# “南薯 88”茎叶多糖的分离纯化，结构鉴定及其生物活性的研究

刘 露[1]， 侯怡铃[1]， 王 梅[2]， 赵大群[1]， 谭春梅[1]， 刘兴丽[1]， 侯万儒[1]， 丁 祥*[1]

（1. 西华师范大学 生命科学学院，西南野生动植物资源保护教育部重点实验室，四川 南充 637009；2. 南充市农业科学研究院 国家甘薯改良中心南充分中心，四川 南充 637001）

**摘要：** 晒干的“南薯 88”的茎叶，通过热水浸提，乙醇沉淀，DEAE-cellulose column 柱层析分离纯化，得到“南薯 88”多糖纯品（N88P-1）。通过红外光谱技术（IR），高效凝胶渗透色谱（HPGPC），高效液相色谱色谱（HPLC）和核磁共振谱（1 H NMR）等对“南薯 88”多糖（N88P-1）的进行了结构鉴定；同时，对“南薯 88”多糖（N88P-1）的抗氧化及免疫调控作用进行了初探。结果显示，“南薯 88”多糖（N88P-1）的分子量为 1 4328 D，红外光谱显示，在 3 444.81 $cm^{-1}$ 出现 O-H 的特征伸缩振动峰，1 640.20 $m^{-1}$ 出现 C=O 的特征伸缩振动峰，$^1H$ NMR 谱显示 δ 4.93~δ 4.86 出现异头氢信号，高效液相色谱色谱显示 N88P-1 的单糖组成为 1:1 的半乳糖和甘露糖。活性研究结果显示，一定范围内的 N88P-1 浓度可以清除 $ABTS^+$ 自由基，$IC_{50}$ 值为 0.48 mg/mL。N88P-1 在 0.25~3 mg/mL 的浓度范围内与 $DPPH^-$ 自由基的清除能力呈正相关，$IC_{50}$ 值为 0.96 mg/mL。当 N88P-1 的浓度为 3 mg/mL 时，对 $ABTS^+$ 和 $DPPH^-$ 自由基的清除能力均达到最高值；免疫细胞增殖活性结果显示，N88P-1 在 20~80 mg/mL 的浓度下，对 B 细胞和 T 细胞增殖效果为极显著（$P<0.01$）；在 10~40 mg/mL 的浓度下，对巨噬细胞增殖效果为极显著（$P<0.01$），其中，N88P-1 在 40 mg/mL 的浓度下对 3 种免疫细胞的增殖效果均达到最佳。

**关键词：** “南薯 88”；多糖；分离纯化；结构鉴定；抗氧化活性；免疫调控活性

**中图分类号：**Q 53　**文章编号：**1673-1689（2019）02-00101-10　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.015

# Isolation，Purification，Structure Identification And Biological Activity of Polysaccharides From Stems And Leaves of "Nanshu 88"

*LIU Lu*[1]， *HOU Yiling*[1]， *WANG Mei*[2]， *ZHAO Daqun*[1]， *TAN Chunmei*[1]，
*LIU Xingli*[1]， *HOU Wanru*[1]， *DING Xiang*[1]

（1. Key Laboratory of Southwest China Wildlife Resources Conservation，Ministry of Education，College of Life Science，West Normal University，Nanchong 637009，China；2. Nanchong Academy of Agricultural Sciences，National Sweet Potato Improvement Center，Nanchong Branch，Nanchong 637001，China）

**收稿日期：** 2016-04-13

**基金项目：** 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目（CARS-11-B-12）。

* **通信作者：** 丁 祥（1980—），男，博士，教授，硕士生导师，主要从事食品科学研究。E-mail：biostart8083@126.com

**引用本文：** 刘露，侯怡铃，王梅，等. “南薯 88”茎叶多糖的分离纯化，结构鉴定及其生物活性的研究[J]. 食品与生物技术学报，2019，38（02）：101-110.

**Abstract**: The "Nanshu 88" polysaccharide (N88P-1) is obtained from the dried stems and leaves of "Nanshu 88" by hot water extraction, ethanol precipitation, and then purified by DEAE-cellulose 52 column chromatography. The structure of "Nanshu 88" pure polysaccharide (N88P-1) is identification by Infrared spectroscopy (IR), High Performance Gel Penetration Chromatography (HPGPC), High Performance Liquid Phase Chromatographic (HPLC) and nuclear magnetic resonance spectra ($^{1}$H NMR and $^{13}$C NMR). At the same time, the antioxidant and immune regulation effects of N88P-1 are also carries out. The results show that N88P-1 has molecular weight of 14 328 D. The infrared spectra shows the characteristic peaks of O-H stretching vibration appears in 3 444.81 cm$^{-1}$, and the characteristic peaks of C=O stretching vibration appears in 1 640.20 cm$^{-1}$. $^{1}$H NMR spectra showed anomeric hydrogen signals at δ4.93~δ4.86. High performance liquid chromatography (HPLC) chromatography shows N88P-1 is composed of galactose and mannose with the ratio of 1:1. The activity study shows the N88P-1 has ability to clear the ABTS$^{+}$ free radical in a certain range of concentration, and the $IC_{50}$ value is 0.48 mg/mL. The DPPH$^{-}$ free radical scavenging activity of N88P-1 is positively correlated with concentration in the range of 0.25~3 mg/mL, the $IC_{50}$ value is 0.96 mg/mL. When the concentration of N88P-1 is 3 mg/mL, the scavenging activity of ABTS$^{+}$ and DPPH$^{-}$ free radical both reach the highest value. The proliferation activity of the immune cells results show that the proliferation effect on B cells and T cells are very significant ($P$<0.01) in the concentration of 20~80 mg/mL; while the effect of macrophage proliferation was very significant ($P$<0.01) in the concentration of 10~40 mg/mL; It is worth noting that the proliferation effect of the three kinds of immune cells all reached the highest value in the concentration of 40 mg/mL.

