

白藜多糖的分离纯化及其对小鼠脾细胞增殖的影响

李岩, 赵宏, 王宇亮, 初维, 张宇* (佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的] 分离纯化白藜多糖, 研究白藜均一多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。[方法] 采用水提醇沉法提取白藜多糖, 通过三氯乙酸法脱除蛋白, 用中空纤维超滤膜和 DEAE Cellulose DE-52 对白藜多糖进行分离纯化, 高效凝胶过滤色谱法鉴定纯度并测定分子量, PMP 柱前衍生化测定单糖组成, 采用 MTT 法测定均一多糖对 ConA 和 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的影响。[结果] PAJM-A 均一多糖分子量为 1.29×10^5 u, 由甘露糖(Man)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcA)、半乳糖(Gal)、葡萄糖(Glc)、木糖(Xyl)组成, 其物质的量比为 1.36:1.87:2.02:1.58:1.04, 均一多糖对 ConA 诱导的 T 淋巴细胞和 LPS 诱导的 B 淋巴细胞有较显著的增殖作用。[结论] PAJM-A 是一种新的白藜均一多糖, 并与 ConA、LPS 对 T、B 淋巴细胞的增殖有协同刺激作用。

关键词 白藜; 多糖; 分离纯化; 脾淋巴细胞

中图分类号 S567 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)17-137-04

Separation and Purification of Polysaccharides from *Ampelopsis Japonica* (Thunb.) Makino and Its Effects on Proliferation Function of Mice Spleen Lymphocyte

LI Yan, ZHAO Hong, WANG Yu-liang, ZHANG Yu* et al (College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] To separate and purify polysaccharides from *Ampelopsis Japonica* (Thunb.) Makino, and to study its effects on proliferation function of mice spleen lymphocyte transformation. [Method] Hot water extracting and TCA method were employed to isolate the PAJM. Hollow fiber ultrafiltration membrane and the DEAE Cellulose 52 were used to separate and purify polysaccharides, and the monosaccharide composition, and structure were preliminarily identified by IR and HPLC. Their effects on proliferation function of mice spleen lymphocyte transformation were determined by MTT. [Result] PAJM-A was 1.29×10^5 u and it was mainly composed of Man, Rha, GlcA, Glc, Gal and Xyl in the molar ratio of 1.36:1.87:2.02:0.10:1.58:1.04. And the homogeneous polysaccharides were able to increase the proliferation of lymphocytes induced by ConA and LPS. [Conclusion] PAJM-A is a novel homogeneous polysaccharide, PAJM-A can effectively increase lymphocyte proliferation and enhance the effect of ConA, LPS-induced T and B cell growth.

Key words *Ampelopsis Japonica* (Thunb.) Makino; Polysaccharides; Separation and purification; Spleen cell

白藜为葡萄科蛇葡萄属植物白藜 *Ampelopsis Japonica* (Thunb.) Makino 的干燥块根^[1], 广泛分布于华东、华北、中南、辽宁、吉林、贵州、广西等地。其味苦、辛、微寒, 归心、胃经, 具有清热解毒、消痈散结、敛疮生肌之功效。白藜中的化学成分复杂, 目前已从中分离获得多糖类^[2]、黄酮类^[3-5]、有机酸类^[6]、三萜^[7]、甾醇类等成分, 临床用于治疗疮痈肿毒、烧烫伤、癌性发热、支气管扩张咯血、手足皲裂、骨折等^[8-13]。笔者对白藜多糖进行分离纯化, 并选择小鼠脾淋巴细胞增殖试验考察其对免疫作用的影响, 旨在为研发理想的用于免疫调节的中药组分奠定理论基础。

1 材料与方

1.1 仪器 UV757CRT 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司); LG10-2.4A 型高速离心机(北京京立离心机有限公司); 3 500 u 透析袋(上海源叶生物科技有限公司); FDU-1200 型真空冷冻干燥机(日本东京理化株式会社); FA2004 电子分析天平(上海恒平科学仪器有限公司); TDL-5000B 型离心机(上海安亭科学仪器厂); Waters-600 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Waters-2424 蒸发光检测器(美国 Waters 公司); BSZ-100 自动部分收集器(上海沪西分析仪器厂); FTIR-8400S 型红外光谱仪(日本岛津有限公司); SW-CJ-2FD 型净化工作台(苏州安泰空气技术有

