

响应面法优化北豆根粗多糖的除蛋白工艺及其神经保护活性研究

杨培¹,张瑞¹,翟阳¹,丁洁¹,董文亮¹,刘玉红^{1,2*}

¹山东中医药大学药学院;²山东省中药材良种选育工程技术研究中心,济南 250355

摘要:为研究北豆根粗多糖的最佳除蛋白方法和工艺,探究北豆根粗多糖的神经保护活性。实验比较了酶法、Sevage法、酶-Sevage法、三氯乙酸(TCA)-正丁醇法、酶-TCA-正丁醇法除蛋白效果,筛选出了北豆根粗多糖的最佳除蛋白方法,并用响应面法对该方法进行优化。经响应面分析,以综合评分为指标,考查TCA与正丁醇体积比、北豆根粗多糖溶液与TCA-正丁醇溶液体积比和振摇时间对北豆根粗多糖TCA-正丁醇法除蛋白工艺的影响。用H₂O₂诱导PC12细胞损伤,探究了北豆根粗多糖的神经保护作用。结果表明,北豆根粗多糖的最佳除蛋白方法为TCA-正丁醇法。经响应面优化,确定最优除蛋白工艺为TCA:正丁醇=1:10.4,北豆根粗多糖溶液:TCA-正丁醇溶液=1:1.77,振摇时间为36.5 min。采用该工艺对北豆根粗多糖进行除蛋白,其蛋白清除率为73.1%,综合评分为92.1。神经保护研究表明,北豆根粗多糖对H₂O₂诱导的PC12细胞损伤具有明显的保护作用。本研究表明TCA-正丁醇法可以有效的除去北豆根粗多糖中的蛋白质且北豆根粗多糖具有神经保护活性。

关键词:北豆根粗多糖;除蛋白;TCA-正丁醇法;响应面;神经保护活性

中图分类号:R284.2

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)4-0579-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.4.004

Optimization of deproteinization process by response surface method and the neuroprotective activity study of *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharide

YANG Pei¹, ZHANG Rui¹, ZHAI Yang¹, DING Jie¹, DONG Wen-liang¹, LIU Yu-hong^{1,2*}

¹College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine;

²Shandong Provincial Research Center for the Selection and Breeding of Chinese Medicinal Materials, Jinan 250355, China

Abstract: To optimize the deproteinization process and to determine the neuroprotective activity of *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharide, five methods were compared to screen out the best protein removing method for the *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharide, including enzymatic method, Sevage method, enzyme-Sevage method, TCA-n-butanol method and enzyme-TCA-n-butanol method. The effects of the volume ratio of TCA to n-butanol, the ratio of the polysaccharide solution to the TCA-n-butanol solution and the shake time on the deproteinization of *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharide in TCA-n-butanol method were investigated by single-factor experiment combined with central combination design method of Box-Behnken. PC12 cell injury was induced by H₂O₂ to study the neuroprotective activity of *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharides. The results showed that the best method for deproteinization process of *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharide was TCA-n-butanol method. The optimal conditions were as follows: the ratio of TCA to n-butanol was 1:10.4, the ratio of solution of *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharide to TCA-n-butanol solution was 1:1.77, and the shaking time was 36.5 min. Under this condition the remove rate of protein was 73.1%, the comprehensive score was 92.1. Neuroprotective studies have showed that *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharide has obvious protective effect on H₂O₂-induced PC12 cell injury. This study showed that the TCA-n-butanol method can effectively remove the protein in the *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharides, and the *Rhizoma Menispermis* crude polysaccharides had neuroprotective activity.

收稿日期:2018-12-05 接受日期:2019-03-19

基金项目:山东省高等学校科技计划(J16LM08);山东中医药大学优秀青年科学基金(2018zk15)

*通信作者 E-mail: yhlhu@sdutcm.edu.cn

Key words: *Rhizoma Menispermii* crude polysaccharide; deproteinization process; TCA-n-butanol method; response surface method; neuroprotective activity

北豆根为防己科植物蝙蝠葛 (*Menispermum dauricum* DC) 的干燥根茎, 有清热解暑、祛风止痛之功效, 常用于咽喉肿痛, 热毒泻痢, 风湿痹痛等证。北豆根中主要含生物碱、多糖、蛋白质等成分, 目前对北豆根中的生物碱成分研究较多^[1-3], 而对于北豆根多糖的研究鲜有报道。鉴于近些年中药多糖广泛生物活性的发现^[4-7], 本文提取制备了北豆根粗多糖, 研究了其对 H₂O₂ 损伤 PC12 神经细胞的作用, 首次发现北豆根粗多糖具有较强的神经保护活性, 可用于神经损伤或神经退行性疾病的治疗。

