

网络出版时间:2014-05-28 11:34

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.06.016

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.06.016.html

灵芝多糖的提取纯化及其免疫活性

张丽霞¹,张雅君²,张丽萍³

(1 大庆师范学院 生命科学学院,黑龙江 大庆 163712;2 仲恺农业工程学院 生命科学学院,广东 广州 510225;

3 东北师范大学 生命科学学院,吉林 长春 130024)

[摘要] **【目的】**从灵芝孢子粉中提取纯化多糖,研究灵芝多糖对小鼠细胞免疫功能的影响,为灵芝开发利用提供试验依据。**【方法】**利用水煮醇沉法从灵芝孢子粉中提取粗多糖,经反复冻融、Sevag 法脱蛋白和 Sepharose CL-6B 柱层析,纯化得灵芝多糖(GLP)。通过 HPLC 鉴定 GLP 的纯度,G.C. 分析其单糖组成。采用 MTT 法、中性红试验、Griess 法、比色法和 ELISA 法,分别检测 GLP 对小鼠脾淋巴细胞增殖、腹腔巨噬细胞吞噬功能、NO 产量和 iNOS 活性以及 TNF- α 产量的影响。**【结果】**GLP 为白色粉末,分子质量为 51 ku,HPLC 分析 GLP 为单一狭窄对称峰,其单糖组成为葡萄糖(Glc)和半乳糖(Gal),二者物质的量之比为 16.8 : 1。GLP 能够刺激小鼠 T 淋巴细胞增殖,并呈现剂量依赖关系;当 GLP 质量浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,能显著增强腹腔巨噬细胞的吞噬能力,提高其分泌 iNOS 的活力和 NO 的生产量;同时,当 GLP 质量浓度 $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ 时,能显著促进腹腔巨噬细胞分泌 TNF- α 的能力,具有剂量依赖性。**【结论】**GLP 能够增强小鼠免疫细胞活性,有望成为重要的生物免疫调节剂。

[关键词] 灵芝多糖;脾淋巴细胞;腹腔巨噬细胞;免疫调节

[中图分类号] S567.3⁺1;Q539

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)06-0168-05

Extraction and purification of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* and its immunological activities

ZHANG Li-xia¹,ZHANG Ya-jun²,ZHANG Li-ping³

(1 Department of Life Science,Daqing Normal University,Daqing,Heilongjiang 163712,China;

2 College of Life Sciences,Zhongkai University of Agriculture and Engineering,Guangzhou,Guangdong 510225,China;

3 School of Life Science,Northeast Normal University,Changchun,Jilin 130024,China)

Abstract: **【Objective】**This study focused on extraction and purification of polysaccharide from *Ganoderma lucidum* spore powder and its effects on cell immunity of mice,to improve the development and utilization of *Ganoderma lucidum*. **【Method】**Water boiling and ethanol method was used to extract polysaccharide from *Ganoderma lucidum* spore powder,and *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP) was obtained after repeated freezing and thawing,Sevag protein removal,Sepharose CL-6B column chromatography,and purification. The purity was identified by HPLC,and its monosaccharide composition was analyzed by GC. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on spleen lymphocyte proliferation,phagocytosis of peritoneal macrophages,NO production,iNOS activity and TNF- α yield were detected by MTT,neutral red test,Griess method,colorimetric method,and ELISA method,respectively. **【Result】**Obtained GLP was white powder with molecular weight of 51 ku. HPLC analysis showed it had a single narrow symmetrical peak.

[收稿日期] 2013-05-10

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金项目(C201227);大庆师范学院博士启动基金项目(11NR16)

[作者简介] 张丽霞(1972—),女,黑龙江绥化人,副教授,博士,主要从事多糖结构与生物活性研究。

E-mail:zhanglx573@aliyun.com

[通信作者] 张丽萍(1942—),女,吉林吉林市人,教授,硕士,主要从事多糖生化研究。E-mail:zhanglp626@aliyun.com

GLP consisted of glucose (Glc) and galactose (Gal) with a molar ratio of 16.8 : 1. GLP stimulated the proliferation of T lymphocyte in mice with dose dependent relationship. When the concentration of GLP reached 100 $\mu\text{g/mL}$, the phagocytic activity of peritoneal macrophage was significantly enhanced, and iNOS production activity of peritoneal macrophage and NO production were improved. When GLP mass concentration was larger than 200 $\mu\text{g/mL}$, TNF- α secretion ability of macrophage was significantly promoted with dose-dependent relationship. 【Conclusion】 *Ganoderma lucidum* polysaccharide could enhance the activity of immune cells in mice, and act as an important biological immune regulator.