限公司); 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 试剂 白藜由安国市万联中药饮片有限公司提供, 经佳木斯大学药学院天然药物化学教研室张宇教授鉴定为葡萄科蛇葡萄属中药白藜, 鼠李糖、甘露糖、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸均为 Pharmacia 公司产品, 质量分数均 > 99%; DEAE Cellulose 52 (Whatman 公司); 三氟乙酸(美国 Sigma 公司)。

1.3 方法

1.3.1 白藜多糖的提取与分离纯化。 取白藜干燥块根 1 kg, 用 90% 乙醇回流提取 3 次, 每次 2 h, 弃去提取液, 药渣加 8 倍量的水, 回流提取 3 次, 每次 2 h, 合并提取液, 过滤浓缩, 加入乙醇醇沉, 使乙醇终体积分数为 80%, 静置 24 h, 抽滤得沉淀后冷冻干燥得白藜粗多糖。粗多糖用三氯乙酸法除蛋白后醇沉, 沉淀物依次用无水乙醇、丙酮洗涤, 得白藜多糖 PAJM。

称取 PAJM 溶液依次过中空纤维超滤膜(150、100、50、20、10 和 6 ku), 用 DEAE-52(80 cm × 3 cm) 进一步分离, 用 0~1.0 mol/L NaCl 溶液进行洗脱, 采用苯酚硫酸法测定吸光度(A_{490}), 收集洗脱液, 透析, 减压浓缩, 冷冻干燥, 得到均一多糖 PAJM-A, 备用。

1.3.2 纯度及分子量测定。 采用高效凝胶渗透色谱(HPGPC-ELSD)分析: 色谱柱为 Ultrahydrogel TM (Linear) 水溶性凝胶柱(7.8 mm × 300.0 mm), 标准葡聚糖(T20、T40、T110、T500、T2000)配制成 2 g/L 的标准品溶液, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 以色谱峰的保留时间(R_t)为横坐标, lgMw 为纵坐标绘制标准曲线。

基金项目 佳木斯大学校级创新团队(CXTD-2013-05); 佳木斯大学青年创新人才培养计划(22Zq201501); 佳木斯大学研究生科技创新项目(LZZ2015_030)。

作者简介 李岩(1992-), 女, 黑龙江宝清人, 硕士研究生, 研究方向: 天然产物的研究与开发。* 通讯作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事天然药物有效成分的分离及结构研究。

收稿日期 2016-05-13

样品多糖分子量的测定:配制 PAJM-A 2 g/L 的溶液,以三蒸水作为流动相,流速 0.8 mL/min,柱温 30 ℃。检验其纯度,通过标准曲线的回归方程得到 PAJM-A 的分子量。

1.3.3 PAJM-A 单糖组成分析。

1.3.3.1 混合单糖对照品溶液的制备。精密称取甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖醛酸、木糖 8 种单糖对照品各 10 mg,用双蒸水配成 1 mmol/L 的混合单糖对照品储备液。

1.3.3.2 PAJM-A 的水解。取 PAJM-A 5 mg,加 2 mL 2 mol/L TFA,封管后于 120 ℃水解 160 min,冷却后,将水解样品溶液加甲醇洗涤反复旋干,加入 700 μ L 蒸馏水,备用。

1.3.3.3 单糖对照品及 PAJM-A 水解产物的衍生化标记。分别取单糖对照品混合溶液和 PAJM-A 水解产物各 700 μ L,加入 0.5 mol/L 重蒸 PMP 甲醇溶液 350 μ L、0.3 mol/L NaOH 溶液 350 μ L 涡旋混匀,于 70 ℃反应 1 h,冷却至室温,加入 0.3 mol/L HCl 溶液 350 μ L 进行中和,加 1 mL 乙酸异戊酯萃取 2 次,再加入氯仿 2 mL 涡旋混匀,弃去氯仿液,重复 3 次后将水相过 0.45 μ m 微孔滤膜供 HPLC 进样分析。