**Keywords**: "Nanshu 88", polysaccharide, extraction, purification, structure identification, antioxidant activity, immune regulation activity

红薯是旋花科一年生的草本植物[1]。红薯为我国主要的粮食，有食用、饲养等多种用途。“南薯88”[2]是四川省南充市农业科学院甘薯研究所在1980年用晋专7号作母本，美国红作父本进行有性杂交后培育选择而成的品种。该品种在1988年3月通过四川省品种委员会审定，1991年通过国家审定，1992年获得国家科技进步一等奖。“南薯88”自育成以来，因其产量高、适应性广、熟食品质优而受到广大农户的喜爱，并长期作为国家区试验对照种，在长江中下游薯区覆盖率一度超过70%。

多糖又称多聚糖(polysaccharide)，是由至少十个单糖通过糖苷键聚合组成的聚合物。多糖在药理学和生理学等方面起着不同的作用，它们作为细胞壁与环境之间的屏障，具有介导宿主-病原物相互作用，形成生物膜结构的功能。近年来，由于活性多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗病毒、抗氧化及降血糖[3]的功能而广泛受到关注。同时活性多糖能够多途径、多环节、多靶点的调控免疫系统，激活免疫细胞并活化补体，促进生成细胞因子。植物多糖分布范围广，原料来源简便，在医药、农业、食品等领域具有独特的作用[4-5]。

本研究以南充市农业科学研究院专利品种“南薯88”为对象，运用热水浸提技术、柱层析技术分离纯化“南薯88”多糖(N88P-1)，通过红外光谱技术(IR)，高效凝胶渗透色谱(HPGPC)，高效液相色谱色谱(HPLC)和核磁共振谱($^{1}$H NMR和$^{13}$C NMR)等对“南薯88”多糖(N88P-1)进行结构鉴定；并对“南薯88”多糖(N88P-1)的抗氧化活性和免疫调控能力做了初步探究。为进一步研究“南薯88”多糖(N88P-1)的药理作用、构效关系和更为广泛的应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器

**1.1.1 主要材料** “南薯88”茎叶由四川省南充市农业科学研究院提供；无水乙醇购买于安徽安特生

物化学有限公司;氯化钠购于成都市科龙化工试剂厂;DEAE 纤维素购于生兴生物技术(南京)有限公司;葡萄糖,果糖,阿拉伯糖,甘露糖,半乳糖,木糖;ABTS 溶液(本实验室提供);DPPH 溶液(本实验室提供);cell counting kit(CCK-8 细胞计数试剂盒)购买于上海碧云天生物技术研究所,PBS 缓冲液(本实验室提供);RPMI1640 培养基,无酚红,购于 gibco 公司;0.5% Trypsin – EDTA 购于 gibco 公司; 胎牛血清购于 Clark Bioscience,实验药品均为分析纯。

**1.1.2 主要实验仪器** 小鼠巨噬细胞 RAW264.7、B 淋巴细胞、T 淋巴细胞购买于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所;$CO_2$ 恒温培养箱;超净工作台;紫外分光光度计;电子天平;96 孔微量培养板;徕卡倒置显微镜;台式低温高速离心机;Epoch 酶标仪;旋转蒸发器;电热恒温水浴锅;高效液相色谱仪;徕卡 DMI 3000 倒置荧光显微镜。

## 1.2 方法

**1.2.1 “南薯 88”多糖(N88P-1)的提取** 称取烘干后的南薯 88 茎叶 300 g,剪成小段再放于粉碎机中粉碎;以料液比 1:3 的比例在水浴锅 90 ℃蒸馏水中煮 6 h,煮 3 次[6];收集上清液,旋转蒸发浓缩至 200 mL,加入 4 倍体积无水乙醇[7],用玻璃棒搅拌有絮状沉淀产生,离心收集沉淀,烘干后得到“南薯 88”多糖(N88P-1)的粗多糖[8]。

**1.2.2 “南薯 88”多糖(N88P-1)的分离纯化** 使用 DEAE cellulose-52 色谱柱[9](2 cm×60 cm),自然沉降柱填料。精密称取“南薯 88”多糖(N88P-1)的粗多糖 5 g,溶解于 5 mL 蒸馏水中,离心后的上清液加入 DEAE cellulose-52 色谱柱 (2 cm×60 cm),配制不同浓度的 NaCl 溶液(0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L)作为流动洗脱相,流速 2 mL/min,每管收集 5 mL 的洗脱液于试管中,采用硫酸苯酚法[10],在 490 nm 波长下测定吸光度值,横坐标为管数,纵坐标为吸光度值做洗脱曲线图。并将收集的“南薯 88”多糖命名为 N88P-1。

**1.2.3 N88P-1 的分子量测定** 称取 5 mg N88P-1 样品用 1 mL 蒸馏水溶解,超声 5 min。用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定 N88P-1 的分子量。测得的数据用 GPC 软件与葡聚糖制备标准曲线对照得到分子量[11-12]。

**1.2.4 N88P-1 的红外谱分析** 称取 N88P-1 样品 5 mg,在研钵中与 KBr 粉末一起研细后压片,在傅里叶红外光谱仪 4 000 $cm^{-1}$~400 $cm^{-1}$[13]的范围内扫描。

**1.2.5 N88P-1 的核磁共振分析** 称取 N88P-1 样品 20 mg 溶解于 D2O 中,常温下在核磁共振仪上测定,400 MHz 测 $^1H$ NMR 谱,150 MHz 测 $^{13}C$ NMR 谱[14]。

**1.2.6 N88P-1 的水解** 称取 N88P-1 20 mg 到安瓿瓶,加入 2 mol/L 的 TFA 溶液[15] 5 mL,110 ℃完全密封水解 6 h,离心除残渣,烘干,用蒸馏水洗 3 次除去三氟乙酸,然后再加几滴甲醇,烘干后用水溶解,得到完全酸水解产物,保存备用。

**1.2.7 N88P-1 的单糖组成分析** N88P-1 经过三氟乙酸水解后得到完全酸水解产物,通过高效液相色谱仪[16]对 N88P-1 进行单糖组成分析。 色谱条件为:4.6 mm×250 mm,5 μm 色谱柱; 柱温:25 ℃;流动相:75% 乙腈;流速:1.4 mL/min;RID 检测器温度:35 ℃;进样量:5 μL。

