

芋头多糖的分离纯化及对细胞免疫的调节作用

姜绍通, 汪洪普, 潘丽军

(合肥工业大学农产品加工研究院, 生物与食品工程学院, 安徽省农产品精深加工重点实验室, 安徽 合肥 230009)

摘要: 对自提精制芋头多糖(TPS)进行分离纯化, 研究各组分的化学特征及对小鼠体外免疫细胞功能的影响。通过水提醇沉, 酶法辅助Sevag法去蛋白, 透析, 冷冻干燥得TPS, 经DEAE-52离子交换柱和SephadexG-75凝胶色谱柱分离纯化得到3种多糖组分。紫外光谱扫描(UV)和高效液相色谱法(HPLC)鉴别多糖的纯度, 气相色谱法(GC)分析单糖组成及物质的量比, 小鼠体外MTT实验测定脾淋巴细胞增殖活性, 吞噬中性红实验测定巨噬细胞吞噬功能。结果表明: TPS多糖含量为95.21%, 分离纯化后得到TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2} 3种主要组分, HPLC和UV分析结果表明TPS_{1p}和TPS_{2p1}是单一纯品多糖, 而TPS_{3p2}可能是一种糖蛋白; GC分析结果表明3种组分都是由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖4种单糖组成; MTT实验表明25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 3种质量浓度的TPS_{1p}和100 $\mu\text{g/mL}$ 的TPS_{2p1}、TPS_{3p2}均可较强的协同ConA促进小鼠脾淋巴细胞的增殖; 吞噬实验结果表明25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度的TPS_{1p}和50 $\mu\text{g/mL}$ 的TPS_{2p1}和TPS_{3p2}均可提高小鼠巨噬细胞的吞噬能力。

关键词: 芋头; 多糖; 分离; 纯化; 细胞免疫

Isolation, Purification and Immunoregulatory Property of Polysaccharides from Taro (*Colocasia esculenta*)

JIANG Shao-tong, WANG Hong-pu, PAN Li-jun

(Key Laboratory for Agriculture Processing of Anhui Province, Institute of Food Science and Engineering, School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: The present study aimed to isolate and purify polysaccharides (TPS) from taro (*Colocasia esculenta*). The chemical characteristics and immunoregulatory property of purified fractions were explored. The crude TPS was extracted with hot water and then subjected to protein removal by the enzymatic-assisted Sevag method. TPS obtained after dialysis and freeze-drying underwent further purification by DEAE-52 and Sephadex G-75 column chromatography and three homogeneous components were obtained. The purity and chemical composition were determined by UV spectroscopy and HPLC and by gas chromatography (GC), respectively. The viability of mouse spleen cells treated with TPS fraction was determined by MTT assay and the activation of peritoneal macrophages were analyzed by neutral red phagocytosis assay. The results showed that TPS contained 95.21% carbohydrate. Three fractions TPS_{1p}, TPS_{2p1} and TPS_{3p2} were obtained after separation and purification. Data from UV spectroscopy and HPLC analysis revealed that TPS_{1p} and TPS_{2p1} were two types of homogeneous polysaccharides while TPS_{3p2} might be a glycoprotein. All the three homogeneous polysaccharides were made of arabinose, mannose, glucose and galactose as demonstrated by GC analysis. The MTT assays showed that at the doses of 25, 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$, TPS_{1p} could function synergistically with ConA to promote the cell proliferation of spleen lymphocytes in normal mice, while this synergy was also observed for TPS_{2p1} only at 100 $\mu\text{g/mL}$ and TPS_{3p2} at 50 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$. Meanwhile, TPS_{1p} at varying doses could markedly improve the phagocytotic capacity of macrophages in mice. At 50 $\mu\text{g/mL}$, TPS_{2p1} and TPS_{3p2} also showed this activity.

key words: *Colocasia antiquorum*; polysaccharides; separation; purification; immunity regulation

中图分类号: Q949.71

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)19-0287-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201319059

芋头别名为芋魁、土芝, 俗称芋艿, 属天南星科^[1]。芋头中含有丰富的淀粉、膳食纤维、多糖、维生素和矿

物质元素, 不仅可食用, 还具有宽肠胃、补脾胃、腹中癖块、消痞散结等作用, 主治肿毒、牛皮癣、烫火伤等

收稿日期: 2012-09-18

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD02B02); 安徽省科技攻关计划项目(11010301012)

