

贺卫华,翟晓虎,宋幸辉,等. 不同产地山药不同分子量段多糖含量及活性的比较[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):312-314.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.093

不同产地山药不同分子量段多糖含量及活性的比较

贺卫华¹,翟晓虎¹,宋幸辉²,王文静²,马霞²,刘永录²

(1. 江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300; 2. 河南牧业经济学院,河南郑州 450046)

摘要:为了比较怀山药与其他3种产地山药的不同分子量段多糖含量以及各山药多糖的活性,采取一步醇沉和分步醇沉法提取不同产地山药的4种山药多糖 YPS_总、YPS₄₀、YPS₆₀、YPS₈₀;用MTT法测定各山药多糖对PK-15细胞的安全浓度;然后分别从125 μg/mL倍比稀释5个浓度,将4种山药多糖以先加山药多糖再加病毒的方式加至PK-15细胞培养体系中,用MTT法检测PK-15细胞活性,实时荧光PCR法检测PPV-SD1含量。结果表明:怀山药多糖各分子量段的多糖含量均高于其他产地山药,均以YPS₈₀分子量段的多糖含量最高,且以怀山药的YPS₈₀的增强细胞活性和抗PPV-SD1感染效果最好。可见怀山药的药效作用优于其他产地山药是有一定物质基础的。

关键词:怀山药;不同产地;分子量段;山药多糖;活性

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0312-03

山药是药食兼用植物,为薯蓣科植物薯蓣(*Dioscorea opposita* Thunb.)的干燥块茎,具有补脾养胃、生津益肺、补肾涩精的作用^[1],据《本草纲目》记载,山药“益肾气,健脾胃,止泻痢,化痰涎,润皮毛”。山药种类繁多,种植广泛,集中产于河南、陕西、山东等地,在诸多品种中以河南省焦作区域所产怀山药最负盛名,其品种优良,无论从药用还是营养价值上均优

于其他产地的山药,《神农本草经》中载有:“山药以河南怀庆者良。”

现代医学研究表明,山药具有多种生物活性,山药多糖(yam polysaccharide, YPS)被认为是山药中主要的活性物质之一^[2]。山药多糖能促进小鼠、鸡的免疫细胞增殖,提高特异性和非特异性免疫^[3-4]。山药多糖与猪蓝耳病毒(PRRSV)灭活疫苗同时使用,能显著提高PRRSV抗体的产生^[5]。山药多糖体外对病毒感染细胞的作用,尚未见报道。多糖的分级沉淀是指使用不同浓度的甲醇或乙醇醇沉分离不同分子量段多糖的一种沉淀方法,为比较怀山药与其他山药中多糖含量与活性的不同,本研究对4种不同产地的山药,采用一步醇沉和分步醇沉法分别提取到4种不同分子量段的山药多糖,比较多糖得率,检测各分子量段的多糖含量(纯度),并以猪细小病毒(PPV)感染猪肾原传代细胞PK-15为模型,体外试验观察山药多糖抗PPV的活性,为怀山药的药效

收稿日期:2016-03-18

基金项目:江苏省高校品牌专业建设工程资助项目(编号:PPZY2015C230);河南牧业经济学院博士科研启动基金(编号:5040229);河南省中草药组培快繁及资源开发利用创新团队(编号:C20150033)。

作者简介:贺卫华(1982—),女,山西太谷人,硕士,讲师,主要从事临床兽医学研究。E-mail:heweihua010@163.com。

通信作者:马霞,博士,讲师,主要从事中兽药药理学研究。E-mail:maxia801010@126.com。

[9] Söderberg T A, Johansson A, Gref R. Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells [J]. Toxicology, 1996, 107(2): 99-109.

[10] Sunzel B, Söderberg T A, Reuterving C O, et al. Neutralizing effect of zinc oxide on dehydroabietic acid-induced toxicity on human polymorphonuclear leukocytes [J]. Biological Trace Element Research, 1991, 31(1): 257-266.