**1.2.8 N88P-1 对 $ABTS^+$ 自由基清除能力的测定** 将 N88P-1 样品用蒸馏水配制成浓度梯度(0.5、1、2、3、4、5、10 mg/mL), 取配制好的各浓度溶液 2 mL 于试管, 分别加入 2 mL $ABTS^+$ 自由基工作液,振荡混合,室温放置 20 min,测定吸光度值 $A_1$;同时取配制好的各浓度溶液 2 mL, 分别加入 2 mL 蒸馏水,测得 734 nm 处的吸光度值 $A_2$;再测定 734 nm 处 2 mL 蒸馏水与 2 mL $ABTS^+$ 自由基工作液的吸光值, 记为 $A_0$。重复测三次, 阳性对照组为 VC。$ABTS^+$ 自由基清除能力 $=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times100\%$[17]。

**1.2.9 N88P-1 对 $DPPH^-$ 自由基清除能力的测定** 将 N88P-1 样品用蒸馏水配制成浓度梯度(0.5、1、2、3、4、5、10 mg/mL),取配制好的各浓度溶液 2 mL,加入 2.0 mL 0.2 mmol/L DPPH – 溶液[18-19],测定 517 nm 处的吸光度值 $A_1$;同时测定 2 mL 样品溶液与 2 mL 水在 517 nm 处的吸光度值 $A_2$; 在 517 nm 处测定水和 $DPPH^-$ 溶液的吸光度值 $A_0$。重复测 3 次,阳性对照组为 VC。

$DPPH^-$ 清除能力 $=[(A_1-A_2)/A_0]\times100\%$。

**1.2.10 N88P-1 对 T、B 细胞和 RAW264.7 细胞的增殖作用** 用细胞计数试剂盒 CCK-8 [20](cell counting kit) 法测定 N88P-1 对 T、B 细胞和 RAW264.7 细胞的增殖实验中的细胞数。用培养液溶解 N88P-1 多糖,用 0.22 μm 滤器除菌储存备用,

用时用培养液逐级稀释(2.5、5、10、20、40、80 μg/mL)。取对数生长期的 T、B 细胞和 RAW264.7 细胞,更换新鲜的培养液,并用培养液稀释至 $2\times10^5$ 细胞/mL,将 PBS 缓冲液加入 96 孔板的四周,保持无菌的水环境,再在其余的孔加入 100 μL 细胞稀释液。在 37 ℃、5% $CO_2$ 的培养箱中培养 24 h 后,依次加入 100 μL 细胞培养液(空白对照)、LPS(终质量浓度 10 μg/mL,阳性对照)以及不同浓度的 N88P-1 溶液,在 37 ℃、5% $CO_2$ 的培养箱中培养 24 h。每孔加入 CCK-8 溶液 5 μL 继续培养 3 h,测定 450 nm 下吸光值,记录结果。绘制以浓度为横坐标,吸光值为纵坐标的曲线,并拍照。

**1.2.11 统计与分析** 所有数据均用 mean±SD 表示,用 t-test 检验差异的显著性,与对照组对比显著用 * 表示,$P<0.05$,极显著用 ** 表示,$P<0.01$。

## 2 结果与分析

### 2.1 N88P - 1 EAE cellulose-52 色谱柱层析分级结果

DEAE cellulose-52 纤维素柱填料为阴离子交换剂,是一种颗粒大小为 50 μm 的高度交联纤维素。多用于分离提纯多糖、核苷酸等生物大分子。多糖在硫酸的作用下先水解成单糖,并迅速脱水生成糖醛衍生物,然后与苯酚生成橙黄色化合物,再以比色法测定。本研究采用 DEAE cellulose-52 色谱柱,用不同浓度的 NaCl 溶液(0 mol/L、0.1 mol/L、0.2 mol/L、0.3 mol/L、0.4 mol/L、0.5 mol/L)作为流动洗脱相,采用硫酸苯酚法在 490 nm 测定多糖的吸光度值,洗脱曲线如图 1 所示,用 0.1 mol/LNaCl 洗脱时出现一个较大的洗脱峰,合并 0.1 mol/L NaCl 段中第 4~8 管中的多糖溶液,浓缩干燥后得到淡黄色无定型粉末,即"南薯 88"多糖(N88P-1)。

### 2.2 N88P-1 高效凝胶渗透色谱(HPGPC)结果

本研究采用高效凝胶渗透色谱法(HPGPC)测定 N88P-1 的分子量。结果显示(见图 2),在 14 min 左右出现单一峰,曲线呈对称分布的钟罩型曲线,提示 N88P-1 是单一多糖成分,无其他杂质。同时,测得的 N88P-1 的重均分子量为 14 328 D,数均分子量为 4 707 D,峰值分子量为 7 199 D,多分散系数为 3.04(见图 3)。