1.3.3.4 色谱条件。ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ 柱(250.0 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)色谱柱;流动相磷酸盐缓冲溶液-乙腈(83:17),柱温 30 ℃,流速 1.0 mL/min,检测波长 245 nm,进样量 10 μ L^[14]。

1.3.4 红外光谱分析。取均一多糖 PAJM-A 1 mg 与干燥的 KBr 粉末 100 mg 混合压片,在红外光谱仪 4000 ~ 400 cm⁻¹ 扫描,记录红外光谱图^[15]。

1.3.5 ConA 和 LPS 诱导小鼠脾淋巴细胞增殖试验。脾淋巴细胞悬浮液的制备参照文献[16-17],在 96 孔培养板中每孔依次加入浓度为 1×10^8 个/mL 的小鼠脾细胞悬液 100 μ L,除最外圈的空白对照加 100 μ L PBS,放入 CO₂ 培养箱中 37 ℃培养 24 h,剩下的 60 孔再加入 ConA 和 LPS 20 μ L 使其终浓度为 5 μ g/mL,每孔加入不同稀释度的多糖溶液(RPMI-1640 培养液配制)80 μ L,每个稀释度设 6 个复孔。放置在 5% CO₂ 培养箱中 37 ℃培养 48 h。每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 10 μ L,继续培养 4 h,再加入二甲基亚砜 100 μ L,充分振荡,于酶标仪上 492 nm 处测定吸光度。

1.4 数据分析 用 SPSS 软件对试验数据进行分析,所得数据以均值 $\pm$ 方差表示,组间用 *t* 检验进行比较。

2 结果与分析

2.1 纯度及分子量 经高效凝胶色谱鉴定纯度,色谱峰形基本上是单一而尖锐,说明多糖中相对分子质量分布较均一。标准葡聚糖标准曲线方程 $Y = -0.7111X + 11.706$ ($R^2 = 0.9946$),分子量在 20 000 ~ 200 000 u 线性关系良好(图 1)。PAJM-A 出现对称的单一峰,可判断 PAJM-A 为均一多糖,PAJM-A 保留时间(t_R)为 9.280 min,分子量(M_w)为 1.29×10^5 u(图 2)。

2.2 PAJM-A 单糖组成 混合标准单糖对照品经 PMP 柱前衍生后,进行 HPLC 分析后得到 8 种标准单糖的色谱峰,混合单糖对照品及样品的 HPLC 色谱见图 3。PAJM-A 经

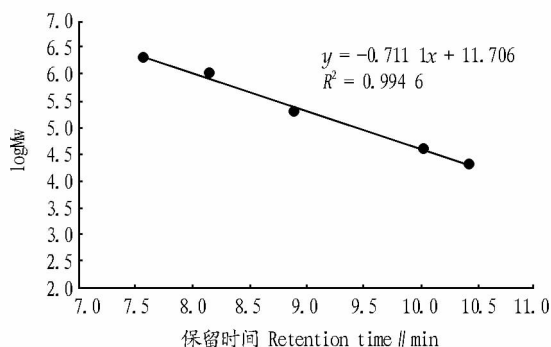


图 1 标准葡聚糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of standard glucan

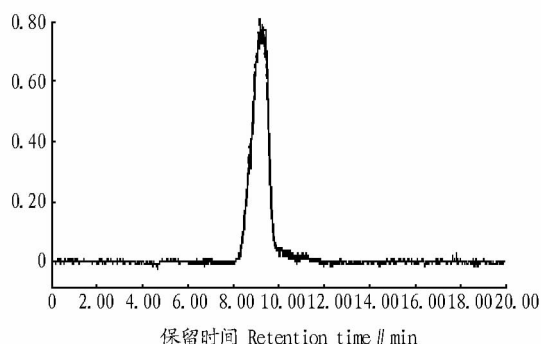


图 2 PAJM-A 的高效液相凝胶渗透色谱图

Fig.2 High performance liquid gel permeation chromatogram of PAJM-A

衍生化后通过 HPLC 测定其单糖组成,结果表明,PAJM-A 由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和木糖组成,物质的量比为 1.36:1.87:2.02:0.10:1.58:1.04。