作者简介: 姜绍通(1954—), 男, 教授, 主要从事农产品生物化工研究。E-mail: jiangshaotong@yahoo.com.cn

症^[2]。早期研究报道认为其主要功效与其含有花青苷、甾醇和过氧化氢酶等活性成分有关,特别是其中丰富的多糖可能具有重要作用,已有报道芋头中含有水溶性多糖,且富含杂聚糖^[3]。多糖是自然界中储量丰富的生物聚合物,具有能量储存、结构支持、防御作用和抗原决定性等多方面的生物功能。而植物多糖具有特殊的生物活性,如协助消化、抗疲劳、抗病毒、抗菌消炎、抗衰老、抗辐射、抗肿瘤、降血糖、降血脂及免疫调节等^[4-6]。

目前国内关于芋头多糖的提取工艺和抗氧化活性具有初步的研究,有研究表明芋头中的一种中性多糖能够增强小鼠的体内免疫活性,也有报道表明芋头粗多糖具有良好的体外抗氧化性,但关于芋头多糖系统的分离纯化以及各组分的活性能力高低鲜有报道^[7-8]。植物多糖的分离纯化方法多采用离子交换和凝胶柱层析相结合的方法,而纤维素离子交换柱是一种常用的柱层析介质,本实验采用DEAE-52离子纤维素交换层析柱和Sephadex G-75凝胶色谱柱层析相结合对芋头粗多糖(TPS)进行分离纯化,并对其纯度、单糖组成和体外免疫细胞的调节功能等进行研究,比较各组分多糖对细胞免疫不同的调节能力,以期为芋头多糖的进一步研究进行探讨。

1 材料与amp;方法

1.1 动物、材料与试剂

健康昆明种SPF级雄性小鼠(体质量 (20 ± 2) g),购于安徽医科大学动物中心,合格证号为SCXK(皖)2011-002)。

芋头购于合肥家乐福。

Cellulose DEAE-52纤维素、Sephadex G-75葡聚糖凝胶 美国Whatman公司;刀豆球蛋白A(concanavalin A, ConA)、噻唑蓝(MTT) 美国Sigma公司;RPMI-1640完全培养液、台盼蓝染液 北京索莱宝科技有限公司;苯酚、浓硫酸、无水乙醇、95%乙醇、无水乙醚、丙酮、三氯甲烷、正丁醇、葡萄糖(均为分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

NJL07-3型实验用微波炉 南京杰全仪器有限公司;R-201旋转蒸发器 上海申胜生物技术有限公司;QP 2010气相色谱-质谱联用仪 日本岛津公司;UV757CRT紫外-可见分光光度计 上海成光仪器有限公司;Agilent 1100凝胶色谱仪 美国Agilent公司;Bio-Rad Model 680 CO₂培养箱 美国Bio-Rad仪器公司;HC-3018R型高速冷冻离心机 安徽中科中佳科学仪器有限公司;BS-100A-LCD自动部分收集器 上海琪特分析仪器有限公司;MCO-17AIC酶标仪 赛默飞世尔仪器有限公司;超净工作台 上海新竹机电设备有限公司。

1.3 方法

1.3.1 芋头精制多糖(TPS)的提取

新鲜芋头→清洗、去皮、切块→烘干质量至恒定→粉碎过40目筛→芋头干粉100g→加入3000mL蒸馏水微波预处理(400W, 80s)→80℃水浴提取3h→滤渣二次提取→合并滤液后浓缩→酶解去淀粉(先按照20U/g加入液化酶, 75℃, pH6.0酶解1.5h, 再按照200U/g加入糖化酶, 60℃, pH6.5酶解1.5h)→醇沉过夜→抽滤并用无水乙醇、无水乙醚、无水丙酮各淋洗2次→沉淀复溶→酶解脱蛋白(中性蛋白酶, pH6, 6h)→Sevaga法脱蛋白13次→H₂O₂脱色素→流水透析36h(分子质量3500D)→蒸馏水透析36h→浓缩后冷冻干燥→精制芋头多糖TPS

1.3.2 TPS含量的测定

采用苯酚-硫酸法^[9]。

1.3.3 TPS的DEAE-52离子交换层析柱层析^[10]

DEAE-52阴离子交换柱(C1⁻型)装柱(柱型: 1.6cm×80cm),先用蒸馏水平衡24h,准确称取1g TPS溶于最小体积的双蒸水中,6000r/min离心15min后取上清液上柱。依次用双蒸水以及0.1~0.5mol/L的NaCl溶液、以2.0mL/min的速率梯度洗脱,用自动部分收集器收集,以苯酚-硫酸法对TPS的洗脱情况进行跟踪测试,检测多糖的含量。以试管的管号为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线图。根据测定的结果合并多糖溶液,真空浓缩后对蒸馏水透析36h,冷冻干燥。主要组分中包括一个中性多糖组分TPS₁(0.572g)和两个酸性多糖组分TPS₂(0.165g)、TPS₃(0.187g)。