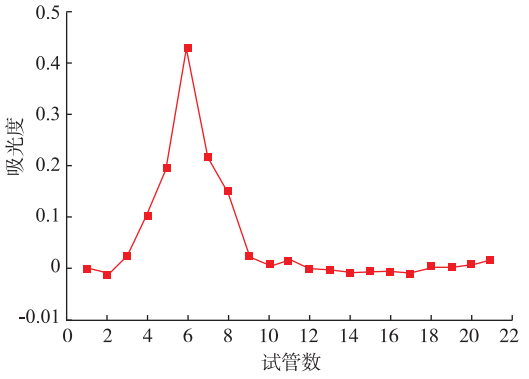



**图 1 N88P-1 的 DEAE cellulose-52 纤维素柱层析洗脱曲线**

**Fig. 1 Chromatogram of N88P-1 on a DEAE cellulose-52 column**

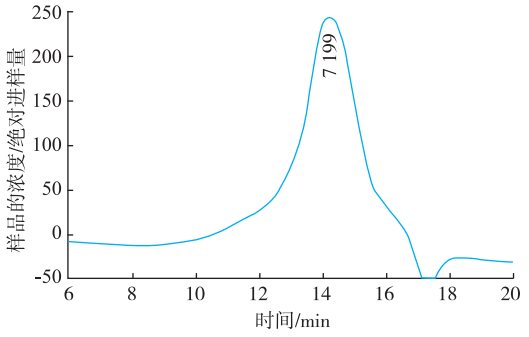



**图 2 N88P-1 的高效凝胶渗透色谱**

**Fig. 2 High performance gel permeation chromatogram of N88P-1**

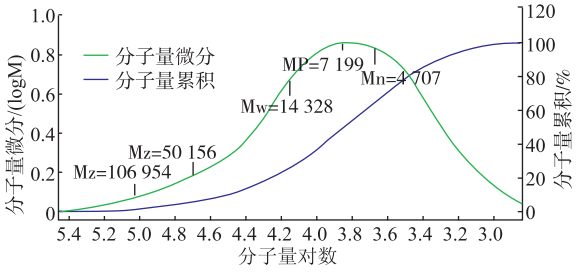



**图 3 N88P-1 的分子量**

**Fig. 3 Molecular weight of N88P-1**

### 2.3 N88P-1 的 FTIR 谱分析

傅里叶红外光技术(FTIR)是对多糖的酯化度进行定量分析的方法,操作简单,重现性好。本研究采用傅里叶红外光技术在 4 000~460 $cm^{-1}$ 范围内测定 N88P-1 的红外吸收。数据如图 4 所示,3 444.81 $cm^{-1}$ 出现的一处宽吸收峰宽吸收峰指定为 O-H 的伸缩振动峰,这说明 N88P-1 存在分子内或分子间氢键;1 640.20 $cm^{-1}$ 指定为 C=O 的伸缩振动峰;1 401.27 $cm^{-1}$ 附近的吸收峰是由 C-H 的变角振动引起。以上显示了多糖在 1 400~4 000 $cm^{-1}$ 范围内

的特征吸收峰。在指纹峰区域范围内 950~1 250 $cm^{-1}$ 的一组峰是 2 种 C–O 的伸缩振动引起的，1 种是 C–O–C 的振动峰，另 1 种是 C–O–H 的吸收峰(N88P–1 的吸收峰在 1 102.25 $cm^{-1}$ 和 1 041.70 $cm^{-1}$ 处)。该结果进一步证明此物质为多糖结构，特征峰明显，且成分单一，无其他结构特征峰，应为纯品多糖。

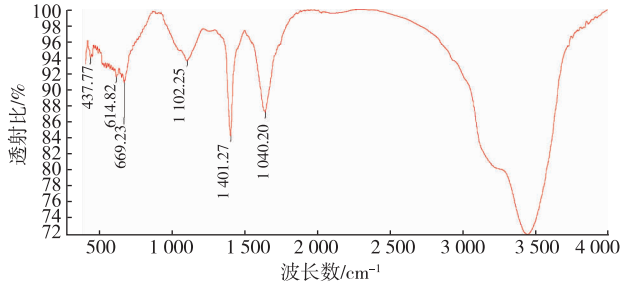



**图 4　N88P–1 的红外分析**

**Fig. 4　Fourier transform infrared spectra of N88P–1**

## 2.4　N88P–1 的 $^1$H–NMR 谱分析

N88P–1 的 $^1$H–NMR 谱如图 5 所示，结果显示 N88P–1 杂质含量较少。在 δ 4.93~δ 4.86 存在单糖异头氢信号。δ 3.19~δ 4.39 为各单糖中 2–6 位碳上的氢信号峰的重叠，其中 δ 3.18~δ 3.30 可指示为单糖亚甲基上的氢信号。δ 4.08~δ 4.39 可指示为单糖 3 位碳上的氢信号。δ 4.67 则指示为溶剂重水的氢信号。

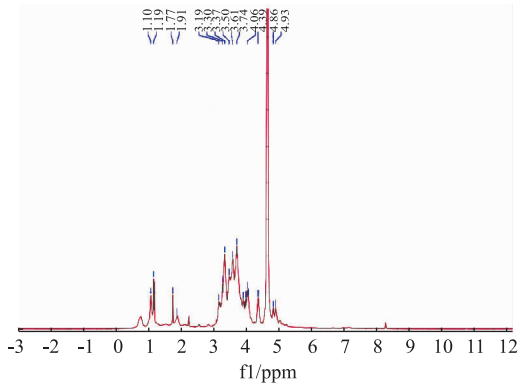
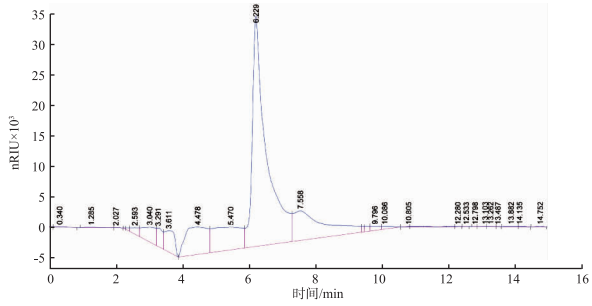



**图 5　N88P – 1 的 $^1$H NMR 谱数据**

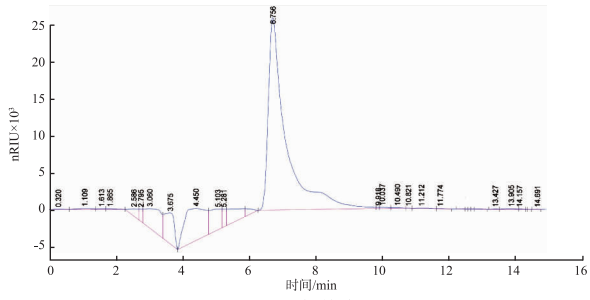
**Fig. 5　$^1$H NMR spectra of N88P–1**

## 2.5　N88P–1 的高效液相色谱(HPLC) 结果

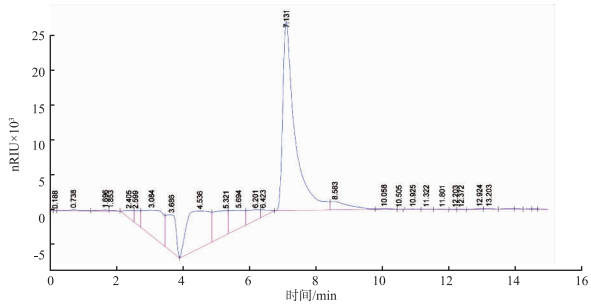
采用高效液相色谱法(HPLC)测定多糖的单糖组成，此方法操作简单，灵敏度高，反应条件温和。本研究通过三氟乙酸(TFA) 得到 N88P–1 的完全酸水解产物，采用高效液相色谱法得到高效液相色谱，再对比各种单糖的出峰时间分析 N88P–1 的单糖组成。结果显示，在保留时间为 7.294 min 及 7.955 min 处有两处明显的吸收峰 (图 7)，与单糖(包括葡萄糖，甘露糖，果糖等)的高效液相图谱(图 6)对比发现，该两处吸收峰分别与甘露糖(保留时间为 7.386 min)和半乳糖(保留时间为 8.014 min)的吸收峰吻合。提示 N88P–1 由甘露糖和半乳糖两种单糖组成，同时吸收峰峰面积比值提示甘露糖和半乳糖两种单糖比例为 1:1。



