

研究报告

层迭灵芝子实体的体外抗肿瘤及免疫活性

刘伟^{1,2} 唐庆九² 张光亚³ 冯娜^{2*} 韩伟^{1*}

(1. 华东理工大学药学院 上海 200237)

(2. 上海市农业科学院食用菌研究所 农业部南方食用菌资源利用重点实验室 上海市农业遗传育种重点开放实验室 上海 201403)

(3. 中国供销合作总社昆明食用菌研究所 云南 昆明 650223)

摘要:【背景】层迭灵芝 *Ganoderma lobatum* 是灵芝属中的一个种, 在民间有药用历史, 但缺乏对其化学成分和药理活性的科学研究。【目的】以赤芝 *Ganoderma lingzhi* 子实体为参照, 研究对比层迭灵芝子实体的抗肿瘤及免疫活性的强弱, 探讨层迭灵芝的药用价值。【方法】采用化学分析及仪器分析的方法, 比较 2 种灵芝子实体中三萜及多糖含量差异, 并进行体外抗肿瘤及免疫活性研究。【结果】层迭灵芝和赤芝的子实体中三萜含量差异不大, 分别为 1.14% 和 1.21%, 但 2 种灵芝中三萜化合物的种类差异较大。层迭灵芝子实体中的多糖含量较赤芝稍高, 分别为 3.60% 和 2.67%, 2 种子实体中多糖的重均分子量分布特征有所差别。2 种灵芝醇提物对肿瘤细胞 K562 及 SW620 的增殖均具有一定的抑制活性, 其中, 层迭灵芝对 SW620 细胞具有较强的抑制活性, 其 IC₅₀ 值达到了 52.5 μg/mL。2 种灵芝水提物可以促进 RAW 264.7 细胞释放 NO, 说明两者均具有一定的免疫活性。【结论】层迭灵芝具有较好的抗肿瘤及免疫活性, 可以作为药用开发的原料来源。

关键词: 层迭灵芝, 赤芝, 三萜, 多糖, 生物活性

In vitro antitumor and immunological activity of *Ganoderma lobatum*

LIU Wei^{1,2} TANG Qing-Jiu² ZHANG Guang-Ya³ FENG Na^{2*} HAN Wei^{1*}

(1. College of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

(2. Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Shanghai 201403, China)

(3. Kunming Institute of Edible Fungus, China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming, Yunnan 650223, China)

Abstract: [Background] *Ganoderma lobatum* is a species of *Ganoderma* spp., which can be used as a medicinal herb in the folk. However, there is no scientific research on the chemical composition and pharmacological activity of *Ganoderma lobatum*. [Objective] To explore the medicinal value of

Foundation item: Key Technologies Research and Development Program of China (2013BAD16B08-02)

*Corresponding authors: E-mail: FENG Na: fengna006@163.com; HAN Wei: whan@ecust.edu.cn

Received: June 19, 2017; Accepted: August 01, 2017; Published online (www.cnki.net): August 08, 2017

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAD16B08-02)

*通信作者: E-mail: 冯娜: fengna006@163.com; 韩伟: whan@ecust.edu.cn

收稿日期: 2017-06-19; 接受日期: 2017-08-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-08

Ganoderma lobatum, the antitumor and immunological activity of *Ganoderma lobatum* were studied, with the *Ganoderma lingzhi* as a reference. [Methods] Triterpenoids and polysaccharides in the two species of *Ganoderma* were analyzed by chemical and instrumental analysis, and their antitumor and immunological activity were studied. [Results] There were no significantly differences in the contents of triterpenoids in *Ganoderma lobatum* and *Ganoderma lingzhi*, which were 1.14% and 1.21%, respectively. However, the kinds of triterpenoids in the two species of *Ganoderma* was distinctive. The content of polysaccharides in *Ganoderma lobatum* were slightly higher than that in *Ganoderma lingzhi*, which were 3.60% and 2.67%, respectively. Meanwhile, there was a difference in the molecular weight distribution of polysaccharides in the two fruiting bodies. Both of the ethanol extract had inhibitory activity on K562 and SW620 cell. Among them, *Ganoderma lobatum* has a strong inhibitory activity on SW620 cells with IC₅₀ of 52.5 μg/mL. Furthermore, both of them aqueous extract could promote RAW 264.7 cells to release NO, which illustrated that both have certain immunological activity. [Conclusion] *Ganoderma lobatum* has good antitumor and immunological activity, which could be used as a source of raw material for medicinal development.