1.3.4 TPS主要组分的Sephadex G-75凝胶柱层析^[11]

Sephadex G-75凝胶柱(柱型: 1.6cm×60cm)装柱后用0.02mol/L的NaCl溶液平衡24h。上述3个组分TPS₁、TPS₂和TPS₃分别再过Sephadex G-75凝胶柱,称取0.2g多糖组分小心溶于最小体积的0.02mol/L NaCl溶液中,上样后用0.02mol/L NaCl来洗脱,洗脱速率为0.2mL/min,用自动部分收集器收集,每管收集2mL,苯酚-硫酸法跟踪检测糖含量,以管号为横坐标,吸光度为纵坐标绘制洗脱曲线图,收集合并主多糖峰,透析脱盐、冷冻干燥。得到3个主要的多糖组分TPS_{1p}(0.165g)、TPS_{2p1}(0.107g)和TPS_{3p2}(0.119g)。

1.3.5 TPS中3个多糖组分的纯度鉴定

紫外光谱扫描^[12]:将TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}配制成1mg/mL的溶液,以蒸馏水作为空白对照,紫外分光光度计在200~400nm范围内进行全波长扫描。

高效液相色谱法(HPLC)进行进一步的纯度鉴定,首先将样品配制成10mg/mL的多糖溶液,过0.45μL滤膜后进行HPLC分析^[13]。

色谱条件:Agilent1100高效液相色谱系统,色谱柱:TSK G3000PW色谱柱,流动相:0.1mol/L NaCl,

流速: 1.0mL/min, 柱温: 30℃, 示差折光检测器温度: 30℃。

1.3.6 TPS中3个组分的单糖组成分析

1.3.6.1 多糖水解及糖腈乙酸酯衍生化^[14-15]

多糖的水解: 分别取5mg 多糖样品, 溶解于4mL 2mol/L的TFA中后封管, 120℃水解4h, 浓缩至干再加入3mL甲醇继续蒸干, 重复4~5次除尽残留的TFA。将样品溶解于3mL蒸馏水中, 加30mg NaBH₄室温还原3h, 用25%乙酸中和过量NaBH₄至溶液不再产生气泡, 最后加3mL甲醇继续蒸干4~5次除去副产物硼酸及水分。于120℃烘箱中15min以充分除去水分, 得到各样品的单糖混合物, 备用。

糖腈乙酸酯衍生物的制备: 取上述的单糖混合物加入3mL乙酸酐和3mL吡啶, 密塞, 100℃反应1h, 减压浓缩加3mL三氯甲烷溶解后用水萃取洗涤多次, 最后用无水Na₂SO₄去除残留水分, 离心取上清液进行GC分析。各标准品单糖无需水解处理, 糖腈乙酸酯衍生物采用按上述方法制备。6种标准单糖分别为鼠李糖(Rha)、阿拉伯糖(Ara)、木糖(Xyl)、甘露糖(Man)、葡萄糖(Glu)、半乳糖(Gal)。

1.3.6.2 气相色谱(GC)检测条件^[16]

色谱柱: HP-5ms石英毛细柱(30m×0.32mm, 0.25μm); 程序升温: 色谱柱初温150℃, 保留1min, 以10℃/min升温至200℃, 再以4℃/min的升温速率升温到270℃, 保留1min; 气化室温度: 280℃; 检测器温度300℃; 载气He流速25mL/min; H₂流速40mL/min; 空气流速400mL/min; 分流比10:1; 柱流速1.5mL/min。

1.3.7 正常小鼠体外免疫细胞增值MTT实验^[17]

取健康昆明种SPF级雄性小鼠3只, 按文献[17]方法制得细胞浓度为3×10⁶个/mL的脾单细胞悬液。96孔板中每孔加入细胞悬液100μL, 空白对照组每孔加入100μL含有ConA和10%标准胎牛血清的RPMI-1640完全培养液(ConA的终质量浓度为5μg/mL), 实验组分别加入100μL不同质量浓度的TPS_{1p}、TPS_{2p2}、TPS_{3p1}、香菇多糖的RPMI-1640完全培养液(含ConA和血清), 使得多糖的终质量浓度分别为25、50、100μg/mL, 每组设6个复孔在饱和湿度、5%CO₂、37℃的培养箱中培养68h后, 每孔加入5mg/mL MTT 50μL, 继续培养4h后每孔再加入1mL酸性异丙醇, 混匀, 使紫色结晶完全溶解。用酶标仪于570nm波长处测定吸光度。结果以A_{570nm}值表示小鼠脾细胞能量代谢水平的高低。