由于北豆根多糖的提取过程中有大量蛋白质的浸出, 经测量, 蛋白质的含量高达 40%, 为了获得纯化的多糖组分, 本文选用酶法、Sevage 法、酶-Sevage 法、三氯乙酸 (TCA)-正丁醇法、酶-TCA-正丁醇法去蛋白, 以多糖保留率和蛋白清除率两个指标筛选出最佳除蛋白方法, 并用响应面法进行优化, 确定了北豆根多糖稳定高效的除蛋白方法和工艺, 为北豆根多糖的进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

北豆根 (产地山东, 批号 170501), 经山东中医药大学李佳教授鉴定为防己科植物蝙蝠葛 (*Menispermum dauricum* DC) 的干燥根茎。胰蛋白酶 (国药集团化学试剂有限公司)、大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤 (PC12) 细胞 (山东大学)、胎牛血清 (美国 Hyclone 公司)、DMEM (美国 Gibco 公司)、三氯乙酸、正丁醇、福林酚等均为分析纯。

LGJ-18 冻干机 (北京四环科学仪器有限公司)、紫外分光光度计 (安捷伦科技有限公司)、电子分析天平 (上海民桥精密科学仪器有限公司)、酶标仪 (美国 Bio Tek Instruments)。

1.2 实验方法

1.2.1 北豆根多糖的提取

称取北豆根药材 500 g, 加入 20 倍量水, 90 °C 下提取 120 min, 共三次, 提取液过滤, 弃去沉淀。减压浓缩, 加入 4 倍量无水乙醇, 4 °C 静置过夜, 抽滤, 沉淀依次用无水乙醇、丙酮洗涤, 真空干燥得北豆根粗多糖。

1.2.2 北豆根多糖除蛋白方法比较

1.2.2.1 评价指标

采用苯酚-硫酸法^[8]测定多糖含量:

$$\text{多糖保留率} = A_1/A_0$$

A₁ 为除蛋白后北豆根粗多糖中所含的多糖的质量, A₀ 为除蛋白前粗多糖中所含的多糖的质量。

采用福林酚法^[9]测定蛋白质含量:

$$\text{蛋白清除率} = (C_0 - C_1) / C_0$$

C₁ 为除蛋白后北豆根粗多糖中的蛋白质质量, C₀ 为除蛋白前粗多糖中的蛋白质质量^[10]。

$$\text{综合评分} = 0.5 \times (X/X_{\max} + Y/Y_{\max}) \times 100$$

X 为多糖保留率, X_{max} 为多糖保留率最大值, Y 为蛋白清除率, Y_{max} 为蛋白清除率最大值^[11]。

1.2.2.2 胰蛋白酶法

取北豆根粗多糖 500 mg, 溶解并定容至 50 mL, 加入 0.4% 胰蛋白酶。调 pH7.8 ~ 8.5, 37 °C 水浴搅拌 6 h, 期间不断测 pH, 补加 NaOH 和水。搅拌完成后, 调节 pH 至 7.0, 升温至 90 °C 并保持 15 min, 以灭活酶。将药液冷却至室温, 离心, 收集上清液, 冷冻干燥得去蛋白多糖, 称重, 并测量多糖和蛋白质含量, 计算多糖保留率和蛋白清除率。

1.2.2.3 Sevage 法

取北豆根粗多糖 5 份, 每份 500 mg, 溶解并定容至 50 mL, 编号 1、2、3、4、5, 加入 1/5 的 Sevage 试剂 (氯仿: 正丁醇 = 4: 1), 振摇 20 min, 静置 5 min, 离心并收集上清液, 5 份样品分别重复上述操作 1、2、3、4、5 次, 真空浓缩挥去溶剂, 冻干并称重, 分别测量多糖和蛋白质含量, 计算多糖保留率和蛋白清除率。

1.2.2.4 酶-Sevage 法

取北豆根粗多糖 5 份, 每份 500 mg, 溶解并定容至 50 mL, 编号 1、2、3、4、5, 先依据 1.2.2.2 中的酶法进行除蛋白, 再用 1.2.2.3 项下的 Sevage 法除蛋白, 分别重复 1、2、3、4、5 次, 真空浓缩挥去溶剂, 冻干并称重, 分别测多糖和蛋白质含量, 计算多糖保留率和蛋白清除率。