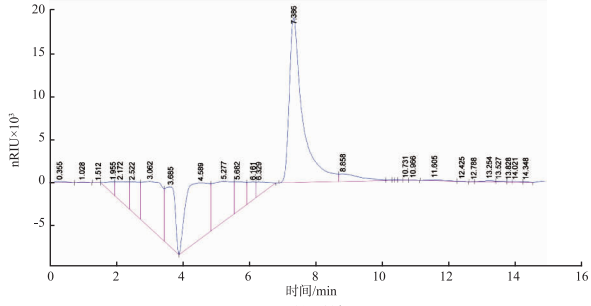

(a)木糖




(b)阿拉伯糖




(c)果糖




(d)甘露糖

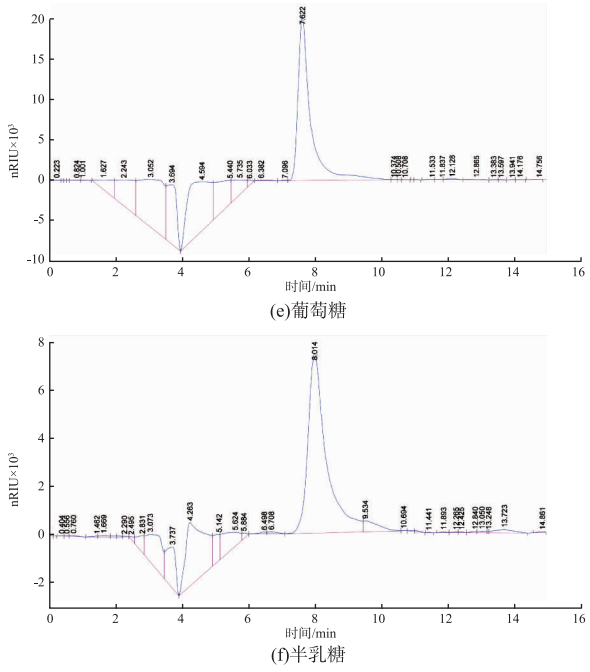



图 6　高效液相图谱

Fig. 6　Analysis of standard monosaccharides by HPLC

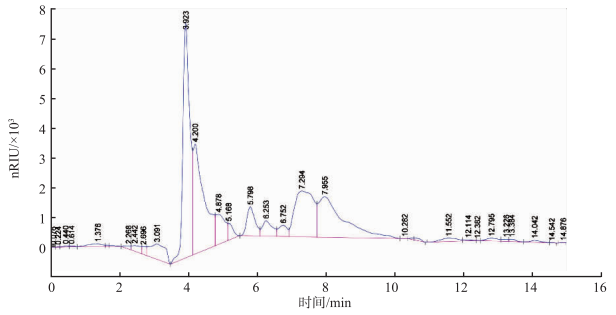



图 7　高效液相色谱法测定 N88P-1 的单糖组分分析

Fig.7　Component monosaccharides analysis of N88P-1 by HPLC

## 2.6　N88P-1 对 ABTS 自由基的清除能力

适当的氧化剂会使 ABTS 氧化为绿色，如果存在抗氧化物，就会抑制绿色产物的生成。抗氧化物的浓度不同会造成 ABTS 的产物颜色改变，抗氧化物越强则产物的颜色越浅，并在 734 nm 的波长下测定吸光度值，计算总抗氧化能力。如图 8 所示，在一定浓度的范围内，N88P-1 对 ABTS 自由基的清除率和 N88P-1 浓度有一定的量效关系，ABTS 自由基的清除率随着 N88P-1 浓度的增加而逐步增加。在低浓度(< 2 mg/mL)时，提高 N88P-1 浓度，清除率增加明显；同时其 $IC_{50}$ 值为 0.48 mg/mL。当 N88P-1 的浓度为 3 mg/mL 时，清除率可达到最大值。其后再增加 N88P-1 的浓度，对 ABTS 的清除率提高不大。值得注意的是，低浓度的 VC 对 ABTS 自由基的清除作用强于 N88P-1，但随着浓度的增大 N88P-1 和维生素 C 清除能力接近。

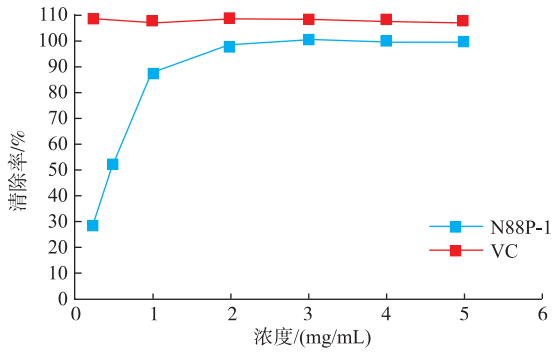



图 8　N88P-1 对 ABTS 自由基的清除能力

Fig. 8　ABTS radical cation scavenging activity of N88P-1

## 2.8　N88P-1 对 DPPH 自由基的清除能力

DPPH 溶液是一种在 517 nm 波长处有一个特征吸收峰，为紫色的一种化合物。适当的自由基清除剂会与 DPPH 自由基反应导致反应颜色变浅，517 nm 处测定的吸光度值也会变小，所以判定 DPPH 自由基的清除效果可以通过测定吸光度。本实验研究 N88P-1 对 DPPH 自由基的清除能力结果如图 9 所示，在低浓度的范围内，N88P-1 对 DPPH 自由基的清除率与浓度呈正相关，$IC_{50}$ 值为 0.96 mg/mL，其中，N88P-1 对 DPPH 自由基清除的最适浓度为 3 mg/mL。