1.3.8 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红实验^[18]

按照文献[18]的方法得到细胞数为1.5×10⁶个/mL的混悬细胞液。每孔100μL加入到96孔板中, 放入37℃、5%CO₂培养箱培养2h, 弃去上清液, 再用37℃的PBS洗去未贴壁的细胞, 贴壁的细胞即为巨噬细胞。于每孔

贴壁的巨噬细胞中加入不同质量浓度的TPS_{1p}、TPS_{2p2}、TPS_{3p1}和香菇多糖的RPMI-1640培养液(含血清)100μL, 使多糖终质量浓度分别为25、50、100μg/mL, 同时设空白对照组(不含多糖的培养液100μL), 每组设6个复孔。将培养板置于饱和湿度, 37℃、5% CO₂培养箱中培养24h后, 弃去上清液, 用37℃的PBS洗2次后加入0.072%中性红100μL/孔, 培养30min后弃去中性红, 用PBS洗3次, 加入细胞裂解液(V(0.1mol/L冰乙酸):V(无水乙醇)=1:1)200μL/孔, 4℃过夜, 用酶标仪于波长540nm处测吸光度。吞噬能力以实验组吸光度与空白对照组吸光度的比值表示。

2 结果与分析

2.1 芋头多糖DEAE-52离子交换柱层析结果

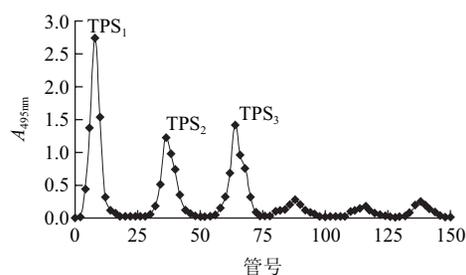


图1 TPS DEAE-52离子交换柱洗脱曲线

Fig.1 Elution curve of TPS on DEAE-52 anion exchange column

由图1可知, TPS经过双蒸水和0.1~0.5mol/L的NaCl溶液梯度洗脱后分离得到6个洗脱峰, 其中双蒸水洗脱组分的有一个最强的吸收峰, 说明芋头多糖中主要为中性多糖。同时TPS中还含有一部分的酸性多糖。由于0.3~0.5mol/L NaCl溶液洗脱峰较小, 考虑到后续葡聚糖凝胶柱层析的可操作性, 选取中性多糖组分TPS₁(2~18管)和0.1、0.2mol/L NaCl溶液分别洗脱的酸性多糖组分TPS₂(30~48管)和TPS₃(56~74管)作进一步的分离纯化。收集这3个组分, 透析脱盐后冷冻干燥, 得到TPS₁、TPS₂、TPS₃3种白色的多糖粉末, 其含量分别为57.20%、16.51%和18.72%。

2.2 TPS中3个组分的Sephadex G-75 凝胶柱层析结果

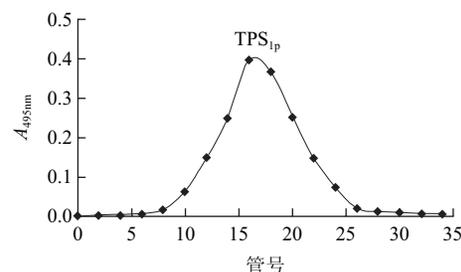
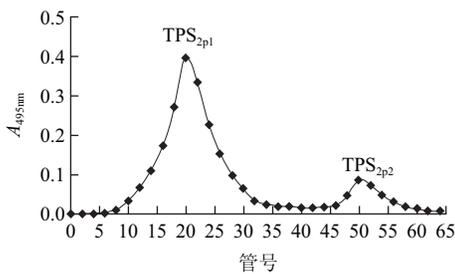
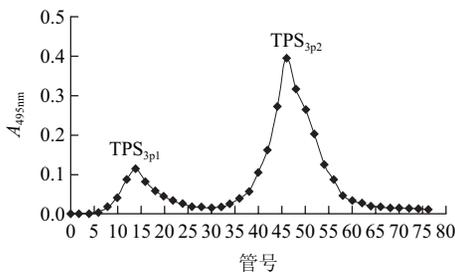