1.2.2.5 TCA-正丁醇法

取北豆根粗多糖 2 份, 每份 500 mg, 溶解并定容至 50 mL, 编号 1、2, 分别加入 2 倍量 TCA-正丁醇溶液 (20% TCA: 正丁醇 = 1: 10), 振摇 20 min, 4 °C 放置 1 h, 静置取下层, 2 号重复 2 次, 真空挥去溶剂, 冻干并称重, 测得多糖和蛋白质含量, 计算多糖

保留率和蛋白清除率。

1.2.2.6 酶-TCA-正丁醇法

取北豆根粗多糖 2 份,每份 500 mg,溶解并定容至 50 mL,编号 1、2,先用 1.2.2.2 项下的胰蛋白酶法除蛋白,再依据 1.2.2.5 项下的 TCA-正丁醇法进行除蛋白,分别重复 1、2 次,称重并测量多糖和蛋白质含量,计算多糖保留率和蛋白清除率。

1.2.3 响应面法优化 TCA-正丁醇法除蛋白

选取三个对 TCA-正丁醇法除蛋白效果影响较

大的因素 TCA 与正丁醇体积比(A),北豆根多糖溶液与 TCA-正丁醇溶液体积比(B),振摇时间(C)为考查因素,根据 Box-Behnken 中心实验设计原理,在单因素实验的基础上,选取最优值为中心点,上下各选一个水平值作为响应面实验设计水平,以多糖保留率和蛋白脱除率计算所得的综合评分为指标,设计三因素三水平的响应面分析(见表 1)。采用 Design-Expert 8.0.6 软件对实验结果进行响应面回归分析。

表 1 响应面法分析因素及水平表

Table 1 Factors and levels of response surface experiment

水平 Level	因素 Factor		
	(A)TCA 与正丁醇的体积比 Ratio of TCA to n-butanol	(B)多糖溶液与 TCA-正丁醇溶液体积比 Ratio of the polysaccharide solution to the TCA-n-butanol solution	(C)振摇时间 Shake time (min)
-1	1:5	1:1	20
0	1:10	1:2	30
1	1:15	1:3	40

1.2.4 北豆根粗多糖对 H₂O₂ 诱导的大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤(PC12)细胞损伤的保护作用

收集对数期的 PC12 细胞,调整浓度为 10×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,置于恒温培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中培养。待细胞融合后,加入不同浓度的经上述优化工艺除蛋白后的北豆根多糖溶液 100 μ L,另设对照组和模型组^[12-15],均加入 100 μ L 含 2% 血清的 DMEM 培养基。作用 24 h 后,除对照组外,其余各孔加入用培养基稀释的 0.75 μ mol/L 的 H₂O₂,继续培养 4 h,吸弃上清,加入 100 μ L 新鲜培养基,然后每孔加入 MTT 20 μ L,继续培养 4 h。仔细吸去上清,每孔加入 DMSO 100 μ L,振荡混匀后,用酶联免疫检测仪测吸光度值(测定波长为 570 nm),按照下面公式计算细胞存活率:存活率(%)=(实验组 A₅₇₀/对照组 A₅₇₀) \times 100%^[16]。

2 结果与分析

2.1 不同除蛋白方法考查结果

2.1.1 酶法

酶法除蛋白是利用蛋白酶降解多糖中的蛋白质使其分解成小肽,处于较好的水溶性状态,通过醇沉从而与多糖分离开来。酶法除蛋白后计算多糖保留率为 59.82%,蛋白清除率为 62.21%,由结果可以得出,酶法除蛋白虽然蛋白清除率较高,但是多糖损

失较多。

2.1.2 Sevage 法

Sevage 法是多糖除蛋白较为常用的方法,该实验考查了用 Sevage 法除北豆根多糖中蛋白 1-5 次的效果,结果见图 1。随着除蛋白次数的增多,蛋白脱除率逐渐增加,但多糖保留率也逐渐下降,第 4 次以后多糖保留率下降幅度明显增加。因此,Sevage 法除蛋白 4 次效果最佳,此时多糖保留率 66.6%,蛋白清除率 38.33% ,