[11] Toivola D M, Isomaa B. Effects of dehydroabietic acid on erythrocyte membrane [J]. Chemico-Biological Interactions, 1991, 79(1): 65-78.

[12] 张苏珍, 卞欢, 王道营, 等. 食品中松香残留检测方法的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(8): 307-308.

[13] 宋湛谦. 马尾松松香中混杂湿地松松香的检测方法[J]. 林产化学与工业, 2005, 25(增刊1): 137-138.

[14] Peng G, Roberts J C. Solubility and toxicity of resin acids [J]. Water Research, 2000, 34(10): 2779-2785.

[15] Lee B L, Koh D, Ong H Y, et al. High-performance liquid chromatographic determination of dehydroabietic and abietic acids in tradi-

tional Chinese medications [J]. Journal of Chromatography A, 1997, 763(1/2): 221-226.

[16] Nilsson U, Berglund N, Lindahl F, et al. SPE and HPLC/UV of resin acids in colophonium-containing products [J]. Journal of Separation Science, 2008, 31(15): 2784-2790.

[17] Kai L, Chester M, Kutney J P, et al. Production of polyclonal antibodies for the detection of dehydroabietic acid in pulp mill effluents [J]. Analytical Letters, 1994, 27(9): 1671-1688.

[18] 肖聪, 饶伟文, 钟名诚. 没药掺伪品中松香酸的检测方法研究[J]. 中药材, 2012, 35(8): 1237-1241.

[19] 张苏珍, 耿志明, 王道营, 等. 固相萃取-高效液相色谱法检测肉鸭表皮组织中的松香酸[J]. 食品科学, 2014, 35(4): 82-85.

[20] 张苏珍, 耿志明, 王道营, 等. 肉鸭表皮组织中脱氢松香酸残留的SPE-HPLC检测方法[J]. 食品科学, 2014, 35(16): 101-104.

[21] 王伟强. 用工业松香给猪蹄脱毛商贩夫妻被判刑[EB/OL]. [2016-08-16]. <http://society.huanqiu.com/shrd/2015-01/5379438.html>.

作用优于其他山药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用河南省温县的怀山药与产地为陕西省、山东省、广东省的具有代表性的 4 个山药样品,均购自禹州市凯旋药业有限公司,经鉴定均为薯蓣科植物薯蓣的干燥块茎。

PPV-SD1 毒株,山东省滨州畜牧兽医研究院惠赠。

猪肾原传代细胞(porcine kidney 15, PK-15),购自中国兽医药品监察所。

1.2 试剂

无水葡萄糖标准品,购自中国食品药品检定研究院;无水乙醇,购自天津市富宇精细化工有限公司;胰蛋白酶、DMEM 培养基,均购自美国 Gibco 公司;新生牛血清,购自杭州四季青生物工程材料有限公司;苯酚、硫酸,购自洛阳市化学试剂厂。

1.3 仪器

BG-50A 电子称,购自上海旭日衡器有限公司;GZX-9030 MBE 电热恒温鼓风干燥箱,购自上海博讯实业有限公司医疗设备厂;电子分析天平,购自岛津国际贸易(上海)有限公司;冷冻干燥机 LABCONCO,购自上海医械专机厂;722 型可见分光光度计,购自上海分析仪器总厂。 CO_2 培养箱、培养瓶、96 孔细胞培养板,均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;倒置显微镜,购自重庆光学仪器厂。

1.4 山药多糖的制备

采用水提醇沉法制备山药多糖:取不同产地山药各 500 g,以药水比例 1 g:10 mL,浸泡 30 min,煎煮 1 次,过滤;再以药水比例 1 g:8 mL 煎煮,合并煎煮液,加热浓缩至含生药量 1 g/mL,一部分药液用无水乙醇一步醇沉(乙醇终浓度为 75%)过夜得 $\text{YPS}_{\text{总}}$,另一部分药液使乙醇终浓度依次为 40%、60%、80%,进行分级醇沉得不同分子量段多糖,将各浓缩多糖膏置真空干燥器内蒸干,得不同分子量段山药多糖,即 $\text{YPS}_{\text{总}}$ 、 YPS_{40} 、 YPS_{60} 、 YPS_{80} ,称量各多糖质量,计算多糖得率。并采用苯酚-硫酸法测定多糖含量。