图2 TPS₁的Sephadex G-75 凝胶柱洗脱曲线

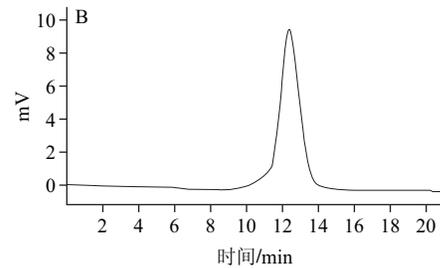
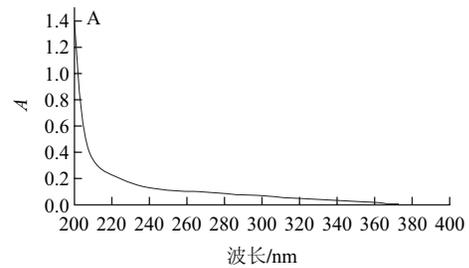
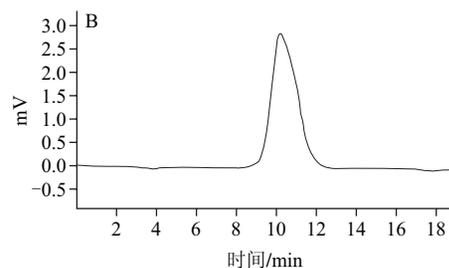
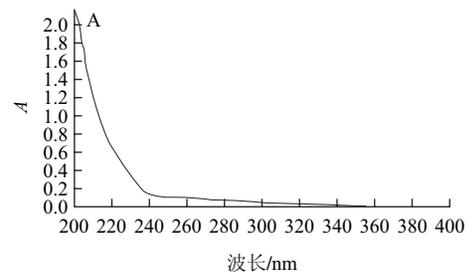
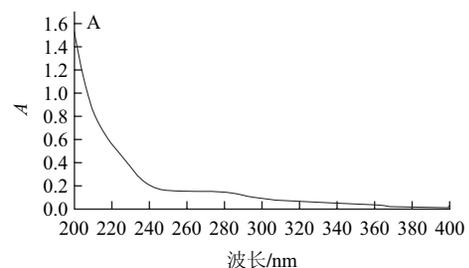
Fig.2 Elution curve of TPS₁ on Sephadex G-75 anion exchange column

图3 TPS₂的Sephadex G-75 凝胶柱洗脱曲线Fig.3 Elution curve of TPS₂ on Sephadex G-75 anion exchange column图4 TPS₃的Sephadex G-75 凝胶柱洗脱曲线Fig.4 Elution curve of TPS₃ on Sephadex G-75 anion exchange column

由图2可知,中性多糖TPS₁经过Sephadex G-75凝胶柱层析柱分离后得到一个单一的洗脱峰,说明TPS₁是单一的多糖组分,收集7~26管洗脱液,透析脱盐后冷冻干燥得到白色粉末状的中性多糖TPS_{1p}。由图3可知,酸性多糖TPS₂经过凝胶柱层析分离后得到TPS_{2p1}和TPS_{2p2}两种组分,由于TPS_{2p2}较TPS_{2p1}含量较少,不便于后续的研究,收集主要组分TPS_{2p1}(6~32管)进行进一步的分析研究。由图4可知,TPS₃经过Sephadex G-75 凝胶柱层析柱分离后也得到两种组分TPS_{3p1}和TPS_{3p2}。而TPS_{3p2}的含量远高于TPS_{3p1}的含量,为便于研究收集TPS_{3p2}(35~61管)洗脱峰,对水透析脱盐后冷冻干燥。TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}的含量分别为82.50%、68.63%、71.54%。

2.3 TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}的紫外光谱扫描和HPLC色谱结果

由图5~7可知,TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}分别进行HPLC色谱分析,通过示差检测器检测,均呈现单一对称的尖峰,而这3个组分均是先经过阴离子树脂交换和分子排阻柱色谱分离后获得,故可认为TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}为3种单一的多糖组分。在紫外光谱图中,可以看出TPS_{1p}和TPS_{2p1}在波长200nm左右有多糖的特征吸收峰,而在波长260nm和280nm处无明显特征吸收峰,说明TPS_{1p}和TPS_{2p1}不含蛋白质、氨基酸和核酸,也不含酚类成分^[19],由图7可知,TPS_{3p2}除了有多糖的特征吸收峰以外,在波长280nm处还有微弱的吸收峰,其中可能含有少量的蛋白质,而HPLC色谱显示TPS_{3p2}是单一纯品,故其可能是一种含有少量的蛋白质的多糖蛋白复合物。

图5 TPS_{1p}的紫外光谱扫描图和HPLC色谱图Fig.5 UV spectrum and HPLC chromatogram of TPS_{1p}图6 TPS_{2p1}的紫外光谱扫描图和HPLC色谱图Fig.6 UV spectrum and HPLC chromatogram of TPS_{2p1}