Key words: *Ganoderma lucidum* polysaccharide; lymphocyte; macrophage; immune-regulation

药用真菌多糖是从真菌子实体、菌丝体、发酵液中分离出来的一种多糖^[1-2],具有调节免疫^[3-4]、抗肿瘤^[5]、抗病毒^[6]、抗衰老^[7]、抗放射^[8]、抗凝血^[9]等多种药理活性,是公认的安全低毒活性物质。大量研究证明,真菌多糖不仅能够激活小鼠脾淋巴细胞、腹腔巨噬细胞和自然杀伤细胞等免疫细胞,还能活化补体,促进细胞因子的生成,对免疫系统具有多途径、多层面的调节作用^[10]。真菌多糖作为良好的药物资源,已成为继蛋白质和核酸之后的又一科学研究热点^[11]。

灵芝古称瑞草,隶属于担子菌亚门层菌纲非褶菌目灵芝菌科灵芝属^[12],是我国传统的补益中药,具有扶正固本、延年益寿之功效^[13]。目前,有关灵芝孢子粉纯多糖的免疫调节作用研究还未见报道。为此,本研究以灵芝孢子粉为试验材料,提取灵芝水溶性粗多糖,分离纯化后对其理化性质及免疫活性进行研究,以期对灵芝多糖的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

灵芝孢子粉购自辽宁百发生物制品有限公司。ICR 雄性小鼠,体质量(20.0 $\pm$ 2.0) g/只,购于吉林大学药理学实验中心,自由进食。

Sephacrose CL-6B, Pharmacia Biotech 公司生产;MTT、脂多糖(LPS)、刀豆蛋白 A (ConA), Sigma 公司产品;中性红, Amersco 公司产品;RP-MI1640 培养基, Gibco 公司产品;新生牛血清, 杭州四季青公司产品;Mouse TNF-alpha ELISA Kit, ADI 公司产品;iNOS 测定试剂盒,南京建成生物工程研究所生产;其余化学试剂均为国产分析纯试剂。

超低温冰箱、二氧化碳培养箱, SANYO Electric Company 公司生产;高效液相色谱仪, 日本岛津苏州公司生产;Varian 3400 气相色谱仪, 美国 Varian 公司生产;医用型洁净工作台, 北京东联哈尔仪器制造有限公司产品;酶标仪, Bio-RAD 公司生产;

倒置显微镜, IXTO OLYMPUS 公司生产。

1.2 试验方法

1.2.1 灵芝多糖的提取与纯化 称取灵芝孢子粉 1 000 g, 经石油醚(60~90 $^{\circ}\text{C}$)回流脱脂后,再用体积分数 70% 甲醇抽提 20 h, 抽滤。将残渣加蒸馏水浸泡过夜,沸水煮沸 3 次, 1 h/次,离心(4 000 r/min, 15 min),合并 3 次煮提滤液,减压浓缩至 200 mL,加 3 倍体积的体积分数 95% 乙醇醇析过夜,离心(4 000 r/min, 15 min),常规干燥得灵芝粗多糖。

将灵芝粗多糖配成质量分数为 5% 的溶液,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻过夜,室温缓慢融化,高速冷冻离心(8 000 r/min, 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$),重复此操作 5 次,直至无沉淀产生。采用 Sevag 法^[14]对样品脱蛋白,重复多次,至无游离蛋白为止。通过 Sepharose CL-6B 柱层析(1.5 cm $\times$ 100 cm)对样品进行分析,用质量分数 0.9% 氯化钠溶液洗脱,自动部分收集器收集,酚-硫酸法^[15]检测糖的分布。

采用 Separose CL-6B 柱(2.5 cm $\times$ 90 cm)层析制备灵芝多糖,用质量分数 0.9% 的 NaCl 溶液进行洗脱,收集糖峰洗脱液,依次进行流水逆向透析(24 h)和蒸馏水透析(24 h, 每 4 h 换蒸馏水 1 次)脱盐,然后水浴(80 $^{\circ}\text{C}$)浓缩,冻干过夜,即得纯化的灵芝多糖(GLP)。

1.2.2 GLP 相对分子质量的测定及组成分析 精确称取 3 mg GLP 溶于 1 mL 质量分数 0.7% 硫酸钠溶液中,超声波处理 5 min,过滤后进行高效液相色谱(HPLC)分析(洗脱液流速 0.6 mL/min)。采用气相色谱法(G. C.)^[16]测定 GLP 糖组成。