多糖得率 = 多糖质量/山药质量 $\times 100\%$ 。

1.5 山药多糖对 PK-15 细胞安全浓度的测定

将不同产地总山药多糖采用 Sevag 法^[6]去蛋白,双氧水去色素,柱层析后浓缩,将浓缩多糖膏置真空干燥器内蒸干,得纯化山药总多糖,分别用细胞维持液从 4 000 $\mu\text{g/mL}$ 开始 2 倍比稀释 10 个浓度后,加到长成单层 PK-15 细胞的 96 孔细胞培养板上,100 μL /孔,每个稀释度重复 6 孔,另设 PK-15 细胞对照,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后,MTT 法^[7]检测安全浓度,以加山药多糖孔 D 值不显著低于 PK-15 细胞对照孔 D 值的最高浓度作为最大安全浓度。

1.6 山药多糖抗 PPV-SD1 感染 PK-15 细胞能力的测定

参照 Wang 试验结果^[8],将不同产地山药的总山药多糖分别从 125 $\mu\text{g/mL}$ 倍比稀释 5 个浓度。待 PK-15 细胞长成单层时,以先加山药多糖后加 PPV-SD1 病毒的顺序加到 PK-15 细胞中。每个浓度重复 6 次,同时设病毒对照组和细胞对照组。培养 72 h 后,待病毒对照出现明显细胞病变时,MTT 法测定 PK-15 细胞活性。采用实时荧光定量 PCR 方法检测 PPV-SD1 含量^[9]。

1.7 数据分析

数据以“平均值 \pm 标准差”表示,用 SPSS 16.0 软件统计分析组间的差异性。

2 结果

2.1 不同产地不同分子量段山药多糖的得率

由表 1 可知,河南省温县所产的怀山药中山药总多糖及各分子量段的多糖得率均高于其他 3 个产地,分级醇沉时,随着乙醇浓度的提高,山药多糖的得率有所增加,各产地山药多糖得率由高到低的顺序依次为河南省、山东省、陕西省、广东省。

表 1 不同产地山药各分子量段多糖得率

山药产地	$\text{YPS}_{\text{总}}$	YPS_{40}	YPS_{60}	YPS_{80}
河南省	13.8	3.7	4.9	6.6
陕西省	11.2	3.3	4.5	5.1
山东省	12.3	3.5	5.1	5.5
广东省	10.6	3.1	4.2	4.7

2.2 不同产地不同分子量段山药多糖的含量

由表 2 可知,河南省温县所产的怀山药中山药总多糖及各分子量段的多糖含量均高于其他 3 个产地,分级醇沉时随酒精浓度增高,所得多糖含量逐渐增大,且分级醇沉乙醇浓度达 80% 时,多糖含量高于总多糖的含量。各产地山药多糖含量由高到低的顺序依次为河南省、山东省、陕西省、广东省。

表 2 不同产地山药不同分子量段多糖的含量

山药产地	$\text{YPS}_{\text{总}}$	YPS_{40}	YPS_{60}	YPS_{80}
河南省	67.3	37.6	76.3	86.3
陕西省	62.7	33.7	72.5	78.5
山东省	63.5	36.5	73.3	81.9
广东省	59.6	33.1	74.7	76.8

2.3 不同产地山药多糖对 PK-15 的安全浓度

如表 3 所示,各产地的山药总多糖浓度为 7.8 ~ 5 000 $\mu\text{g/mL}$ 时, A_{570} 值不显著小于细胞对照组,因此可将山药多糖的最大安全浓度定为 500 $\mu\text{g/mL}$;山药总多糖浓度为 7.8 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ 时,4 种多糖的 A_{570} 值都显著大于细胞对照组($P < 0.05$),因此将后续试验山药多糖浓度均定为 7.8 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 山药多糖抗 PPV-SD1 感染 PK-15 细胞的能力