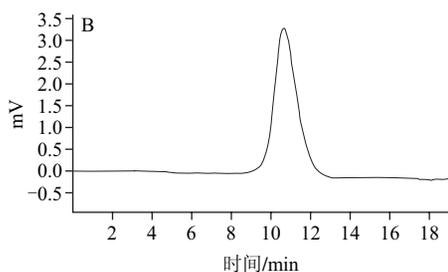


图7 TPS_{3p2}的紫外光谱扫描图和HPLC色谱图
Fig.7 UV spectrum and HPLC chromatogram of TPS_{3p2}

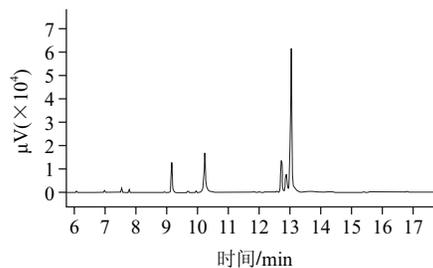


图11 TPS_{3p2}乙酰化衍生物GC图谱
Fig.11 GC chromatogram of of TPS_{3p2} alditol acetate

2.4 TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}单糖组成分析

图8~11是混合标准品和TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}的乙酰化衍生物的GC图谱,根据各单糖标准品的乙酰化衍生物的GC图谱,确定混合标准品在GC中的出峰顺序2~7分别为鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖,其中1号峰是溶剂峰,未在图中标示。

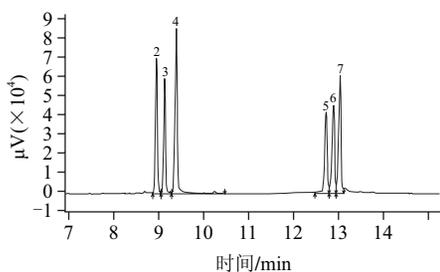


图8 标准单糖乙酰化衍生物GC图谱
Fig.8 GC chromatogram of monosaccharide standards

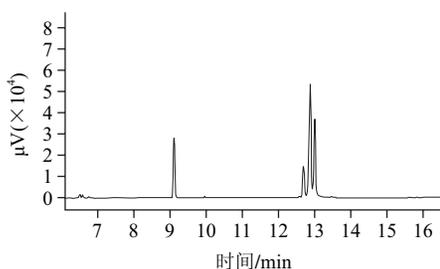


图9 TPS_{1p}乙酰化衍生物GC图谱
Fig.9 GC chromatogram of TPS_{1p} alditol acetate

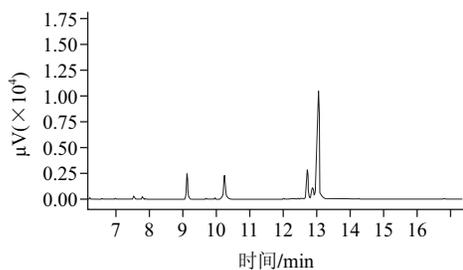


图10 TPS_{2p1}乙酰化衍生物GC图谱
Fig.10 GC chromatogram of TPS_{2p1} alditol acetate

混合标准单糖的保留时间和峰面积见表1,3种多糖组分的保留时间和峰面积及各组分单糖种类和物质的量比结果见表2,可知TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}的单糖中均含有阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖,TPS_{1p}中这4种单糖的物质的量比分别为2.76:2.12:7.61:3.30;TPS_{2p1}中4种单糖物质的量比为2.44:4.07:1.87:12.10;TPS_{3p2}中4种单糖的物质的量比为1.27:1.89:1.13:5.97。而TPS_{2p1}和TPS_{3p2}中均有保留时间为10.243min的色谱峰,这可能是一种未知单糖,尚待进一步研究。

表1 标准单糖乙酰化衍生物的GC数据表
Table 1 GC Data of alditol acetates of monosaccharide standards

标准单糖	鼠李糖	阿拉伯糖	木糖	甘露糖	葡萄糖	半乳糖
保留时间/min	8.953	9.137	9.400	12.732	12.898	13.045
峰面积	337511.8	295463.8	499128.3	246577.8	290170.0	419546.7

表2 TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}的单糖组分及单糖组成物质的量比
Table 2 Monosaccharide composition of TPS_{1p}, TPS_{2p1} and TPS_{3p2}