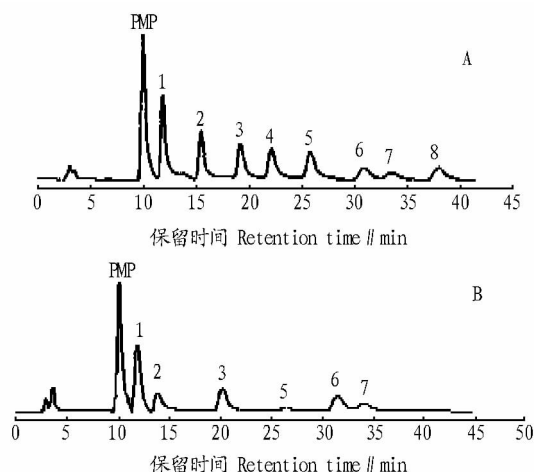


图 3 对照品(A)和 PAJM-A(B)衍生产品的 HPLC

Fig.3 HPLC of reference substances (A) and PAJM-A (B) derived products

2.3 IR 分析 PAJM-A 的红外光谱图见图 4。由图 4 可知,在 3 500 ~ 3 300 cm⁻¹ 有一个强且宽的 O-H 伸缩振动峰;次甲基-CH-的伸缩振动在 3 000 ~ 2 800 cm⁻¹ 出现一个小峰,是糖类的特征峰;1 400 ~ 1 200 cm⁻¹ 的一组峰则是 C-H 的伸缩振动引起的,在 1 735 cm⁻¹ 左右无吸收,表明 PAJM-A 不含糖醛酸,在 890 cm⁻¹ 左右有吸收峰,可能为 β -吡喃糖

苷键。

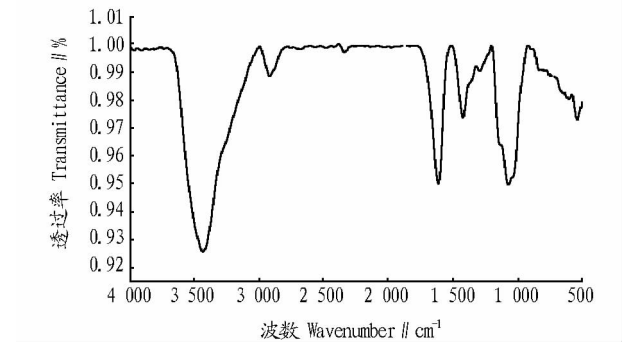


图 4 PAJM-A 的红外光谱

Fig.4 Infrared spectroscopy of PAJM-A

2.4 PAJM-A 对 ConA 和 LPS 诱导的小鼠脾细胞增殖的影响 由表 1 可知,空白对照组与阳性对照组相比具有极显著性差异($P<0.01$),ConA 诱导脾细胞增殖,提示造模成功,药物组与空白对照组相比,各组吸光度均有极显著差异($P<0.01$),提示 PAJM-A 对 ConA 诱导 T 细胞增殖具有明显的促进作用,且在 200~800 $\mu\text{g/mL}$ 与 ConA 诱导剂有协同作用,并具有明显的量效关系。

表 1 PAJM-A 对 ConA 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的影响
Table 1 Effects of PAJM-A on proliferation of mice spleen lymphocyte induced by ConA

组别 Group	浓度 Concentration $\mu\text{g/mL}$	OD OD value
空白对照组 Blank control group	0	0.191 $\pm$ 0.007
阳性对照组 Positive control group	0	0.258 $\pm$ 0.015 **
PAJM-A	800	0.359 $\pm$ 0.019 **
	400	0.305 $\pm$ 0.008 **
	200	0.271 $\pm$ 0.014 **

注:与空白对照组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$), $n=6$ 。
Note: Compared with control group,* indicated significant differences ($P<0.05$); ** indicated extremely significant differences ($P<0.01$), $n=6$.