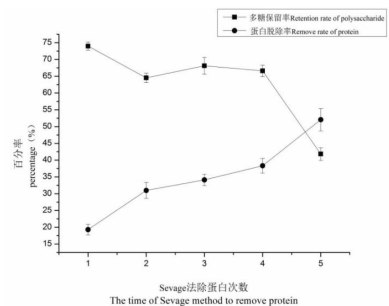


图 1 Sevage 法除蛋白结果

Fig. 1 The results of Sevage method to remove protein

2.1.3 酶-Sevage 法

酶法结合 Sevage 法除蛋白效果较 Sevage 法更好,蛋白脱除率更高,结果见图 2。随着除蛋白次数的增多,蛋白脱除率逐渐增加,但多糖保留率也逐渐

下降,当除蛋白次数为 3 次时,多糖保留率为 57.31%,蛋白脱除率为 60.27%,为酶-Sevage 法最佳除蛋白次数。

2.1.4 TCA-正丁醇法

TCA-正丁醇法也是多糖除蛋白较常用的一种方法,该方法效率较 Sevage 法高,一般只需操作一次即可,该实验比较了 TCA-正丁醇法除蛋白 1 次和 2 次的效果,结果如图 3。由图可知,该实验操作重复两次后,虽然蛋白脱除率增大了,但是多糖保留率也出现了大幅度的下降。因此 TCA-正丁醇法除蛋白重复 1 次即可,此时的多糖保留率为 82.4%,蛋白清除率为 53.88%。

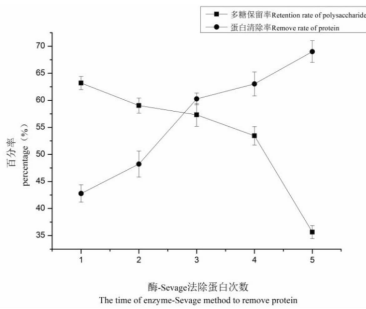


图 2 酶-Sevage 法除蛋白结果

Fig. 2 The results of enzyme-Sevage method to remove protein

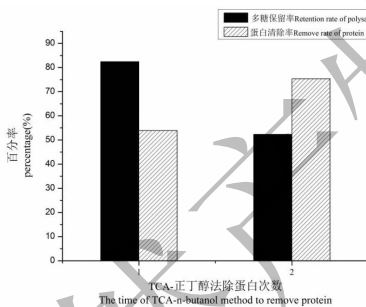


图 3 TCA-正丁醇除蛋白结果

Fig. 3 The results of TCA-n-butanol method to remove protein

2.1.5 酶-TCA-正丁醇法

结合酶法和 TCA-正丁醇法对北豆根多糖除蛋白效果如图 4。由图可知,该实验操作重复两次后,虽然蛋白脱除率增大了,但是多糖保留率非常低。因此酶-TCA-正丁醇法除蛋白重复 1 次即可,此时的多糖保留率为 48.82%,蛋白清除率为 79.62%。

2.1.6 不同除蛋白方法考查结果

按照上述确定的条件对 5 种除蛋白方法进行比较,每种方法重复 3 次,结果见图 5,5 种除蛋白的方法对北豆根多糖都有一定的脱蛋白效果,但是同时

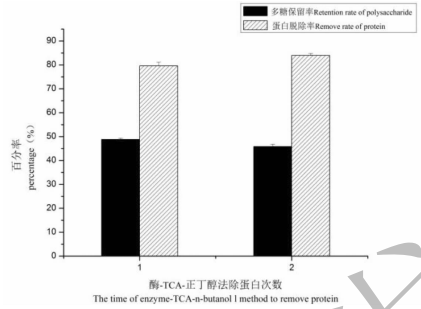


图 4 酶-TCA-正丁醇除蛋白结果

Fig. 4 The results of enzyme-TCA-n-butanol method to remove protein

也会造成一定的多糖损失。从脱蛋白的效果来看,除了 Sevage 法蛋白清除率较低,其他四个方法的蛋白脱除率都还可以,酶-TCA-正丁醇法的蛋白脱除率最高,达到 79.62%。而从多糖保留率来看,TCA-正丁醇法的多糖保留率最高。综合考虑,北豆根多糖除蛋白以 TCA-正丁醇法为宜。