如表 4 所示,山药多糖浓度在 7.8 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,各山药多糖处理组 A_{570} 值显著高于病毒对照组($P < 0.05$),且 YPS_{80} 在浓度为 62.5、125 $\mu\text{g/mL}$ 时与细胞对照差异不显著。

2.5 PK-15 细胞培养体系中 PPV-SD1 含量的变化

如表 5 所示,山药多糖浓度在 7.8 ~ 125 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,山药多糖处理组 PK-15 细胞培养体系中 PPV-SD1 含量均显著低于病毒对照组($P < 0.05$)。

3 结论

山药具有较高的营养价值、药用价值及食用价值,含有多糖、淀粉、尿囊素等有效成分,具有降血糖、抗衰老、调节免疫、降血脂等功效,山药多糖以其独特的功效成为近年来研究的重点。因此,开展山药多糖的提取分离工艺研究,为开发山药

表 3 山药多糖对 PK-15 细胞安全浓度的测定结果

多糖浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	$D_{570\text{ nm}}$ 值			
	河南省	陕西省	山东省	广东省
4 000	0.39 \pm 0.03d	0.43 \pm 0.02c	0.41 \pm 0.01c	0.39 \pm 0.03c
2 000	0.43 \pm 0.04d	0.45 \pm 0.03c	0.43 \pm 0.03c	0.41 \pm 0.02c
1 000	0.49 \pm 0.03d	0.50 \pm 0.02b	0.47 \pm 0.03b	0.49 \pm 0.03b
500	0.55 \pm 0.03bc	0.52 \pm 0.02ab	0.53 \pm 0.01a	0.51 \pm 0.02b
250	0.59 \pm 0.03ab	0.55 \pm 0.04a	0.56 \pm 0.03a	0.54 \pm 0.03b
125	0.61 \pm 0.03a	0.58 \pm 0.02a	0.58 \pm 0.03a	0.58 \pm 0.03a
62.5	0.62 \pm 0.03a	0.59 \pm 0.04a	0.58 \pm 0.02a	0.59 \pm 0.03a
31.3	0.63 \pm 0.02a	0.61 \pm 0.02a	0.59 \pm 0.02a	0.60 \pm 0.03a
15.6	0.60 \pm 0.03a	0.59 \pm 0.03a	0.60 \pm 0.03a	0.59 \pm 0.02a
7.8	0.57 \pm 0.03ab	0.57 \pm 0.04a	0.58 \pm 0.03a	0.57 \pm 0.03a
细胞对照	0.51 \pm 0.02c	0.50 \pm 0.01b	0.48 \pm 0.02b	0.49 \pm 0.03b

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下表同。

表 4 山药多糖各组细胞的 D_{570} 值

多糖浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	$D_{570\text{ nm}}$ 值			
	YPS _总	YPS ₈₀	YPS ₆₀	YPS ₄₀
125	0.46 \pm 0.01b	0.51 \pm 0.01a	0.47 \pm 0.01b	0.43 \pm 0.01b
62.5	0.46 \pm 0.01b	0.50 \pm 0.01a	0.47 \pm 0.01b	0.44 \pm 0.01b
31.3	0.47 \pm 0.01b	0.48 \pm 0.01b	0.45 \pm 0.02b	0.42 \pm 0.01b
15.6	0.37 \pm 0.02c	0.39 \pm 0.02c	0.43 \pm 0.02c	0.38 \pm 0.02c
7.8	0.36 \pm 0.04c	0.37 \pm 0.02c	0.39 \pm 0.01d	0.36 \pm 0.02c
病毒对照	0.29 \pm 0.01d	0.29 \pm 0.01d	0.29 \pm 0.01e	0.29 \pm 0.01d
细胞对照	0.52 \pm 0.01a	0.52 \pm 0.01a	0.53 \pm 0.01a	0.53 \pm 0.01a