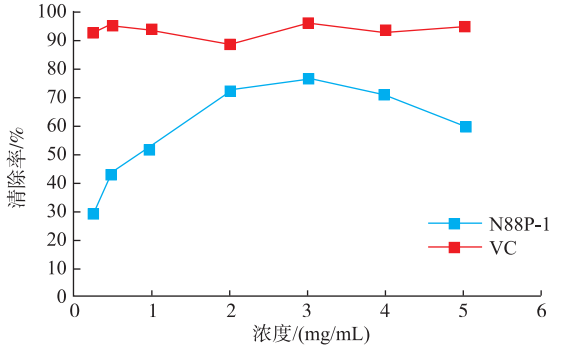



图 9　N88P-1 对 DPPH 自由基的清除能力

Fig. 9　Scavenging effect of N88P-1 on 1,1-dipheyl-2-picrydrazyl radicals

## 2.9　N88P-1 对 T 淋巴细胞的增殖作用

T 淋巴细胞简称 T 细胞，由骨髓中的造血干细胞迁移到胸腺内分化成熟，成为具有免疫活性的 T 细胞。成熟的 T 细胞能与靶细胞特异性结合，直接

杀伤靶细胞,或释放淋巴因子,使得免疫效应增强,主要参与机体的细胞免疫。T 增殖效果如图 10 所示,对照组为浓度为 10 μg/mL 的 LPS。N88P-1 在 2.5~80 μg/mL 的浓度范围内,与 T 细胞增殖效果呈正相关;N88P-1 浓度为 5~10 μg/mL 时,T 细胞增殖效果显著($P$<0.05),在浓度为 20~80 μg/mL 时,T 细胞增殖效果为极显著($P$<0.01);当 N88P-1 浓度在 40 μg/mL 时达到最大值($P$<0.01),继续增大浓度,细胞受到周围环境的影响导致细胞增殖效果反而下降。

T 细胞的增殖形态如图 11 所示。随着 N88P-1 浓度的增大,细胞加速分裂,变大成团。在用 40 μg/mL 的 N88P-1 浓度刺激时,细胞成团最多且最大。

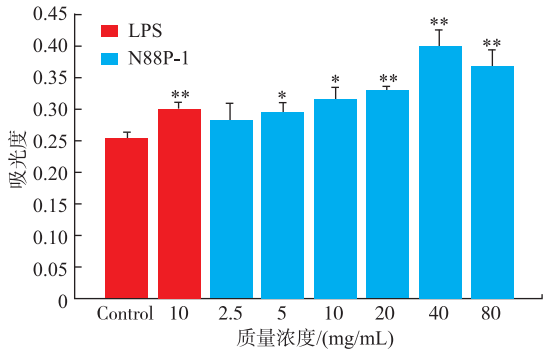
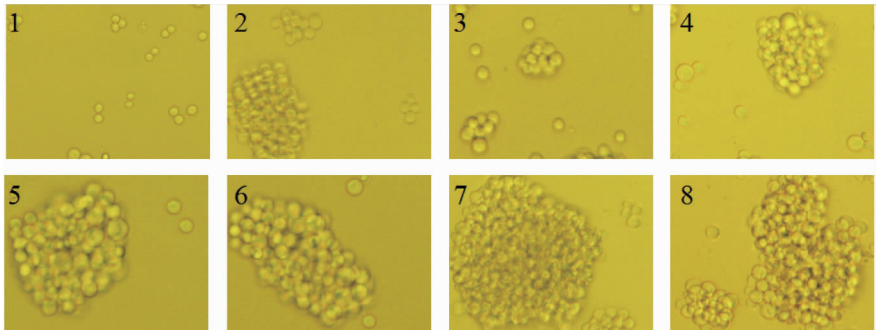



**图 10 N88P-1 对 T 细胞增殖的影响**

**Fig. 10 Effect of N88P-1 on the cell proliferation of T cell**




注:1 为空白组,3-8 为 N88P - 1 实验组,其质量浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80 μg/mL,2 为 LPS 组(10 μg/mL)

**图 11 N88P-1 对 T 细胞形态的影响**

**Fig. 11 Effect the cell morphology of T cell by N88P-1**

### 2.10 N88P-1 对 B 淋巴细胞增殖的影响

B 淋巴细胞来源于骨髓的多能干细胞,能够分泌抗体,是体液免疫的主要介质。B 细胞的增值效果如图 12 所示,对照组为 10 μg/mL 的 LPS。N88P-1 在浓度为 2.5~10 μg/mL 时,增殖效果显著;在浓度为 20~80 μg/mL 的时,增殖效果达到极显著($P$<0.01);在 40 μg/mL 的浓度增殖效果亦为最好。从形态上看,B 细胞呈规则的圆形,明显的集簇生长。本研究的 B 细胞增殖形态如图 13 所示,B 细胞悬浮在培养孔中,生长状态良好,受到 N88P-1 刺激后,细胞体积变大后聚成团,增殖能力旺盛。

激活巨噬细胞后能在抵御感染和抗肿瘤方面发挥着重要作用。本研究采用 CCK-8 法检测巨噬细胞增殖效果如图 14 所示,N88P-1 浓度为 2.5 μg/mL 时,增殖并不显著;浓度为 5 μg/mL 时增殖效果显著($P$<0.05);N88P-1 浓度继续增加为 10~40 μg/mL 时,N88P-1 对巨噬细胞增殖效果为极显著($P$<0.01);但是,当 N88P-1 浓度为 80 μg/mL 时,增殖效果反而降低为显著($P$<0.05)。