1.2.3 GLP 的免疫活性 (1)GLP 对脾淋巴细胞体外增殖的影响。参考文献[17]制备小鼠脾淋巴细胞悬液。将脾淋巴细胞悬液加入 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL ,设空白对照(CK)孔、ConA(5 $\mu\text{g/mL}$)对照孔、LPS(10 $\mu\text{g/mL}$)对照孔、待测糖液(质量浓度为 50, 100, 200 和 400 $\mu\text{g/mL}$)孔、待测糖液(质量浓度为 50, 100, 200 和 400 $\mu\text{g/mL}$) + 5

$\mu\text{g/mL}$ ConA $50\ \mu\text{L}$ 孔和待测糖液(质量浓度为 50, 100, 200 和 $400\ \mu\text{g/mL}$) + $10\ \mu\text{g/mL}$ LPS $50\ \mu\text{L}$ 孔, 每孔总体积为 $200\ \mu\text{L}$, 混匀后放入 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 72 h, 培养结束前 4 h, 每孔加入 MTT 液($5\ \text{mg/mL}$) $20\ \mu\text{L}$, 培养结束时每孔弃去 $100\ \mu\text{L}$ 上清, 加入 $150\ \mu\text{L}$ 二甲基亚砜, 用酶标仪在 $570\ \text{nm}$ 处检测其吸光度(OD_{570}), 每处理设 3 个重复孔。

(2) GLP 对腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响。参考文献[17]制备小鼠腹腔巨噬细胞。将纯化后的腹腔巨噬细胞加入 96 孔细胞培养板中, 同时加入质量浓度为 50, 100, 200 和 $400\ \mu\text{g/mL}$ 待测糖液($200\ \mu\text{L}/\text{孔}$), 同时设空白对照、LPS($20\ \mu\text{g/mL}$) 阳性对照, 培养 24 h 后吸去上清, 每孔加入 $100\ \mu\text{L}$ 质量分数为 0.075% 的中性红溶液, 继续培养 1 h, 用 PBS ($\text{pH}7.4$) 洗去剩余的中性红后, 加入 $100\ \mu\text{L}$ 的细胞裂解液($V(\text{乙醇}):V(\text{乙酸})=1:1$), 24 h 后用酶标仪在波长 $550\ \text{nm}$ 处检测其吸光度(OD_{550})。

(3) GLP 对腹腔巨噬细胞产生 NO 的影响。精确称取 NaNO_2 $69.0\ \text{mg}$, 加蒸馏水溶解定容至 $1\ \text{L}$, 配制成为 $1\ \text{mmol/L}$ NaNO_2 溶液备用。用移液管分别吸取 1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2 和 $0.1\ \text{mL}$ NaNO_2 溶液于 $10\ \text{mL}$ 离心管中, 补加水至 $10\ \text{mL}$ 。取上述各溶液 $100\ \mu\text{L}$, 加入 96 孔酶标板中, 加入等体积的 Griess 试剂, 10 min 后用酶标仪于波长 $540\ \text{nm}$ 处检测。以 NaNO_2 浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线。

纯化腹腔巨噬细胞, 以 $2\times 10^6\ \text{mL}^{-1}$ 加入 24 孔板中, 同时设空白对照和 LPS($20\ \mu\text{g/mL}$) 阳性对照, 加入质量浓度为 50, 100, 200 和 $400\ \mu\text{g/mL}$ 的待测糖液培养 24 h 后, 吸取细胞培养上清液($100\ \mu\text{L}$) 转移至另一培养板中, 并加入等体积的 Griess 试剂, 10 min 后于波长 $540\ \text{nm}$ 处用酶标仪检测, 根据 NaNO_2 标准曲线, 计算 NO 的产量。

(4) GLP 对腹腔巨噬细胞诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性的影响。取 $100\ \mu\text{L}$ 腹腔巨噬细胞培养上清液, 通过比色法测 iNOS 的酶活力, 具体操作按照 iNOS 试剂盒说明进行。同时设 $20\ \mu\text{g/mL}$ 的 LPS 为阳性对照组。