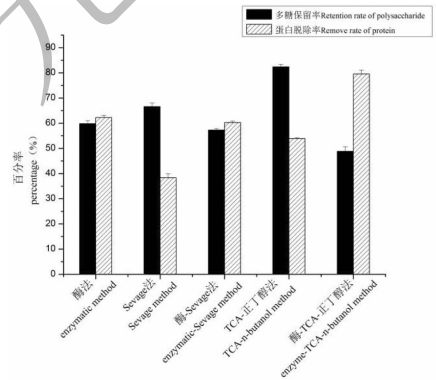


图 5 不同除蛋白方法结果比较

Fig. 5 Comparison of different protein removal methods

2.2 响应面法优化 TCA-正丁醇法除蛋白结果

2.2.1 响应面数据分析

采用 Box-Behnken 中心组合实验设计,用自变量 A、B、C 表示 TCA 与正丁醇体积比、北豆根多糖溶液与 TCA-正丁醇溶液体积比、振摇时间三个影响因素,以综合评分为响应值(Y)。利用 Design Expert 8.06 软件对实验结果进行响应面分析,得到回归模型参数和方差分析,其结果见表 2 和表 3。

利用 Design-Expert 8.06b 软件对 TCA 与正丁醇体积比(A)、北豆根多糖溶液与 TCA-正丁醇溶液体积比(B)、振摇时间(C)三个因素对北豆根多糖除蛋白综合评分(Y)进行响应面分析,建立三元二次回归方程: $Y = 91.32 + 0.64A - 1.05B + 2.57C -$

1.65AB-0.59AC-1.77BC-4.02A²-5.20B²-2.25C²。由表3的方差分析可以看出,该回归模型 $P < 0.05$,说明回归模型达到显著水平,失拟项 $P = 0.476 0 > 0.05$,差异不显著,表明该未知因素对试验结果干扰较小,残差均由随机误差所引起。该模型的相关系数 $R^2 = 0.930 7$,说明该模型拟合度较好,实验误差较小。从F值可以看出,在所选的各因素水平范围内,振摇时间对多糖得率的影响最大,北豆根多糖溶液与TCA-正丁醇溶液体积比的影响次之,TCA与正

丁醇体积比的影响最小。交互项AB、AC、BC对试验结果影响不显著($P > 0.05$);一次项C,二次项A²对试验结果影响显著($P < 0.05$),二次项B²对试验结果影响极显著($P < 0.01$),说明各工艺条件与北豆根多糖除蛋白的综合评分之间不是简单的线性关系,而是一种非线性关系。综上所述,该模型拟合度高,可用该回归模型来描述各工艺参数与响应值之间的真实关系,因此可用该模型预测北豆根多糖用TCA-正丁醇法除蛋白的工艺条件。

表2 实验设计与结果

Table 2 Design and results of experiment

编号 No.	A	B	C (mi)	多糖保留率 Retention rate of polysaccharide (%)	蛋白清除率 Remove rate of protein (%)	综合评分 Composite score
1	1:10	1:1	40	63.97	67.89	89.60
2	1:10	1:2	30	61.18	73.88	91.37
3	1:15	1:2	40	57.25	74.65	89.01
4	1:10	1:2	30	56.55	76.6	89.74
5	1:10	1:3	20	50.86	70.44	81.69
6	1:5	1:2	40	55.75	74.65	87.92
7	1:5	1:3	30	53.44	70.71	83.74
8	1:10	1:2	30	64.05	75.38	94.42
9	1:15	1:2	20	68.75	52.57	83.36
10	1:15	1:3	30	58.75	59.88	80.72
11	1:10	1:3	40	51.26	68.26	81.60
12	1:10	1:2	30	52.45	78.79	88.15
13	1:10	1:1	20	59.93	60.87	82.61
14	1:15	1:1	30	47.83	77.2	83.78
15	1:5	1:1	30	41.73	78.54	80.19
16	1:10	1:2	30	64.74	72.25	92.93
17	1:5	1:2	20	56.82	60.83	79.92

表3 基于综合评分的回归模型方差分析

Table 3 Analysis of variance in regression model based on composite score

方差来源 Source	离差平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F值 F value	P值 P value	显著度 Significance
模型 Model	313.54	9	34.84	5.61	0.016 6	*
A-A	3.25	1	3.25	0.52	0.492 8	
B-B	8.88	1	8.88	1.43	0.270 6	
C-C	52.79	1	52.79	8.50	0.022 5	*
AB	10.92	1	10.92	1.76	0.226 4	
AC	1.38	1	1.38	0.22	0.651 6	