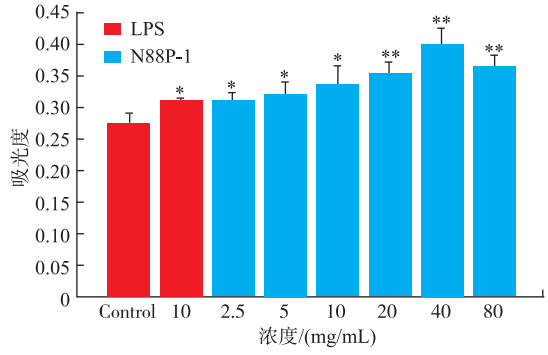
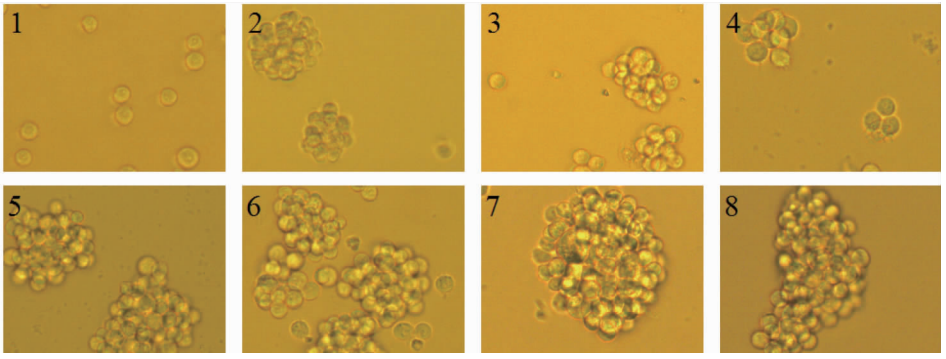



**图 12 N88P-1 对 B 细胞增殖的影响**

**Fig. 12 Effect of N88P-1 on the cell proliferation of B cell**

巨噬细胞体积大,有伪足且有马蹄状单核,在细胞板中培养的时候易于沉降和贴壁。本研究巨噬细胞增殖形态如图 15 所示。在 N88P-1 的刺激下,巨噬细胞伸出伪足,进行分裂;在图 15 中可以看出,空白组的巨噬细胞多呈圆形;而 N88P - 1 实验组的巨噬细胞伸出伪足,只有少量的圆形细胞,提




注:1 为空白组,3-8 为 N88P-1 实验组,其质量浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80 μg/mL,2 为 LPS 组(10 μg/mL)

**图 13 N88P-1 对 B 细胞形态的影响**

**Fig. 13 Effect the cell morphology of B cell by N88P-1**

示N88P-1 能有效的促进巨噬细胞的增殖作用。

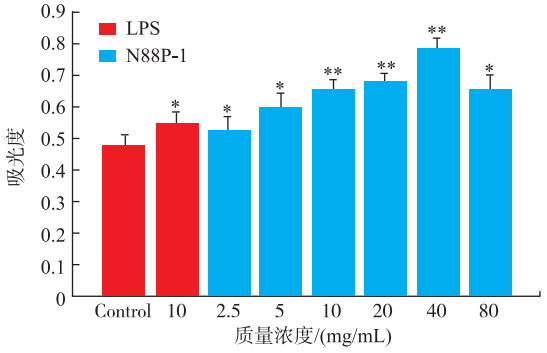


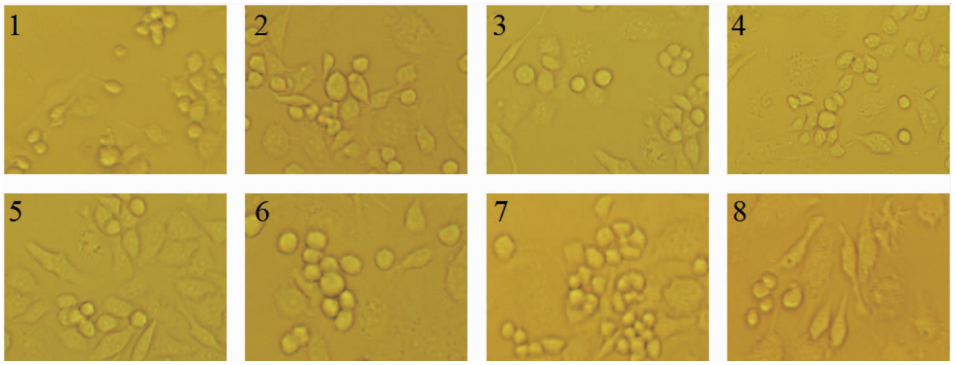

**图 14 N88P-1 对巨噬细胞增殖的影响**

**Fig. 14 Effect of N88P -1 on the cell proliferation of RAW264.7 cell**

## 3 讨论与结语

蛋白质、核酸与多糖共同构成人体内三大物质。蛋白质与核酸的发展较为成熟,相比之下的多糖因复杂性和多样性而发展较晚,因此,对多糖结构鉴定都提出了巨大挑战。本研究以南充市农业科学研究院专利品种“南薯 88”为对象,用热水浸提法,DEAE-cellulose column 进行柱层析分离纯化后得到多糖纯品(N88P-1)。分别进行高效凝胶渗透色谱(HPGPC),红外光谱技术(IR)和核磁共振技术(NMR)等现代化技术对 N88P-1 进行了初步的结构分析; 结果显示,N88P-1 由半乳糖和甘露糖组成,且比例为 1:1。这是首次确定“南薯 88”多糖(N88P-1) 的单糖类型和含量,为进一步确定“南薯 88”多糖(N88P-1) 的精细结构提供了很好的基础。

活性氧产生于细胞或组织的正常生理代谢等过程,活性氧能够对蛋白质、核酸等生物大分子产生损伤。本研究采用 $ABTS^{+}$和 $DPPH^{-}$ 检测 N88P-1 的总抗氧化能力。结果显示,一定范围内的 N88P-1 浓度具有清除 $ABTS^{+}$ 自由基的能力, 且对 ABTS 自由基的清除能力强于对 DPPH 自由基的清除能力。




注:1 为空白组,3-8 为 N88P-1 实验组,其质量浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80 μg/mL,2 为 LPS 组(10 μg/mL)

**图 15 N88P-1 对巨噬细胞形态的影响**

**Fig. 15 Effect the cell morphology of RAW264.7 cell by N88P-1**

当N88P-1的质量浓度为3 mg/mL时,对$ABTS^+$和$DPPH^-$自由基的清除能力均达到最高值。DPPH作为一种稳定的自由基,可以捕获其他的自由基。而N88P-1是一种高分子化合物,随着质量浓度的增加,糖链相互缠绕,很难与DPPH自由基反应,因此可能导致DPPH自由基清除率降低。