(5) GLP 对腹腔巨噬细胞产肿瘤坏死因子($\text{TNF-}\alpha$)的影响。将纯化的腹腔巨噬细胞以 $2\times 10^6\ \text{mL}^{-1}$ 加入 24 孔板中, 加质量浓度为 50, 100, 200 和 $400\ \mu\text{g/mL}$ 待测糖液培养 24 h 后, 吸取细胞培养液上清 $100\ \mu\text{L}$, 用 ELISA 试剂盒检测 $\text{TNF-}\alpha$ 。同时设 $20\ \mu\text{g/mL}$ 的 LPS 为阳性对照组。

1.3 数据统计分析

试验数据以“平均值 $\pm$ 标准差”表示; 对数据进行单因素方差分析, $P<0.05$ 表示有显著差异, $P<0.01$ 表示有极显著差异。

2 结果与分析

2.1 灵芝多糖的提取纯化及其理化性质

从 $1\ 000\ \text{g}$ 灵芝孢子粉中获得 $6.6\ \text{g}$ 水溶性粗多糖, 纯化后得 GLP, 通过 HPLC 检查其纯度发现, GLP 为单一狭窄对称峰, 确定其可以用于后续活性试验。GLP 为白色粉末, 易溶于水, 相对分子质量为 $5.1\ \text{ku}$, 糖含量为 89.4% 。气相色谱分析结果(图 1)表明, GLP 的单糖组成为葡萄糖(Glc)和半乳糖(Gal), 其物质的量比为 $16.8:1.0$ 。

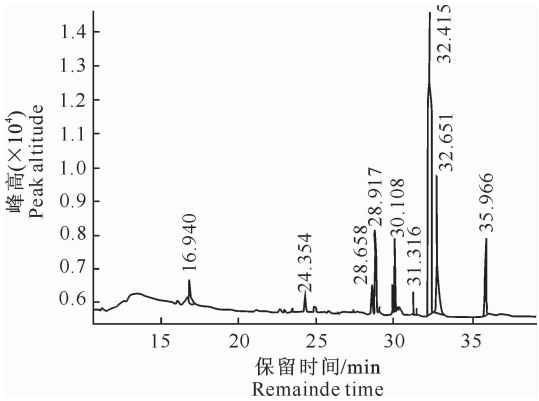


图 1 灵芝多糖的气相色谱图

Fig. 1 G. C. of *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP)

2.2 GLP 对脾淋巴细胞体外增殖的影响

GLP 对脾淋巴细胞的促增殖作用见图 2。

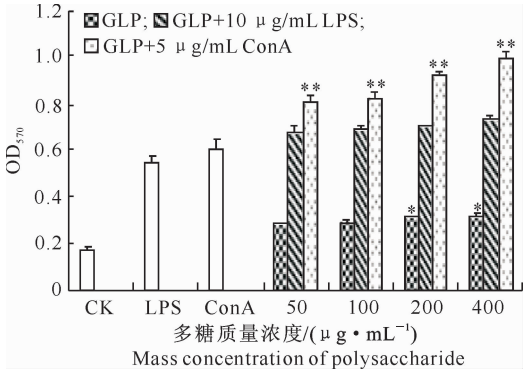


图 2 灵芝多糖对脾淋巴细胞体外增殖的影响

“*”表示与其相应对照差异显著($P<0.05$); “**”表示与其相应对照差异极显著($P<0.01$)。下同

Fig. 2 Effect of GLP on lymphocyte proliferation
“*” represents significant difference compared to the control ($P<0.05$); “**” indicates extremely significant difference compared to the control ($P<0.01$), The same below

由图2可知,50~400 $\mu\text{g/mL}$ GLP单独作用时,能不同程度地促进脾淋巴细胞增殖,且与CK相比,差异达显著水平($P<0.05$)。GLP能促进ConA诱导的T淋巴细胞的增殖,不能促进LPS诱导的B淋巴细胞的增殖;与ConA对照相比,50~400 $\mu\text{g/mL}$ GLP与ConA协同作用效果均达到极显著水平($P<0.01$),并具有剂量依赖性。

2.3 GLP对腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

将小鼠腹腔巨噬细胞和不同质量浓度的GLP(50~400 $\mu\text{g/mL}$)加入到96孔细胞培养板中培养24 h,结果(图3)表明,GLP能够激活腹腔巨噬细胞,增强其吞噬功能。当GLP的质量浓度为50~100 $\mu\text{g/mL}$ 时,可显著促进腹腔巨噬细胞的吞噬功能;当其质量浓度为200~400 $\mu\text{g/mL}$ 时,可极显著