续表 2(Continued Tab. 2)

方差来源 Source	离差平方和 Square sum	自由度 df	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value	显著度 Significance
BC	12.53	1	12.53	2.02	0.198 4	
A ²	67.99	1	67.99	10.95	0.013 0	*
B ²	113.68	1	113.68	18.30	0.003 7	**
C ²	21.33	1	21.33	3.44	0.106 2	
残差 Residual	43.47	7	6.21			
失拟度 Lack of Fit	18.72	3	6.24	1.01	0.476 0	
绝对误差 Pure Error	24.15	4	6.19			
总离差 Cor Total	357.02	16				

注: * $P < 0.05$, 显著; ** $P < 0.01$, 极显著。

Note: * $P < 0.05$ Significant different; ** $P < 0.01$ extremely Significant different.

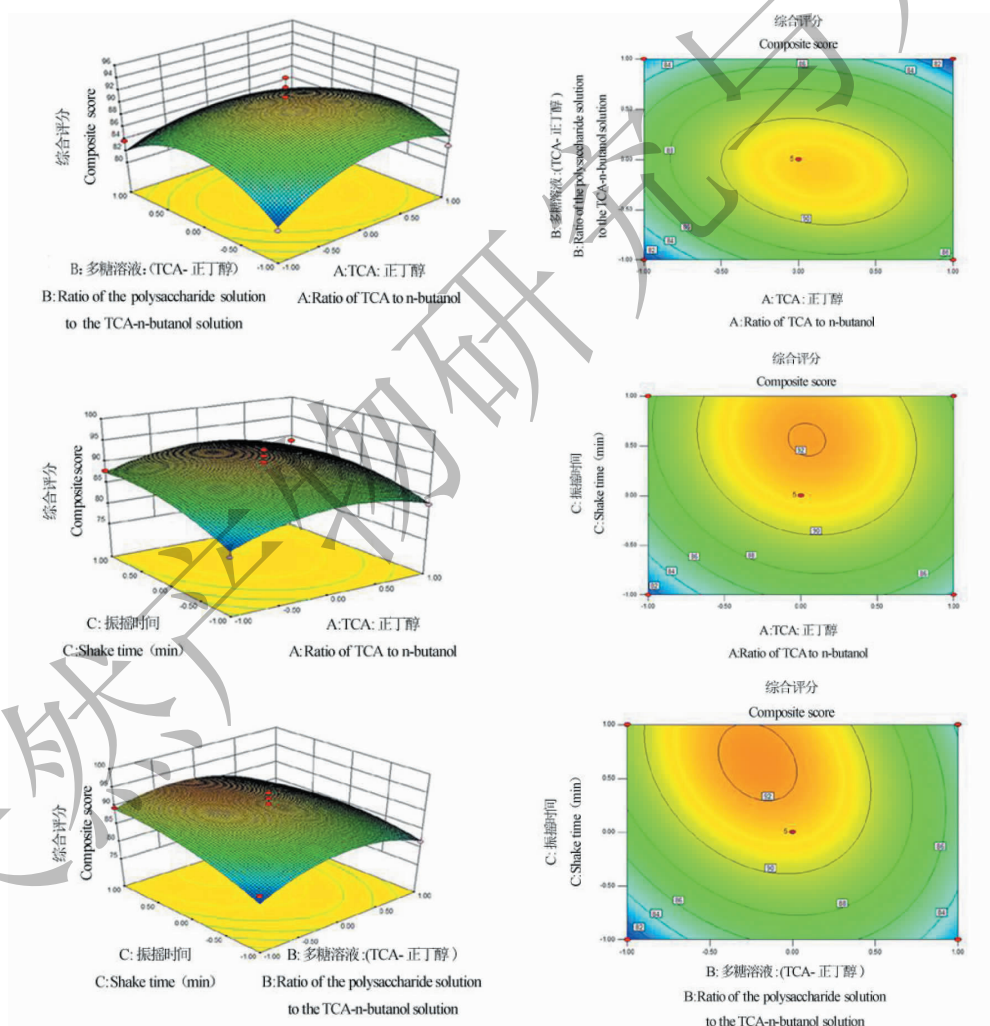


图 6 响应面法优化 TCA-正丁醇法除蛋白的响应面图和等高线图

Fig. 6 Response surface and contour plots of TCA-n-butanol method removing protein by Response Surface Method

