”起,测定吸光度。测定结果,RSD = 1.37%,精密度较好。(7)重现性实验:精密称取样品 6 份,分别按照“供试品溶液的制备”项下的方法提取,每份供试溶液取 0.3ml,加水至 2ml,按“标准曲线的制备”项下的方法,自“精密加入 5% 苯酚溶液 1.0ml”起,测定吸光度。测定结果,RSD = 1.52%,重现性良好。(8)稳定性试验:精密移取供试溶液 0.3ml,加水至 2ml,按“标准曲线的制备”项下的方法,自“精密加入 5% 苯酚溶液 1.0ml”起,分别测定 30、60、90、120、150、180、210、240min 的吸收度。测定结果,RSD = 0.45%,240min 内稳定性良好。(9)样品测定:精密吸取按“供试品溶液的制备”项下的方法制备的供试品溶液 1.0ml 于具塞试管中,按“标准曲线的制备”项下的方法,自“精密加入 5% 苯酚溶液 1.0ml”起,测定吸光度。按下式计算样品中多糖含量,多糖含量(%) = $C_s \times D \times f \times V/W \times 100\%$,式中 C_s (μg/ml)为供试品溶液中葡萄糖的浓度;D 为供试品溶液的稀释因素;f 为换算因素;V(ml)为供试品溶液的体积;W(μg)为样品质量。

结 果

1. 线性关系考察:6 个不同浓度的葡萄糖对照品溶液的吸光度测定,结果见表 1。以葡萄糖浓度为横坐标,吸光度为纵坐标,绘制标准曲线,见图 1,得回归方程 $y = 0.060x - 0.074$, $r = 0.9992$,在 2.48 ~ 17.36 μg/ml 范围内线性良好。

2. 样品测定结果:不同产地的铁皮石斛鲜品茎和叶中多糖的含量测定的结果见表 2。

表 1 不同葡萄糖对照品移取量的吸收值

对照品取样体积 (ml)	浓度 (μg/ml)	吸光度
0.2	2.48	0.081
0.4	4.96	0.213
0.6	7.44	0.367
0.8	9.92	0.543
1.0	12.40	0.696
1.4	17.36	0.965

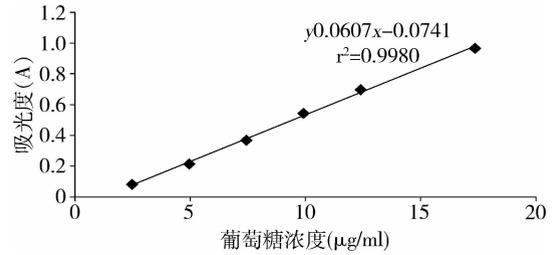


图 1 葡萄糖标准曲线图

表 2 各产地的铁皮石斛采集信息及鲜品茎和叶中多糖的含量

编号	代码	产地	生长年限	栽培基质	采样时间	鲜品叶 (%) (n=6)	鲜品茎 (%) (n=6)
1	T2	云南	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.89 ± 0.018	2.37 ± 0.043
2	T4	云南	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.84 ± 0.033	3.27 ± 0.019
3	T5	云南	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.16 ± 0.023	2.38 ± 0.009
4	T7	云南	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.90 ± 0.016	1.97 ± 0.029
5	T8	云南	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.87 ± 0.047	5.59 ± 0.012
6	S10	浙江雁荡山	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.68 ± 0.032	2.17 ± 0.047
7	O12	云南德宏州	两年	碎树皮	2012 年 7 月	-	4.48 ± 0.039
8	907	云南思茅	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.71 ± 0.026	1.51 ± 0.045
9	河源	广东河源	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.13 ± 0.029	1.22 ± 0.023
10	会昌	福建武夷山	两年	碎树皮	2012 年 7 月	0.95 ± 0.009	1.46 ± 0.034
11	师宗	云南师宗	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.56 ± 0.012	1.26 ± 0.046
12	南雄	广东南雄	两年	碎树皮	2012 年 7 月	1.39 ± 0.044	1.65 ± 0.038