Keywords: *Ganoderma lobatum*, *Ganoderma lingzhi*, Triterpenoid, Polysaccharide, Bioactivity

灵芝 *Ganoderma* spp.在我国古代就被认为是滋补强壮、扶正固本的药品,至今已有 2 000 多年的药用历史。现代研究表明,多糖和三萜是灵芝中的主要活性成分,具有免疫调节、抗肿瘤、保肝、抗氧化、降血糖等多种生物活性^[1-4]。

从分类学上看,灵芝是担子菌门伞菌纲多孔菌目灵芝科灵芝属真菌,该属目前在我国有 70 多种^[5-7]。据《中华人民共和国药典》2015 版规定,只有赤芝 *Ganoderma lingzhi* 和紫芝 *Ganoderma sinense* 作为药物使用^[8]。其中,以赤芝的栽培和应用最为广泛。近年来的研究发现,除赤芝和紫芝外,灵芝科中还有多种具有药理活性的真菌。树舌灵芝 *Ganoderma applanatum*、松杉灵芝 *Ganoderma tsugae*、薄盖灵芝 *Ganoderma capense*、硬孔灵芝 *Ganoderma duropora*、反柄灵芝 *Ganoderma cochlear* 等均可入药^[9]。

层迭灵芝 *Ganoderma lobatum* 又名裂迭灵芝、裂叠灵芝、层迭树舌,在我国分布于河北、浙江、广东、海南、云南、贵州等地,民间可代替灵芝入药^[10-11]。目前,层迭灵芝在我国南方已有少量人工栽培,但关于层迭灵芝化学成分及活性的研究尚存在空白。因此,本研究以广泛栽培和应用的赤芝为对照,研究对比了 2 种灵芝中主要活性成分即三萜和多糖的含量以及种类的差异,并

对其抗肿瘤活性和免疫活性进行了比较,从而求证层迭灵芝药用的科学性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和细胞

层迭灵芝 *G. lobatum* 子实体和赤芝 *G. lingzhi* 子实体分别由昆明食用菌研究所和上海市农业科学院食用菌研究所提供,粉碎后过 20 目筛备用。

K562: 人慢性髓原白血病细胞株; SW620: 人结肠癌细胞株; RAW 264.7: 小鼠单核/巨噬细胞系。以上细胞株均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.1.2 主要试剂

细菌脂多糖(Inositol and lipopolysaccharide, LPS)和 5-氟尿嘧啶[5-Fluoro-2,4 (1H, 3H)-pyrimidinedione, 5-Fu]购自美国 Sigma 公司; Alamar Blue Assay Kit 购自美国 Biosource 公司; RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、L-15 培养基、0.25% 胰蛋白酶、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)、磷酸缓冲盐溶液(Phosphate buffered saline, PBS)购自美国 Gibco 公司; 青霉素和链霉素购自美国 Amresco 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

RPMI 1640、DMEM 及 L-15 完全培养基配制和 Griess 试剂配制参照文献^[12-13]进行。

1.1.3 主要仪器

高效液相色谱(Waters 2996 型二极管阵列检测器)、示差折光检测器, 美国 Waters 公司; 多功能倒置荧光显微镜, 日本 Olympus 公司; 多功能酶标仪, 美国 Bio-Tek 公司; 二氧化碳培养箱、超低温冰箱, 美国 Thermo Forma 公司; 细胞计数仪, 美国 Beckman-Coulter 公司; 台式高速大容量离心机, 德国 Eppendorf 公司; 旋转蒸发仪, 德国 BüCHI 公司; 电热恒温水浴锅, 上海一恒科学仪器有限公司; 超声清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灵芝醇提物的制备

精密称取层迭灵芝和赤芝各 10 g, 加入 200 mL 95% 乙醇超声提取 1 h, 过滤, 滤液减压浓缩, 备用。

1.2.2 灵芝水提物的制备

精密称取层迭灵芝和赤芝各 10 g, 加入 85% 乙醇 200 mL 超声提取 3 次, 每次 1 h, 倾出上清液, 滤渣继续加入 200 mL 超纯水 100 °C 水浴 2 h, 过滤, 滤液真空冷冻干燥, 备用。