促进腹腔巨噬细胞的吞噬功能;GLP质量浓度为50~400 $\mu\text{g/mL}$ 时,其对腹腔巨噬细胞吞噬功能的促进作用与LPS差异未达到显著水平。

2.4 GLP对腹腔巨噬细胞NO产量及iNOS活性的影响

根据Griess法,得到 $\text{OD}_{540}(y)$ 与 NaNO_2 质量浓度(x)的标准方程为: $y=0.0548x+0.0717$ 。测定样品的 OD_{540} 值,通过标准方程计算NO的产量,结果(图4)表明,GLP质量浓度 ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,能显著或极显著增强腹腔巨噬细胞产生NO的能力;当GLP质量浓度为400 $\mu\text{g/mL}$ 时,腹腔巨噬细胞产生的NO量最高,接近于阳性对照组(LPS,20 $\mu\text{g/mL}$)。

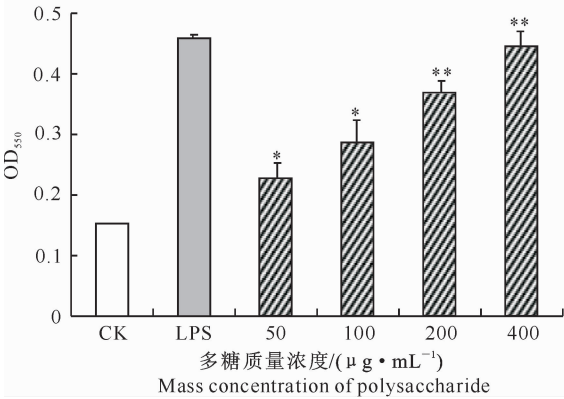


图3 灵芝多糖对腹腔巨噬细胞吞噬作用的影响
Fig.3 Effect of GLP on phagocytosis of macrophages

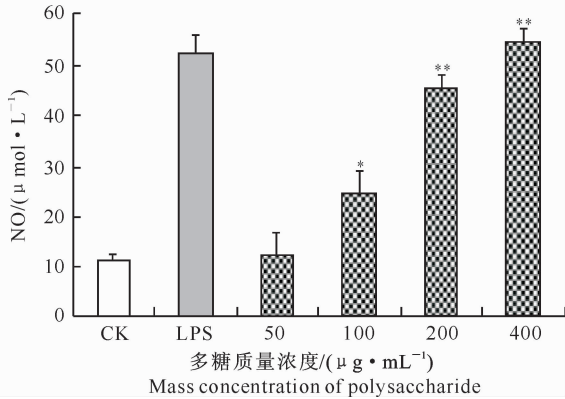


图4 灵芝多糖对腹腔巨噬细胞NO产量的影响
Fig.4 Effect of GLP on NO production induced by macrophages

由图5可知,GLP质量浓度 ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,能显著或极显著增强腹腔巨噬细胞分泌iNOS的活力;当GLP质量浓度为400 $\mu\text{g/mL}$ 时,腹腔巨噬细胞分泌iNOS的活力最高,但仍低于LPS(20

$\mu\text{g/mL}$)阳性对照组。

2.5 GLP对腹腔巨噬细胞产生TNF- α 的影响

灵芝多糖对腹腔巨噬细胞产生TNF- α 的影响结果见图6。

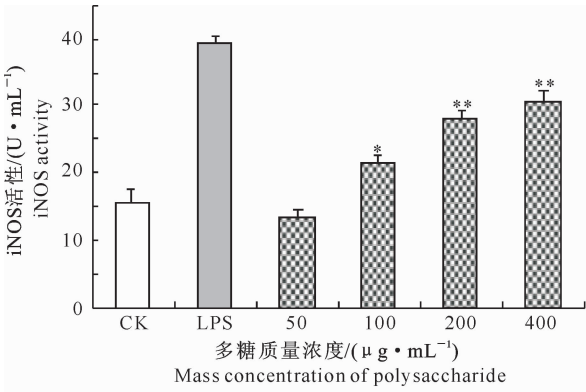


图5 灵芝多糖对腹腔巨噬细胞iNOS活性的影响
Fig.5 Effect of GLP on iNOS activity

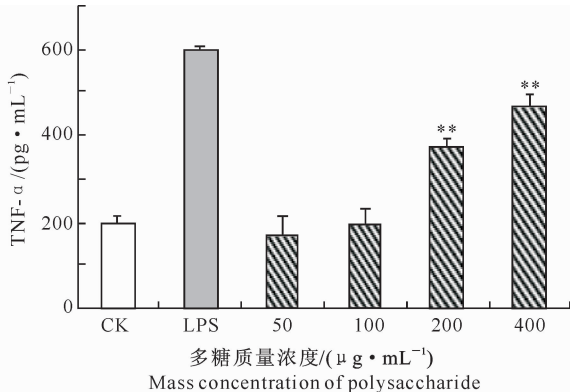


图6 灵芝多糖对腹腔巨噬细胞产生TNF- α 的影响
Fig.6 Effect of GLP on TNF- α production induced by macrophages