由表 2 可知,阴性对照组与空白组相比,吸光度明显升高,且有极显著性差异($P<0.01$),说明 LPS 能引起小鼠脾淋巴细胞体外增殖。药物组与空白对照组相比,各组吸光度均有极显著差异($P<0.01$),提示 PAJM-A 对 LPS 诱导 B 细胞增殖有明显的促进作用,且在 200~800 $\mu\text{g/mL}$ 与 LPS 诱导剂有协同作用,并具有明显的量效关系。

3 结论与讨论

免疫学研究的一个重要方向在于将基础免疫学研究的成果应用于感染性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤等重要疾病发病机制的研究,特异性的预防和治疗措施的建立、新型疫苗的研制和开发等^[18]。多糖为单糖组成的天然高分子化合物,20 世纪 60 年代后多糖作为广谱免疫促进剂引起人们极大兴趣,赵武连^[19]、张庆等^[20]研究发现,多糖对淋巴细胞有一定的促进增殖作用。脾脏是最大外周免疫器官,是 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞的定居场所,T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞是免疫系统中非常重要的免疫细胞^[21],PAJM-A 能有效促进

脾淋巴细胞的增殖,并与 ConA、LPS 对 T、B 淋巴细胞的增殖有协同刺激作用。

表 2 PAJM-A 对 LPS 诱导的小鼠脾淋巴细胞增殖的影响
Table 2 Effects of PAJM-A on proliferation of mice spleen lymphocyte induced by LPS

组别 Group	浓度 Concentration $\mu\text{g/mL}$	OD OD value
空白对照组 Blank control group	0	0.203 $\pm$ 0.055
阳性对照组 Positive control group	0	0.249 $\pm$ 0.080 **
PAJM-A	800	0.453 $\pm$ 0.011 **
	400	0.327 $\pm$ 0.012 **
	200	0.304 $\pm$ 0.076 **

注:与空白对照组相比,*表示差异显著($P<0.05$),**表示差异极显著($P<0.01$), $n=6$ 。
Note: Compared with control group,* indicated significant differences ($P<0.05$); ** indicated extremely significant differences ($P<0.01$), $n=6$.

该研究首次对中药白藜中免疫活性成分多糖进行分离纯化,为进一步分析白藜多糖的一级结构和高级结构以及今后研究其构效关系奠定理论基础。高效凝胶渗透色谱法是目前测定多糖纯度和分子量的常用方法,具有快速、准确、分辨率高、重现性好、样品量小等优点^[22]。白藜多糖为水溶性多糖,在提取多糖时需要脱掉脂溶性成分,用无水乙醇和丙酮洗去杂质和一些色素,可以提高多糖的含量。在对粗多糖进行分离纯化时,DEAE-52 的纯化效果较好,经 HPGPC-ELSD 检测后,PAJM-A 呈单一对称峰,说明纯度可达 98% 以上,是均一多糖。该研究采用 PMP 柱前衍生化高效液相色谱法^[23]测定单糖组成,结果表明,PAJM-A 的单糖组成均由甘露糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖组成,其物质的量比为 1.36:1.87:2.02:0.10:1.58:1.04。该研究结果表明,白藜含大量的具有显著生物活性的多糖类成分,这进一步深化了对常用中药白藜药效物质基础和功效的认识,为合理开发利用白藜药材提供理论依据。