2.2.2 响应面优化结果及分析

通过响应面 3D 图能直接观察因素交互作用对

综合评分的影响。如果响应面图曲线越陡,显示综合评分受该因素影响越大;反之,曲线越缓,表明综

合评分受该因素影响越小。影响北豆根多糖提取的各因子交互效应的强弱则能通过等高线形状体现出来。圆形状等高线表示交互作用不显著,而椭圆形等高线表示交互作用显著。响应面优化具体结果见图6。由图可知,振摇时间对多糖得率的影响最大,北豆根多糖溶液与TCA-正丁醇溶液体积比的影响次之,TCA与正丁醇体积比的影响最小且三个因素之间的交互作用不明显。通过对回归模型求解方程,得出北豆根多糖的最佳提取工艺条件为TCA:正丁醇=1:10.4,北豆根多糖溶液:TCA-正丁醇溶液=1:1.77,振摇时间为36.5 min。此条件下北豆根多糖除蛋白的综合评分的理论值为92.3。

2.2.3 验证实验

为检验实验模型的可靠性,采用上述工艺条件进行北豆根多糖的除蛋白实验,同时考虑到实际操作的可行性,将实验条件定为:TCA:正丁醇=1:10.4,北豆根多糖溶液:TCA-正丁醇溶液=1:1.77,振摇时间为36.5 min,在此条件下,北豆根多糖的多糖保留率为62.9%,蛋白清除率为73.1%,综合评分为92.1,与理论值相比相对误差为0.16%。因此,基于单因素试验的响应面法优化工艺参数,方法可行可靠,具有实用价值。

2.3 北豆根粗多糖的神经保护活性

北豆根粗多糖的神经保护活性结果见图7,空白对照组的细胞存活率为100%,而阴性对照组只加入 H_2O_2 损伤细胞4 h可明显引起细胞的损伤,其细胞存活率为45.6%。加入不同浓度的北豆根粗多糖溶液后,细胞存活率都有不同程度的增加,北豆根粗提液中多糖浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率为52.7%;多糖浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率为58.5%,与模型组比较具有显著性意义($P < 0.05$)。而当北豆根粗提液中多糖浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞存活率达到97.1%,与模型组比较具有极显著性意义($P < 0.01$)。这说明北豆根多糖粗提物可以对 H_2O_2 诱导的PC12细胞损伤起到一定的保护作用。

3 讨论

多糖主要以两种形式存在,一种是纯糖链,另一种是糖链和肽链结合,形成糖肽和糖蛋白。在多糖的研究中,蛋白质的存在会对实验结果产生干扰,在北豆根多糖的生物活性、药用效果研究中,多糖的纯化是首要和关键的步骤,多糖纯度的高低直接影响后续的药理活性、结构分析及构效关系研究的准确

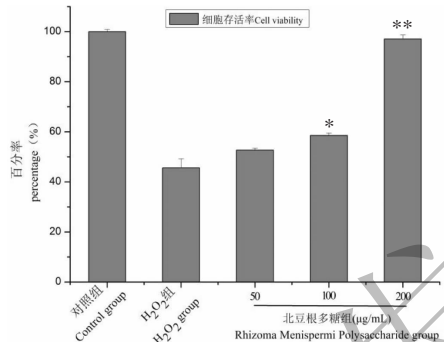


图7 北豆根多糖对 H_2O_2 损伤的PC12细胞的保护作用

Fig. 7 The protective effect of *Rhizoma Menispermii* polysaccharide on H_2O_2 -induced PC12 cell injury

注:与模型组比较:* $P < 0.05$ 显著;** $P < 0.01$ 极显著。

Note:Compared with the model group : * $P < 0.05$

Significant different; ** $P < 0.01$ extremely Significant different.