1.2.3 醇提物中三萜含量测定

参考《中华人民共和国药典》2015 版方法用香草醛-冰醋酸法测定各醇提物中的三萜含量。

1.2.4 水提物中多糖含量测定

参照 NY/T 1676-2008 《食用菌中多糖含量的测定》方法用苯酚-硫酸法测定各水提物中的多糖含量。

1.2.5 三萜液相分析

采用高效液相分析系统分析醇提物中三萜类化合物。色谱柱为: Agilent Zorbax SB-Aq (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 保护柱: Agilent Zorbax SB-Aq (20 mm×4 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.01% 冰醋酸-水溶液, B 为乙腈; 流速: 1.0 mL/min; 进样 10 μL; 梯度洗脱程序: (0-20 min, A: 72%-68%; 20-50 min, A: 68%-61%; 50-60 min, A: 61%-40%; 60-85 min, A: 40%-0; 85-100 min,

A: 0)。柱温: 25 °C; 检测波长: 252 nm。

1.2.6 多糖液相分析

采用高效凝胶尺寸排阻色谱-多角度激光光散射仪-示差折光检测仪 (High-performance size exclusion chromatography-multi-angle laser light scattering-refractive index detector, HPSEC-MALLS-RI) 联用分析多糖重均分子量分布。色谱柱为: Tosoh SK gel Multipore PW-H (6.0 mm×150 mm) 2 根联用, 其它条件参考文献[14]。

1.2.7 样品准备和细胞培养

将制备得到的醇提物和水提物分别溶于 DMSO 和 PBS 溶液, 在无菌条件下稀释成不同浓度的样品溶液, 备用。将 K562、SW620 和 RAW 264.7 细胞分别培养于 RPMI 1640、L-15 和 DMEM 完全培养基中, 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度下于培养箱内传代培养, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.8 体外测定肿瘤细胞增殖抑制率

参考文献[13]的方法进行。取对数生长期的细胞, 分别用相应的培养基将细胞稀释成 2×10⁴ 个/mL 的细胞悬液后加入 96 孔板, 每孔加入 199 μL。置于培养箱中 4 h 后加入 1 μL 不同浓度的待测样品, 每个浓度 3 个重复。阴性对照为 1 μL 的 DMSO, 阳性对照为 5-Fu (作用终浓度为 50 μg/mL), 37 °C 培养 72 h 后取出, 每孔加入 30 μL 0.1 mg/mL Alamar Blue 试剂, 继续培养 4-6 h, 分别在 570 nm 和 600 nm 波长下测定吸光度。根据 Alamar Blue 试剂公式计算各样品对肿瘤细胞的抑制率。

$$\text{细胞抑制率(\%)} = \left\{ 1 - \frac{117.216 \times A_{570}(\text{样品}) - 80.586 \times A_{600}(\text{样品})}{117.216 \times A_{570}(\text{对照}) - 80.586 \times A_{600}(\text{对照})} \right\} \times 100。$$

1.2.9 体外免疫活性测定

参考文献[15]的方法进行多糖刺激 RAW 264.7 细胞释放 NO 含量的测定。取对数生长期的 RAW 264.7 细胞, 将其稀释成 5×10⁵ 个/mL 的细胞悬液, 分别加入 96 孔板中, 每孔 180 μL。培养箱中培养 4 h 后加入 20 μL 不同浓度的待测样品, 每浓度 3 个重复。阴性对照为 PBS 溶液, 阳性对照为 LPS (作用终浓度为

1 $\mu\text{g/mL}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。分别取 100 μL 上清于 96 孔板, 每孔加入 50 μL Griess 试剂, 室温孵育 10 min 后在 543 nm 波长下测定吸光度。根据亚硝酸钠制作的标准曲线计算 NO 产生量。

2 结果与分析

2.1 化学法测定三萜含量的结果

2 种灵芝中三萜含量测定结果如表 1 所示, 赤芝中三萜含量稍高于层迭灵芝。

2.2 化学法测定多糖含量的结果

2 种灵芝中多糖含量对比如表 2 所示, 结果表明层迭灵芝中多糖含量高于赤芝。

2.3 三萜和多糖液相分析结果

2.3.1 三萜液相分析结果

层迭灵芝和赤芝中三萜类化合物的高效液相色谱图(High performance liquid chromatography, HPLC)如图 1 所示。从图 1 中可以看出, 赤芝中三萜化合物的种类较层迭灵芝丰富, 尤其在出峰时间 60 min 后弱极性的三萜类化合物, 赤芝中含有层迭灵芝中不存在的多种三萜化合物。然而, 层迭灵芝中也含有赤芝中不存在的三萜类化合物。在出峰时间 60 min 前中等极性的三萜类化合物中, 层迭灵芝中某些三萜类化合物含量明显高于赤芝。