多糖组分	保留时间/min	峰面积	单糖组成	物质的量比*
TPS _{1p}	9.130	81514.8	阿拉伯糖	2.76
	12.758	52252.0	甘露糖	2.12
	12.932	220820.2	葡萄糖	7.61
	13.079	138630.0	半乳糖	3.30
TPS _{2p1}	9.129	72109.8	阿拉伯糖	2.44
	10.243	102235.2		
	12.756	100417.4	甘露糖	4.07
	12.929	54176.3	葡萄糖	1.87
TPS _{3p2}	13.082	507660.1	半乳糖	12.1
	9.133	37532.5	阿拉伯糖	1.27
	10.243	74000.5		
	12.758	46502.7	甘露糖	1.89
	12.928	32828.1	葡萄糖	1.13
	13.084	250619.4	半乳糖	5.97

注:*.多糖中各单糖的峰面积与标准单糖的峰面积的比值(实验时标准单糖质量和多糖样品质量相等)。

2.5 TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}小鼠体外脾细胞增殖MTT实验结果

淋巴细胞增殖实验是检测机体细胞免疫功能的一种体外实验,淋巴细胞在体外培养时,当受到非特异性刺激物有丝分裂刺激后,可转化为淋巴母细胞从而使淋巴细胞增殖。而ConA是小鼠T细胞特异性丝裂原,测定多糖协同ConA促进小鼠淋巴细胞增殖的强弱,能反映多糖对T淋巴细胞增殖功能的影响^[20]。3种多糖组分对ConA促进的小鼠脾细胞增殖能力的影响结果见表3。

表3 TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}对ConA诱导的小鼠脾细胞增殖能力的影响(n=6)

Table 3 Effects of TPS_{1p}, TPS_{2p1} and TPS_{3p2} on the ConA-induced proliferation of lymphocytes *in vitro* (n=6)

组别	TPS _{1p}	TPS _{2p1}	TPS _{3p2}	香菇多糖
空白对照组	0.446±0.071	0.446±0.071	0.446±0.071	0.446±0.071
剂量/ (μg/mL)				
25	0.612±0.062*	0.426±0.063	0.483±0.053	0.627±0.055*
50	0.796±0.081**	0.487±0.078	0.594±0.065*	0.849±0.094**
100	0.816±0.059**	0.563±0.041*	0.587±0.082*	0.808±0.061**

注：*、与空白对照组相比，有显著性差异(P<0.05)；**、与空白对照组相比，有极显著性差异(P<0.01)。下同。

由表3可知，与空白对照组相比，3种质量浓度的TPS_{1p}和香菇多糖均可协同ConA促进小鼠脾淋巴细胞的增殖，且高、中质量浓度的TPS_{1p}的协同能力更强(P<0.01)；只有高质量浓度的TPS_{2p1}对ConA表现出较高的协同能力(P<0.05)，而中、低质量浓度的TPS_{2p1}的协同能力并不明显，可能是因为质量浓度太低TPS_{2p1}对其作用不明显；高、中质量浓度的TPS_{3p2}多糖协同ConA能显著的提高小鼠脾细胞的增殖能力(P<0.05)。综上得出中性多糖TPS_{1p}可以很好的协同ConA促进小鼠的脾淋巴细胞的增殖，促进T细胞的成熟分化，且其协同能力略低于香菇多糖。

2.6 TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬中性红实验结果

巨噬细胞是机体非特异性免疫系统的重要组成部分，也是机体免疫监视功能的重要效应细胞，具有免疫监视、免疫防御和抗原呈递等免疫功能，对机体维持内部健康的环境起着至关重要的作用。而单核巨噬细胞的吞噬能力是衡量机体非特异性免疫功能的标志之一^[21]。3种多糖组分对小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力的影响结果见表4。

表4 TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力的影响(n=6)

剂量/(μg/mL)	TPS _{1p}	TPS _{2p1}	TPS _{3p2}	香菇多糖
25	1.109±0.134*	0.976±0.098	1.005±0.088	0.989±0.107
50	1.185±0.148**	1.165±0.089*	1.147±0.168*	1.141±0.153**
100	1.182±0.124**	1.041±0.103	1.119±0.143*	1.139±0.144**

由表4可知，3种质量浓度的TPS_{1p}均可显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力(P<0.05)，中质量浓度的TPS_{2p1}和高、中质量浓度的TPS_{3p2}、香菇多糖能显著提高小鼠巨噬细胞的吞噬能力(P<0.05)。3种多糖组分对巨噬细胞吞噬能力的影响没有明显的剂量-效应关系，且可以看出TPS_{1p}表现出最高的活性能力，其余两种多糖组分也表现出一定的活性能力。