免疫细胞中T细胞、B细胞和巨噬细胞在人体免疫系统中起着非常重要的作用。本研究分别用N88P-1激活T细胞、B细胞、巨噬细胞的增殖来调控免疫活性。N88P-1在20~80 mg/mL的质量浓度下,对B细胞和T细胞增殖效果为极显著($P<0.01$);在10~40 mg/mL的质量浓度下,对巨噬细胞增殖效果为极显著($P<0.01$),提示N88P-1对巨噬细胞的增殖作用强于对T淋巴细胞核B淋巴细胞的增殖作用。但值得注意的是,N88P-1在40 mg/mL的质量浓度下对3种免疫细胞的增殖效果均达到最佳。

综上,“南薯88”多糖(N88P-1)作为一类生物大分子,对不同类型自由基具有不同的清除效率,且对不同的免疫细胞具有不同的增殖效果,可以作为一种天然来源的抗氧化剂及免疫调控剂资源。但是关于“南薯88”多糖(N88P-1)的精细结构及抗氧化作用和免疫调控作用的相关分子机制还有待于进一步研究。

## 参考文献:

[1] ZHANG Yu,WU Yinan,CHEN Li,et al. Reviews on research advances on chemical composition of sweet potato vines and leaves[J]. **Food Science**,2006,27(3):252-256.(in Chinese)

[2] SONG Jixuan,CHEN Chao,LI Yun,et al. Research on physiologic characteristic in high yield of sweet potato Nanshu 88[J]. **Seed**,2010,29(3):94-95.(in Chinese)

[3] DENG Xiaoyun,DING Dengfeng,DAI Meihong,et al. Study progress of plant polysaccharides in pharmacological action[J]. **Guiding Journal of Tcm**,2006,12(9):87-88.(in Chinese)

[4] ZHOU Qisheng,LIU Xunli,DUAN Zuan. Progress of research,development and application of plant polysaccharides[J]. **Science of Sericulture**,2010,36(3):465-469.(in Chinese)

[5] LIU Zhu,LIU Guoling,ZHU Bifeng,et al. The experimental study of sweet potato polysaccharide on antitumor [J]. **Food Research & Development**,2006,27(8):28-30.(in Chinese)

[6] HAN Qiuju,WEI Baohai. Optimization of extraction process for flammulina velutipes polysaccharides by ultrasonic-assisted extraction[J]. **Chemistry & Bioengineering**,2013,30(4):70-72.(in Chinese)

[7] WANG Fang,DING Xiang,SONG Bo,et al. Extraction,purification and antioxidant activity of oligosaccharides from *Hericium erinaceus*[J]. **Journal of Sichuan University(Natural Science Edition)**,2013(6):1339-1346.(in Chinese)

[8] DING X,HOU Y L,HOU W R. Structure feature and antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from *Lactarius delicious* Gray[J]. **Carbohydr Polymers**,2012,89(2):397-402.

[9] WEI Jie,LYU Lei,JIN Lili,et al. Extraction and monosaccharide composition analysis of polysaccharides from *Eggplant branches*[J]. **Food Science**,2015,36(4):168-171.(in Chinese)

[10] LIU Jie,ZHANG Tixiang,YU Liqin,et al. Separation,purification and structural identification of polysaccharide from *Ipomoea batatas* Lam leaves[J]. **Journal of Henan University of Technology(Natural Science Edition)**,2010,31(5):46-50.(in Chinese)

[11] DING X,HOU Y L,HOU W R. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Boletus speciosus* Forst[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2012,50(3):613-618.

[12] ZHANG Yanrong,YU Jun,LIU Xiangyang,et al. Isolation,purification and relative molecular mass determination of corn bran polysaccharides[J]. **Food Science**,2010,31(10):16-19.(in Chinese)

[13] LIU Ying,ZHAO Jie.The Preliminary studies of polysaccharide structure in kalgan mushroom[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**,2012,28(24):278-282.(in Chinese)

[14] GONG Chunyu,TANG Qingjiu,ZHANG Jinsong,et al. Isolation,purification and identification of immunomodulation polysaccharide from *Gracilaria lemaneiformis* (*Gracilariales*,*Rhodophyta*)[J]. **Natural Product Research And Development**,2010,22(4):603-606.(in Chinese)

[15] LI Weiyan,LI Ping,CAO Wei,et al. A new method to determine the monosaccharides composition in the acidic polysaccharides

extracted from the roots of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels by HPLC[J]. **Science Technology and Engineering**,2015,15(10):151-154.(in Chinese)

[16] NI Lijun,WANG Yuanyuan,HE Wanying,et al. Monosaccharide composition,activity and their correlation analysis in eight polysaccharides[J]. **Journal of Tianjin University**,2014,47(4):326-330.(in Chinese)

[17] DING X,HOU Y L,HOU W R. Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Boletus speciosus* Forst[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**,2012,50(3):613-618.

[18] ZHAO Mouming,ZOU Linwu,YOU Lijun,et al. Effects of extraction methods on lentinan properties [J]. **Journal of South China University of Technology(Natural Science Edition)**,2013,41(10):26-33.(in Chinese)

[19] LIU Jiting,LU Xiaoli,ZHANG Ziping,et al. Effect of processing method on antioxidant activity of polysaccharides from *Cortinarius purpurascens* Fr[J]. **Food Science**,2015,36(4):6-10.(in Chinese)

[20] ZHANG Yuan,SHANG Xiaoya,XU Chunlan,et al. Research progress of the pmmunomodulation of potanical polysaccharides on lymphocytes[J]. **Chemistry and Bioengineering**,2012,29(12):1-6.(in Chinese)

## 会　议　消　息

**会议名称:中国化学会第三届全国糖化学会议**

会议时间:2019 年 9 月 21–22 日

会议地点:河北省保定市

主 办 方:中国化学会

承 办 方:1、河北大学;2、河北省化学会;3、山东大学国家糖工程技术研究中心;4、江西师范大学国家单糖化学合成工程技术研究中心

会议主题:创新发展、探索未来

大会主席:叶新山、王鹏、俞飚

预计规模:200 人

会议网站:http://www.chemsoc.org.cn/meeting/carb2019/

联 系 人:1、陈华; 2、刘磊

电子邮箱:1、hua-todd@163.com; 2、ccesliulei@126.com

电　　话:1、13933979191; 2、13930825687

地　　址:河北省保定市五四东路 180 号

会议内容:交流近年来糖化学领域的最新研究进展,探讨糖化学的发展未来,促进糖化学及其与相关学科的融合创新,助推相关产业的健康发展。