表 1 2 种灵芝中的三萜含量

Table 1 Contents of total triterpenoids in *G. lobatum* and *G. lingzhi*

| 样品 Sample | 三萜含量 Total triterpenoids content (%) |
|------------------------|---|
| 层迭灵芝 <i>G. lobatum</i> | 1.14 \pm 0.01 |
| 赤芝 <i>G. lingzhi</i> | 1.21 \pm 0.03 |

表 2 2 种灵芝中的多糖含量

Table 2 Contents of polysaccharides in *G. lobatum* and *G. lingzhi*

| 样品 Sample | 多糖含量 Polysaccharides content (%) |
|------------------------|-------------------------------------|
| 层迭灵芝 <i>G. lobatum</i> | 3.60 \pm 0.10 |
| 赤芝 <i>G. lingzhi</i> | 2.67 \pm 0.06 |

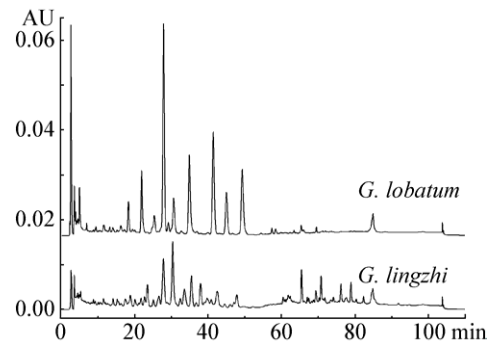


图 1 2 种灵芝醇提取物中三萜液相图

Figure 1 HPLC analysis of triterpenoids in *G. lobatum* and *G. lingzhi*

2.3.2 多糖液相分析结果

图 2 为多糖在 HPSEC 上的色谱图, 按峰将各多糖分为不同的组分。层迭灵芝和赤芝中均主要含有两种多糖组分, 且两者多糖组分主要集中在 Peak 2, 分别占多糖质量分数的 82.5%和 84.9%。层迭灵芝多糖的重均分子量较赤芝稍大, 两者 Peak 2 的分子量分别为 1.244×10^4 和 4.051×10^3 。由此可以看出两者的多糖分子量分布存在一定差异。

2.4 体外抗肿瘤活性测定结果

不同浓度的层迭灵芝和赤芝醇提取物对 K562 和 SW620 细胞抑制率见图 3 和图 4, IC₅₀ 值见表 3。结果表明, 2 种灵芝醇提取物对肿瘤细胞 K562 和 SW620 均具有一定的抑制活性, 虽然 2 种灵芝醇提取物含量有差别, 但两者对肿瘤细胞的抑制率趋势相似, 因此真正起抑制作用的物质还有待进一步研究。

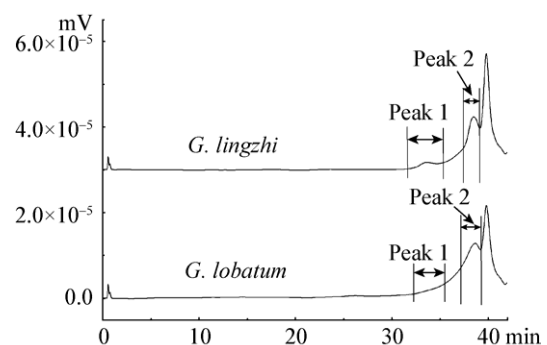


图 2 2 种灵芝水提取物中多糖 HPSEC 图谱

Figure 2 HPSEC spectra of polysaccharides in *G. lobatum* and *G. lingzhi*

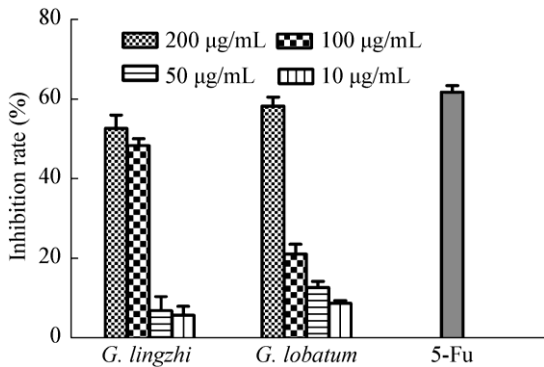


图3 2种灵芝醇提取物对K562细胞增殖的抑制作用
Figure 3 Inhibition on K562 cells' proliferation by ethanol extracts from *G. lobatum* and *G. lingzhi*