参考文献

[1] 中国医学科学院药物研究所. 中药志:第一册[M]. 北京:人民卫生出版社,1959:404.
[2] 林慧君,陈卫. 白藜多糖 PAJM-I 的分离纯化和结构分析[J]. 海峡药学,2008,20(4):102-104.
[3] 郭丽冰. 广东白藜的分离与鉴定[J]. 广东药学院学报,1997,13(1):1-6.
[4] 郭丽冰,卢雁,陈水平. 白藜化学成分的研究[J]. 广东药学院学报,1996,12(3):145-147.
[5] 俞文胜,陈新民,杨磊,等. 白藜单宁化学成分的研究[J]. 天然产物研究与开发,1995,7(1):15-18.
[6] 赫军,姜冀,宋莹莹,等. 白藜化学成分的研究[J]. 沈阳药科大学学报,2008,25(8):636-638.
[7] 邹济高,金蓉鸾,何宏贤. 白藜化学成分研究[J]. 中药材,2000,23(2):91-93.
[8] 张春宝,曹双全,高增书,等. 康泰烫伤药膜的研制及质量控制[J]. 河北中医药学报,1999,14(2):39.
[9] 苗晋鑫,白明,郭晓芳,等. 白藜对大鼠、小鼠烫伤模型的影响[J]. 中药药理与临床,2012,19(18):86-89.
[10] 汤佩佩,郭晓芳,白明,等. 白藜外用对疮疡模型的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,29(4):65-68.
[11] BEROVIC M, HABIJANIC J, ZORE I, et al. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides[J]. Journal of biotechnology, 2003, 103(1):77-86.
[12] HATTORI T S, KOMATSU N, SHICHIJO K, et al. Protein-bound polysac-

charide K induced apoptosis of the human Burkitt lymphoma cell line, Namalwa[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2004, 58(4): 226-230.

[13] UMEMURA K, YANASE K, SUZUKI M, et al. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of human cancer cell lines by a marine microalgal polysaccharide[J]. Biochemical pharmacology, 2003, 66(3): 481-487.

[14] 茅蕾蕾, 陈颖, 胡碧原, 等. 银杏外种皮多糖的单糖组成分析[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 262-266.

[15] 周宝珍, 肖娅萍, 牛俊峰, 等. 绞股蓝多糖的分离纯化及红外光谱、气相色谱分析[J]. 中国中医药杂志, 2012, 27(1): 97-100.

[16] 长城, 赵海霞, 姜美杰, 等. 竹节参多糖对环磷酸腺苷致免疫低下小鼠的恢复作用研究[J]. 中药材, 2011, 34(1): 91-94.

[17] HAKKI A, HALLQUIST N, FRIEDMAN H, et al. Differential impact of nicotine on cellular proliferation and cytokine production by LPS-stimulated murine splenocytes[J]. Int J Immunopharmacology, 2000, 22(6): 403-410.

[18] 刘娟, 曹雪涛. 2014 年国内外免疫学研究重要进展[J]. 中国免疫学杂志, 2015, 31(1): 1-11.

[19] 赵武连. 植物多糖提取物致有丝分裂反应的分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 1991, 11(6): 381.

[20] 张庆, 雷林生, 林勤保, 等. 大枣多糖体外抗补体活性及促进小鼠脾细胞的增殖作用[J]. 中药药理与临床, 1998, 14(5): 19-21.

[21] 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): 27-32.

[22] 王宇亮, 唐雨薇, 赵宏, 等. 一种糖槭叶多糖的提取分离及结构分析[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(10): 2371-2374.

[23] 赵宏, 柴桂芳, 王秋红, 等. 一种车前子多糖的分离纯化及单糖组成分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 97-100.

(上接第 87 页)

指数计算公式计算各月的 C 值, 划分甘肃省每个月旅游的舒适程度按照标准, 结果见表 3。由表 3 可知, 河西地区的旅游舒适期在 5、6 和 9 月, 较舒适期在 4、7、8 和 10 月, 其他月份为较不舒适期和不舒适期; 河东地区的天水、崆峒和临洮 3 个地区旅游舒适期在 5~9 月, 较舒适期在 4、10 月; 玛曲和

合作地区由于海拔较高, 合作的舒适期只有 7 月, 玛曲没有舒适期, 而合作的较舒适期在 5、6、8、9 月, 玛曲的较舒适期在 5~8 月, 其他月份较不舒适和不舒适期。综合得出, 甘肃省除玛曲和合作地区外, 旅游气候适宜性为春夏适宜, 旅游舒适期主要分布在春夏季节, 为 4~9 月, 冬季受到冷高压控制, 天气比较寒冷, 较不舒适期或不舒适期在 11 月到次年 3 月。