性。实验室中常用的除蛋白方法有酶法、酶-Sevage法、三氯乙酸-正丁醇法等,这些方法在除蛋白的同时,也会对多糖造成一定的损失。本实验综合了这几种方法的多糖保留率和蛋白清除率两个指标,筛选出北豆根多糖除蛋白的最佳方法并通过优化得到了最佳工艺,为后续北豆根多糖的研究奠定基础。

北豆根具有清热解毒、祛风止痛的功效,北豆根中主要的活性成分是生物碱,现代药理学研究发现其具有抗肿瘤、抗高血压、抗心律失常等作用。本实验首次发现北豆根多糖粗提液具有神经保护作用。 H_2O_2 是产生活性氧成分的化学物质,许多神经系统的发病机制均与 H_2O_2 有关,常用作神经细胞氧化损伤的诱导剂,经筛选得出浓度为0.75 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 H_2O_2 作用于PC12细胞4 h可使细胞损伤50%左右。经查阅文献,该实验设置了空白对照组、模型组及药物组,结果表明,当加入不同浓度的北豆根粗多糖溶液后,经 H_2O_2 损伤的细胞存活率显著提高,差异具有统计学意义,因此,北豆根粗多糖溶液对 H_2O_2 诱导的细胞损伤具有一定的保护作用。由于北豆根多糖粗提液中多糖含量较低,后续我们会对北豆根多糖进行分离纯化,进而研究北豆根多糖神经保护作用机制。本文研究为北豆根多糖进一步应用于氧化相关的神经退行性疾病的治疗提供一定的实验依据。

参考文献

- 1 Yi T, Jin YJ, Jia JJ, et al. Study on chemical constituent from rhizome of *Menispermum Dauricum* [J]. J Yanbian Univ (延

- 边大学学报),2017,43:128-130.
- 2 Zhang Y, Peng YB, Chen XZ, et al. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from the rhizome of *Menispermum Dauricum* [J]. Mod Chin Med(中国现代中药),2016,18:951-955.
 - 3 Li SS, Song X, Chai X, et al. Chemical constituent from the Rhizome of *Menispermum Dauricum* DC. [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2013,25(1):60-63.
 - 4 Gu FF, Li J, Yang CD, et al. Fractionation, structural characterization, and immunomodulatory activity of polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* [J]. Chin Tradit Herbal Drugs(中草药),2018,49:2359-2364.
 - 5 Sun YL, Lv SW, Wu JL, et al. Optimization of polysaccharide extraction from Bai-hu decoction and its hypoglycemic activity [J]. Centr South Pharm(中南药学),2018,16:495-499.
 - 6 Pan XP, Xing ZL, Jia WG, et al. Identification and preparation of a glycol-protein fraction AN from tea extracts and its *in vivo* and *in vitro* anti-hyperglycemia activity [J]. Chin J Chin Mater Med(中国中药杂志),2018,43:736-742.
 - 7 Cheng XX, Zhang XH, Yang HW, et al. Isolation, purification and anti-oxidant activity of polysaccharides from *Acanthopanax trifoliatum* [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2017,48:4219-4223.
 - 8 Yu LL, Huang SY. Study on antioxidation of polysaccharides from Lingyun, Guangxi wild *Dendrobium officinale* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2014,25:2842-2845.
 - 9 Wan Q, Xiao W, Wang ZZ, et al. Study on the process of removing protein from *Ligustrum lucidum* polysaccharide [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2010,41:407-410.
 - 10 Fang SP, Wang WX, Luo XL. Study on the method of removing protein from Chuanxiong polysaccharide [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2009,20:2176-2177.
 - 11 Hu HG, Zhao QL, Pang ZC, et al. Investigation of deproteinization and decoloration technology for polysaccharide from mango pomace [J]. Sci Tech Food Ind(食品工业科技),2018,39:183-188.
 - 12 Liu Q, Song S, Guo J, et al. Protective effects of polysaccharide from seed watermelon on the oxidative damage of PC12 cells induced by H₂O₂ [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2015,27:338-343.
 - 13 Wang FX, Liu Q, Wang W, et al. A polysaccharide isolated from *Cynomorium songaricum* Rupr. protects PC12 cells against H₂O₂-induced injury [J]. Int J Biol Macromol,2016,87:222-228.
 - 14 Yuan F, Zhang JP, Ma L. Protective effects of polysaccharide from *Vitis Vinifera* L A β 25-35 induced injury in PC12 cells [J]. Sci & Tec Rev(科技导报),2012,30(4):47-50.
 - 15 Gu CY, Chen QL, Li HT. Protective effects and mechanism of polysaccharide from platycodon grandiflorum on damage of PC12 cells induced by H₂O₂ [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med(南京中医药大学学报),2017,33:268-272.
 - 16 Shi DH, Liu WW, Liu YJ, et al. The protective effects of polysaccharides from *Enteromorpha prolifera* on the PC12 cells injury induced by H₂O₂ [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志),2012,33(1):40-42.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

广西壮族自治区药用植物园

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社