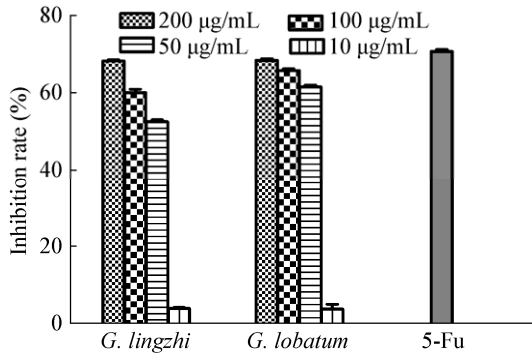


图4 2种灵芝醇提取物对SW620细胞增殖的抑制作用
Figure 4 Inhibition on SW620 cells' proliferation by ethanol extracts from *G. lobatum* and *G. lingzhi*

相同浓度的样品对不同肿瘤细胞的抑制率有较大差异, 其中层迭灵芝醇提取物对 SW620 细胞表现出较好的抑制活性, 其 IC₅₀ 值达到了 52.5 µg/mL。因此, 样品对不同肿瘤细胞的抑制活性具有一定的选择性。

2.5 体外免疫活性测定结果

不同浓度的层迭灵芝和赤芝水提取物对 RAW 264.7 细胞释放 NO 的影响见图 5。可以看出,

表3 2种灵芝醇提取物对抑制细胞增殖的 IC₅₀ 值
Table 3 IC₅₀ of inhibition to cells' proliferation by ethanol extracts from *G. lobatum* and *G. lingzhi* (µg/mL)

| 样品 Sample | 细胞 Cells | |
|------------------------|----------|-------|
| | K562 | SW620 |
| 层迭灵芝 <i>G. lobatum</i> | 174.0 | 52.5 |
| 赤芝 <i>G. lingzhi</i> | 154.5 | 162.2 |

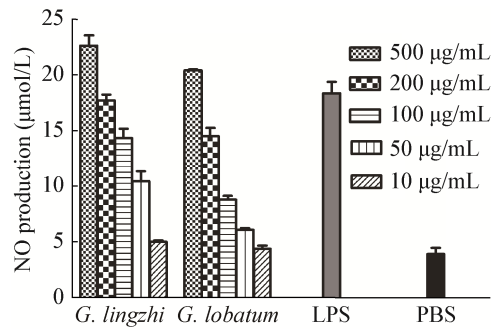


图5 2种灵芝水提取物对RAW 264.7细胞释放NO的影响
Figure 5 Effects of aqueous extracts from *G. lobatum* and *G. lingzhi* on NO production by RAW 264.7 cells

2种灵芝水提取物对 RAW 264.7 细胞释放 NO 的促进作用趋势相似, 但赤芝不同浓度水提取物的促进作用要稍强于层迭灵芝。在 2 种灵芝的最大浓度(500 µg/mL)作用下, 其 NO 的释放量达到 20 µmol/L 左右, 高于阳性对照 LPS。

3 讨论与结论

本研究首次分析了层迭灵芝中三萜和多糖两类活性物质的含量、种类以及抗肿瘤和免疫活性, 并与广泛栽培及药用的赤芝作了比较。从结果可知, 层迭灵芝子实体中含量较大的主要是中等极性的三萜化合物, 与赤芝存在一定的差异。在多糖的分布上, 2 种灵芝比较类似。药理实验证明, 层迭灵芝和赤芝的抗肿瘤活性和免疫活性趋势相似。

我国幅员辽阔, 生态环境多样, 由此使得野生灵芝资源丰富。虽然我国民间能够入药的灵芝品种远不止赤芝和紫芝 2 个物种, 但灵芝药品和保健品的开发中, 应当在充分的化学成分分析和药理实验研究基础上进行科学的验证。本研究仅初步分析了层迭灵芝中的三萜和多糖成分并验证了其体外抗肿瘤和免疫活性, 层迭灵芝的开发还需要对其三萜、多糖活性成分进行结构鉴定, 以及进一步的作用机制研究和体内活性验证。