从表 2 中可以看出,原产地不同的铁皮石斛鲜品茎和叶中多糖的含量各有不同,鲜品的叶多糖的含量在 0.95% ~ 1.90% 之间,以云南 -4(T7)样品的含量最高,福建武夷山样品的含量最低;鲜品的茎多糖含量在 1.22% ~ 5.59% 之间,以云南 -5(T8)样品含量最高,广东河源样品的含量最低。通过比较研究发现多数品种的石斛鲜品茎中的多糖含量高于鲜品叶中的多糖含量,从含量结果可以推测,铁皮石斛的原产地生长环境对铁皮石斛的多糖含量有一定影响。

讨 论

铁皮石斛原产地主要在浙江、云南、福建省等地,尤以云南省数量为多,且品种丰富。产地环境和植物本身的遗传特性是影响多糖含量的主要因素^[9-11],采样季节和多糖提取工艺也会影响多糖含量的测定结果。本实验中药品采样时间集中,降低了样品采收时间对多糖含量测定的影响。从实验测得的数据可以看出,原产地不同的铁皮石斛鲜品茎和叶中多糖的含量各有不同,原产地在云南省的样品鲜品茎和叶多糖含量整体情况较高于其他产地的样品鲜品,可以推测出原产地环境与石斛植物体内多糖的含量积累可

能有一定相关性。另外可以看出多数品种的鲜品茎中的多糖含量高于叶中的多糖含量。

铁皮石斛的叶中也含有一定的量的石斛多糖,在鲜品铁皮石斛越来越多的被作为保健食品应用的背景下,可以考虑铁皮石斛鲜品叶的应用。实验结果表明,苯酚-浓硫酸比色法简单方便、准确可靠,且所需仪器简单、操作方便、显色稳定、重现性好,可以用来测定铁皮石斛中多糖的含量。

参考文献

- 1 吕圭源,陈素红,张丽丹,等. 铁皮石斛对小鼠慢性酒精性肝损伤模型血清 2 种转氨酶及胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂志, 2010, 6: 192 - 193
- 2 吴维佳,庞璐,胡日红,等. 铁皮石斛对小鼠免疫功能的影响[J]. 湖南中医杂志, 2012, 2: 113 - 114
- 3 李玲,邓晓兰,赵兴兵,等. 铁皮石斛化学成分及药理作用研究进展[J]. 肿瘤药学, 2011, 2: 90 - 94
- 4 杨虹,王顺春,王峰涛,等. 铁皮石斛多糖的研究[J]. 中国药学杂志, 2004, 39(4): 254
- 5 陈志国,叶松山,范迎,等. 金钗石斛多糖提取工艺的优化及对小鼠脾细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(15): 27
- 6 沈凯凯,徐蓓,王磊,等. 石斛中联苯类化合物抗血管新生活性研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 4: 919 - 921

- 7 刘莉, 萧凤回. 石斛属药用植物多糖研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2009, 1: 77 - 80
 - 8 孙卓然, 刘圆, 李晓云, 等. 石斛不同种、不同药用部位中多糖含量测定[J]. 时珍国医国药, 2009, 8: 1886 - 1888
 - 9 艾娟, 严宁, 胡虹, 等. 温度对铁皮石斛生长及生理特性的影响[J]. 云南植物研究, 2010, 5: 420 - 426
 - 10 诸燕, 斯金平, 郭宝林, 等. 人工栽培铁皮石斛多糖含量变异规律[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(4): 427
 - 11 尚喜雨. 多糖在不同来源不同部位铁皮石斛中的分布规律研究[J]. 中国现代药物应用, 2010, 4(13): 104
- (收稿日期: 2013 - 04 - 08)
(修回日期: 2013 - 04 - 16)