表 3 甘肃省各地区旅游气候舒适度分期
Table 3 Time division of tourism climate suitability in different areas in Gansu province

地区 Area	舒适期 Suitable period	较舒适期 Relatively suitable period	较不舒适期 Relatively unsuitable period	不舒适期 Unsuitable period	舒适期长 Long suitable period//月
武威 Wuwei	5、6、9 月	4、7、8、10 月	3、11 月	1、2、12 月	7
张掖 Zhangye	5、6、9、10 月	4、7、8 月	3、11 月	1、2、12 月	7
酒泉 Jiuquan	5、6、8、9 月	4、7、10 月	3、11 月	1、2、12 月	7
敦煌 Dunhuang	4、5、9 月	3、6、7、8、10 月	11 月	1、2、12 月	8
永昌 Yongchang	5、6、7、8 月	4、9、10 月	3、11 月	1、2、12 月	7
兰州 Lanzhou	5、6、9 月	3、4、7、8、10 月	1、2、11、12 月		8
天水 Tianshui	4、5、6、9 月	7、8、10 月	3、12 月	1、2 月	7
崆峒 Kongtong	5、6、7、8、9 月	4、10 月	3、11 月	1、2、12 月	7
西峰 Xifeng	5、6、7、8、9 月	4、10 月	3、11 月	1、2、12 月	7
临洮 Lintao	5、6、7、8、9、10、11 月	4 月	3 月	1、2、12 月	8
玛曲 Maqu		5、6、7、8 月	4、9、10 月	1、2、3、11、12 月	4
合作 Hezuo	7 月	5、6、8、9 月	3、4、10、11 月	1、2、12 月	5

5 结论

通过温湿指数、风寒指数和着衣指数分析甘肃省旅游气候资源适宜性, 得出以下结论: ①春季最适宜旅游的地区是天水 and 敦煌地区, 夏季最适宜旅游的地区是临洮和永昌地区, 秋季最适宜旅游的地区是天水 and 临洮地区, 冬季最适宜旅游的地区是兰州和天水。敦煌、兰州和临洮的旅游舒适期最长, 为 8 个月。②甘肃省旅游区最佳旅游期为 4~10 月, 7~8 月平均温度为 20℃左右, 11 月到次年 2 月气温较低。加上甘肃省具有独特的自然景观, 历史遗产也很多, 旅游业发展优势很强。

参考文献

[1] 吴普, 席建超, 葛全胜. 中国旅游气候研究综述[J]. 地理科学进展, 2010, 29(2): 131-137.

[2] 刘清春, 王铮, 许世远. 中国城市旅游气候舒适性分析[J]. 资源科学, 2007, 29(1): 133-141.

[3] 韩蓓蓓, 陈兴全, 李东, 等. 华山旅游气候舒适度时空变化分析[J]. 气象与环境科学, 2014, 37(2): 80-84.

[4] 闫业超, 岳书平, 刘学华, 等. 国内外气候舒适度评价研究进展[J]. 地球科学进展, 2013, 28(10): 1119-1125.

[5] TERJUNG W H. Physiological climates of the conterminous US: A bioclimatic classification based on man[J]. Annals of the association of american geographers, 1966, 56(1): 141-179.

[6] OLIVER J E. Climate and man's environment: An introduction to applied climatology[M]. New York, USA: John Wiley, Sons, 1973.

[7] 长安, 葛全胜, 方修琦. 青藏铁路旅游线气候适宜性分析[J]. 地理研究, 2007, 26(3): 533-540.

[8] 马丽君, 孙根年, 王洁洁. 中国东北沿海沿边城市旅游气候舒适度评价[J]. 地理科学进展, 2009, 28(5): 714-722.

[9] 任健美. 五台山旅游气候及其舒适度评价[J]. 地理研究, 2005, 23(6): 856-863.