REFERENCES

[1] Wagner R, Mitchell DA, Sasaki GL, et al. Links between

- morphology and physiology of *Ganoderma lucidum* in submerged culture for the production of exopolysaccharide[J]. Journal of Biotechnology, 2004, 114(1/2): 153-164
- [2] Mohan K, Padmanaban AM, Uthayakumar V, et al. Effect of dietary *Ganoderma lucidum*, polysaccharides on biological and physiological responses of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*[J]. Aquaculture, 2016, 464: 42-49
- [3] Wang PY, Zhu XL, Lin ZB. Antitumor and immunomodulatory effects of polysaccharides from broken-spore of *Ganoderma lucidum*[J]. Frontiers in Pharmacology, 2012, 3: 135
- [4] Li YB, Wang JL, Zhong JJ. Enhanced recovery of four antitumor ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* mycelia by a novel process of simultaneous extraction and hydrolysis[J]. Process Biochemistry, 2013, 48(2): 331-339
- [5] Wu XL, Dai YC, Lin YH. Study on the *Ganodermataceae* of China I[J]. Guizhou Science, 2004, 22(2): 27-33,54 (in Chinese)
吴兴亮, 戴玉成, 林尤河. 中国灵芝科资源及其地理分布 I [J]. 贵州科学, 2004, 22(2): 27-33,54
- [6] Wu XL, Dai YC, Lin YH. Study on the *Ganodermataceae* of China II[J]. Guizhou Science, 2004, 22(3): 34-37,53 (in Chinese)
吴兴亮, 戴玉成, 林尤河. 中国灵芝科资源及其地理分布 II [J]. 贵州科学, 2004, 22(3): 34-37,53
- [7] Wu XL, Dai YC, Lin YH. Study on the *Ganodermataceae* of China III[J]. Guizhou Science, 2004, 22(4): 36-40 (in Chinese)
吴兴亮, 戴玉成, 林尤河. 中国灵芝科资源及其地理分布 III [J]. 贵州科学, 2004, 22(4): 36-40
- [8] Pharmacopoeia Commission of PRC. Pharmacopoeis of the People's Republic of China, vol. I[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 188-189 (in Chinese)
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, 2015: 188-189
- [9] Chen RY, Kang J. Chinese Edible Medicinal Fungal Chemistry[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Literature Publishing House, 2016: 92-212,317-328 (in Chinese)
陈若芸, 康洁. 中国食用药用真菌化学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2016: 92-212,317-328
- [10] Yuan MS, Sun PQ. Chinese Mushroom Primary Color Map[M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2007: 1-552 (in Chinese)
袁明生, 孙佩琼. 中国蕈菌原色图集[M]. 成都: 四川科技出版社, 2007: 1-552
- [11] Huang NL. China's Large-Scale Fungal Primary Color Map[M]. Beijing: Agricultural Publishing House, 1998: 93-98 (in Chinese)
黄年来. 中国大型真菌原色图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 93-98
- [12] Feng N, Zhang JS, Tang CH, et al. Effect of aqueous extracts from *Ganoderma* fruit bodies harvested at different stages of development on nitric oxide production by RAW 264. 7 cells[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(4): 52-57 (in Chinese)
冯娜, 张劲松, 唐传红, 等. 不同生育期灵芝子实体水提取物与其免疫活性[J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 52-57
- [13] Feng N, Zhang JS, Tang QJ, et al. Steroids from fruiting bodies of *Coprinus comatus* and their inhibition to tumor cell proliferation[J]. Mycosystema, 2010, 29(2): 249-253 (in Chinese)
冯娜, 张劲松, 唐庆九, 等. 毛头鬼伞子实体中甾类化合物的结构鉴定及其抑制肿瘤细胞增殖活性的研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 249-253
- [14] Liu YF, Zhao Y, Yang Y, et al. Structural characteristics and hypoglycemic activity of polysaccharides from *Coprinus comatus*[J]. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 2013, 2(2): 164-169
- [15] Qiao YR, Luo YH, Zhou S, et al. Isolation and purification of GFP75-2-2B, a polysaccharide from *Grifola frondosa* fruit bodies, and its effect on nitric oxide release from macrophages[J]. Acta Edulis Fungi, 2010, 17(4): 48-51 (in Chinese)
乔彦茹, 罗永煌, 周帅, 等. 灰树花多糖 GFP75-2-2B 的分离及其对刺激巨噬细胞释放 NO 的影响[J]. 食用菌学报, 2010, 17(4): 48-51