祛胰抵方对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞膜葡萄糖转运蛋白 4 的影响

马 建 马晓静 杜丽坤 赵 娜

摘 要 **目的** 观察不同浓度祛胰抵方对胰岛素抵抗大鼠骨骼肌细胞上葡萄糖转运蛋白 - 4 (GLUT - 4) 表达的影响并探讨其发生的可能机制。**方法** 健康的雄性 Wistar 大鼠 80 只, 随机抽取 10 只作为正常对照组 (NC), 饲以普通饲料, 其余以高脂饲料喂养 4 周后腹腔内注射链脲佐菌素 (STZ) 建立 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠的模型。将建模成功后大鼠随机分为糖尿病模型 (DM) 组、高、中、低浓度中药组以及迪化唐錠组。NC 组与 DM 组给予生理盐水, 各组均给药 12 周。应用葡萄糖转运蛋白 4 (GLUT4) ELISA 试剂盒测定骨骼肌组织细胞膜 GLUT - 4 蛋白的含量。**结果** 与 NC 组比较, DM 组大鼠的骨骼肌细胞中 GLUT - 4 表达明显降低; 与 DM 组比较, 药物治疗组骨骼肌细胞中 GLUT - 4 的表达明显增强。**结论** 祛胰抵方可能通过增强大鼠骨骼肌组织细胞中 GLUT - 4 的表达以改善 2 型糖尿病胰岛素抵抗。

关键词 2 型糖尿病 胰岛素抵抗 葡萄糖转运蛋白 4 祛胰抵方

Quyidi Decoction in Insulin Resistance of Type 2 Diabetes Mellitus Rat Skeletal Muscle Cell Membrane Glucose Transporters4 Effect. Ma Jian, Ma Xiaojing, Du Likun, Zhao Na. The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Heilongjiang 150040, China

Abstract Objective To observe the influence of Quyidifang with different concentrations on insulin resistance in the expression of glucose transporter - 4 (GLUT - 4) on skeletal muscle cells in rats and explore the possible mechanism of what may happen. **Methods** Eighty healthy male Wistar rats were used in the experiment. Ten of them were selected and allocated as normal control group (NC) randomly, and were fed with normal diet. The rest of the rats were fed with hyper - cholesterol for 4 weeks and received intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ) to established rat model of insulin resistance of type 2 diabetes mellitus. After successfully establishing models, randomly divide the rats into diabetes model (DM) group, Chinese medicine group of high, medium and low concentrations and Di - hua Tang Ingot group. Rats of NC group and DM group were received physiological saline and dosed for 12 weeks. Adapt glucose transporters 4 (GLUT - 4) ELISA kit to measure the protein content of GLUT - 4 in skeletal muscle cells membrane. **Results** Compared with NC group, the expression of GLUT - 4 in skeletal muscle cells of rats in DM group significantly reduced; when compared with DM group, the expression of GLUT - 4 in skeletal muscle cells of rats in drug therapy group noticeably strengthened. **Conclusion** Quyidifang can improve insulin resistance of type 2 diabetes mellitus by enhancing the expression of GLUT - 4 in skeletal muscle cells of rats.

Key words Type 2 diabetes mellitus; Insulin resistance; Glut - 4; Quyidi decoction

胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞功能受损是导致 2 型糖尿病发病的基础, 其中胰岛素抵抗是贯穿 2 型糖尿病发生及其发展的整个过程重要因素, 2 型糖尿病胰

岛素抵抗被认为是环境与基因之间相互作用的结果。在诸多候选基因当中, GLUT - 4 与 2 型糖尿病胰岛素抵抗的发生关系最为密切^[1]。近年来研究表明, 全身胰岛素抵抗主要表现是骨骼肌组织葡萄糖的代谢发生障碍。细胞膜上参与胰岛素刺激的葡萄糖摄取的 GLUT - 4 是肌肉组织葡萄糖代谢的关键因子之一, 同时它也是胰岛素抵抗机制研究的靶点之一。本

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D201072)

作者单位: 150040 哈尔滨, 黑龙江中医药大学附属第一医院 (马建、杜丽坤); 150040 哈尔滨, 黑龙江中医药大学 (马晓静、赵娜)