3 结论

本实验以芋头为实验材料提取精制芋头多糖TPS，通过DEAE-52离子交换柱层和Sephadex G-75凝胶柱层析的分离纯化，得到TPS_{1p}、TPS_{2p1}、TPS_{3p2}和TPS_{3p2}组分，对其中的3种主要组分TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}进行

进一步研究，紫外扫描光谱和高效液相色谱分析结果表明这3种组分的均一度良好，TPS_{1p}和TPS_{2p1}是单一的多糖组分而TPS_{3p2}可能是一种多糖蛋白的复合物。单糖组成分析结果表明TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}中均由阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成，TPS_{1p}中这4种单糖的物质的量比分别为2.76:2.12:7.61:3.30；TPS_{2p1}中4种单糖物质的量比为2.44:4.07:1.87:12.10；TPS_{3p2}中4种单糖的物质的量比为1.27:1.89:1.13:5.97。小鼠体外免疫实验结果表明25、50、100μg/mL 3种质量浓度的TPS_{1p}，高质量浓度TPS_{2p1}和高、中质量浓度的TPS_{3p2}均可协同ConA显著促进小鼠脾淋巴细胞的增殖能力；3种质量浓度TPS_{1p}、中质量浓度的TPS_{2p1}和高、中质量浓度的TPS_{3p2}均可显著提高小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬能力。结果表明：TPS_{1p}、TPS_{2p1}和TPS_{3p2}对正常小鼠的细胞免疫功能均有一定的调节作用，而且TPS_{1p}较另外两种多糖表现出较高的活性能力，在细胞免疫调节方面略低于香菇多糖，具有进一步进行小鼠体内免疫实验的研究价值。

参考文献：

- 中科院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第五册)[M]. 北京: 科学出版社, 1980: 1232.
- 孙忠伟, 张燕萍. 芋头淀粉的分离纯化[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(3): 117-121.
- 李雅成, 李德玉, 吴寿金. 芋头化学成分的研究(II)[J]. 中草药, 1996, 27(2): 78-78.
- 何余堂, 潘孝明. 植物多糖的结构与活性研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(17): 493-496.
- ZHA Xueqiang, WANG Junhui, YANG Xuefei, et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran[J]. Carbohydrate Polymers, 2009, 78(3): 570-575.
- LEE K Y, LEE M H, CHANG I Y. Macrophage activation by polysaccharide fraction isolated from *Salicornia herbacea*[J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103(3): 372-378.
- 赵国华, 陈宗道. 芋头多糖的理化性质及体内免疫调节活性研究[J]. 中国食品学报, 2002, 2(3): 21-25.
- 王喻, 高畅, 张娜, 等. 芋头多糖的提取及生物活性的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 73-75.
- 刘敏, 郭丽梅, 张丽. 苯酚-硫酸法测定油松花粉多糖含量研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(6): 1526-1528.
- YANG Cuixian, HE Ning, LING Xueping, et al. The isolation and characterization of polysaccharides from longan pulp[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 63: 226-230.
- 赵晶. 松茸多糖的分离纯化及活性研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2010: 25.
- 王强, 李盛钰, 杨帆, 等. 玉竹中性多糖的分离纯化及单糖组成分析[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 100-102.
- 赵海宁. 大黄多糖的分离纯化及结构研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- 张安强, 倪扬亿, 张劲松, 等. 猴头菌多糖的 3-O-甲基-甲基戊糖的鉴定[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(10): 1477-1479.
- 孙延芳, 梁宗锁, 张欣, 等. 芒果多糖的纯化与光谱分析[J]. 食品科学, 2010, 33(7): 93-95.
- 芮雯, 岑颖洲, 李药兰, 等. 带形蜈蚣藻多糖的提取、分析及其抗病毒活性[J]. 中国海洋药物杂志, 2006, 5(2): 12-16.
- WANG Junhui, LUO Jianping, YANG Xuefei, et al. Structural analysis of a rhamnoarabinogalactan from the stems of *Dendrobium nobile* Lindl[J]. Food Chemistry, 2010, 63(1): 572-576.
- 徐叔云, 卞如濂. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1426.
- 刘芳, 桂友, 周晶, 等. 冬凌草多糖RPPS II a的分离纯化及其性质研究[J]. 中草药, 2011, 42(2): 241-243.
- MATSUMOTO T, KIYOHARA H, YAMADA H, et al. The pectic polysaccharide from *Bupleurum falcatum* L. enhances clearance of immune complexes in mice[J]. Phytother Res, 1996, 10(7): 585-588.
- 徐明生, 林日新, 汤群, 等. 卵转铁蛋白体外免疫活性研究[J]. 食品与机械, 2012, 28(2): 115-118.