表 5 4 种山药多糖各组 PPV-SDI 含量

多糖浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	PPV-SDI 含量($\times 10^6$ copies/ μL)			
	YPS _总	YPS ₈₀	YPS ₆₀	YPS ₄₀
125	32.8 \pm 1.4c	20.7 \pm 1.4d	35.9 \pm 1.7c	38.4 \pm 1.4c
62.5	33.7 \pm 1.7c	24.5 \pm 1.6d	37.5 \pm 1.4c	37.6 \pm 1.7c
31.3	36.5 \pm 1.5c	40.3 \pm 1.5c	42.6 \pm 1.2b	37.8 \pm 1.5c
15.6	46.3 \pm 1.3b	48.5 \pm 1.7b	44.6 \pm 1.5b	46.3 \pm 1.3b
7.8	45.4 \pm 1.5b	48.7 \pm 1.6b	47.5 \pm 1.4b	48.4 \pm 1.5b
病毒对照	60.1 \pm 1.9a	60.1 \pm 1.9a	60.1 \pm 1.9a	60.1 \pm 1.9a
细胞对照	—	—	—	—

多糖的医疗保健功能提供理论依据,对山药资源由粗加工向精制、深加工方向发展具有重要意义。

对于中药多糖的提取,其基本的工艺都差不多,传统的水浸提醇沉法是提取多糖的经典方法,对山药多糖的提取纯化工艺研究也较多^[10-12],但对其分级醇沉的研究及对不同产地的山药进行多糖提取率及含量的研究也未见报道。基于以上 2 点,本试验采用一步醇沉及分步醇沉得不同分子量段的山药多糖,比较不同产地山药不同分子量段的多糖得率及多糖含量(纯度)。结果显示,无论是多糖得率还是各分子量段多糖纯度,怀山药均优于其他产地山药,这也可能是怀山药药用和营养价值均优于其他产地山药的原因之一,可见怀山药的药效作用优于其他产地山药是有一定物质基础的。

分级醇沉时,80%乙醇沉淀的分子段多糖含量高于总多糖及其他浓度醇级含量,这有可能显示 YPS₈₀含有的多糖活性成分较高,对其不同分子量段多糖的活性比较研究,将会在后期试验中进一步研究。

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,2010:27.

[2] 赵 宏,谢晓玲,万金志. 等. 山药的化学成分及药理研究进展 [J]. 今日药学,2009,19(3):49-52.

[3] 赵国华,王 赟,李志孝,等. 山药多糖的免疫调节作用[J]. 营养学报,2002,24(2):187-188.

[4] 张红英,崔保安,邱 妍,等. 怀山药多糖对鸡免疫功能的影响 [J]. 中兽医医药杂志,2007,26(1):11-13.

[5] 张红英,王学兵,崔保安,等. 山药多糖对 PRRSV 灭活苗免疫猪抗体和 T 细胞亚群的影响[J]. 华北农学报,2010,25(2):236-238.

[6] 齐慧玲,魏绍云,王继伦,等. Sevag 法去除白及多糖中蛋白的研究[J]. 天津化工,2000(3):20-21.

[7] 殷 震,刘景华. 动物病毒学 [M]. 北京:科学出版社,1997:1145-1155.

[8] Wang D Y,Guo Z H,Ma X,et al. Effects of sulfated lentinan on cellular infectivity of avian infectious bronchitis virus[J]. Carbohydrate Polymers,2010,79(2):461-465.

[9] Ma X,Guo Z H,Shen Z Q,et al. The immune enhancement of propolis adjuvant on inactivated porcine parvovirus vaccine in guinea pig [J]. Cellular Immunology,2011,270(1):13-18.

[10] 王安良,杨 红. 响应曲面法优化山药中多糖的微波提取工艺 [J]. 食品科技,2007,32(12):86-90.

[11] 李金忠,马海乐,吴沿友. 山药多糖的超声辅助提取技术研究 [J]. 食品研究与开发,2005,26(4):72-5.

[12] 毛 磊,李 睿,金慧芳. 酶解辅助法优选山药多糖的提取工艺 [J]. 应用化工,2009,38(6):847-849.