腹腔巨噬细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 是机体免疫反应和杀伤肿瘤细胞的关键调节因子。GLP 对腹腔巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$ 的影响结果(图 6)表明,当 GLP 质量浓度 $\geq 200 \mu\text{g/mL}$ 时,腹腔巨噬细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 与 CK 相比极显著增加($P < 0.01$);当 GLP 质量浓度为 $400 \mu\text{g/mL}$ 时,腹腔巨噬细胞产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 最多,但仍低于 LPS($20 \mu\text{g/mL}$)阳性对照组。

3 讨 论

真菌多糖作为重要的生物应答调节剂,对机体的先天免疫系统具有重要的调节作用。脾脏是淋巴细胞定居和接受抗原刺激产生免疫应答的重要场所。活化的腹腔巨噬细胞吞噬功能明显增强,还能够释放 $\text{TNF-}\alpha$ 、NO 等细胞因子。诱导型 iNOS 的合成是对腹腔巨噬细胞产生特异性免疫的应答反应。大量的研究表明,真菌多糖不仅能够激活 T、B 淋巴细胞、腹腔巨噬细胞等免疫细胞,还能促进细胞因子的生成,对免疫系统发挥多方面的作用。本试验结果表明,从灵芝孢子粉中提取纯化的活性物质灵芝多糖,能够促进 T 淋巴细胞的增殖,显著增强腹腔巨噬细胞的吞噬功能,提高其分泌 iNOS 的活力和 NO 的生产量;同时还能促进腹腔巨噬细胞产生 $\text{TNF-}\alpha$,这可能是灵芝多糖增强机体免疫力的重要机制之一。灵芝多糖的免疫活性与其单糖组成、糖苷键类型、分子质量大小、分子结构等都有密切关系,为了阐明灵芝多糖的免疫调节机制,还需对其构效关系进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Moradali M F, Mostafavi H, Ghods S, et al. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) [J]. International Immunopharmacology, 2007, 14(1): 701-724.
- [2] Wasser S P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 60: 258-274.
- [3] Chen C M, Cheng J L, Chang W T, et al. Polysaccharides of *Ganoderma lucidum* alter cell immunophenotypic expression and enhance $\text{CD56} + \text{NK-cell}$ cytotoxicity in cord blood [J]. Bioorg Med Chem, 2004, 12: 5603-5609.
- [4] Li W D, Ren L S, Lin Z B. Antitumor activity and immunopharmacological effects of Linglong liquidum extractum (LLE) [J]. Chin J New Drug, 2002, 11: 928-931.
- [5] Liu J J, Huang T S, Hsu M L, et al. Antitumor effects of the partially purified polysaccharides from *Antrodia camphorata* and the mechanism of its action [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 201: 186-193.
- [6] Xu H, Lee S H, Lee S F. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris* [J]. Antiviral Research, 1999, 44: 43-54.
- [7] Cui Y, Kim D S, Park K C. Antioxidant effect of *Inonotus obliquus* [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2005, 96: 79-85.
- [8] Wang Y Y, Khoo K H, Chen S T, et al. Studies on the immunomodulating and antitumor activities of *Ganoderma lucidum* (Reishi) polysaccharides: Functional and proteomic analyses of a fucosecontaining glycoprotein fraction responsible for the activities [J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10: 1057-1062.
- [9] Lee I K, Seok S J, Kim W K, et al. Hispidin derivatives from the mushroom *Inonotus xeranticus* and their antioxidant activity [J]. Journal of Natural Products, 2006, 69: 299-301.
- [10] Leiro J M, Castro R, Arranz J A, et al. Immunomodulating activities of acidic sulphated polysaccharides obtained from the seaweed *Ulva rigida* C. Agardh [J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7: 879-888.
- [11] Lee J H. Anti-tumor and immunostimulating activity of fungal polysaccharide [J]. Industrial Microorgan, 1994, 20: 14-21.
- [12] Shao B M, Dai H, Xu W, et al. Immune receptors for polysaccharides from *Ganoderma lucidum* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 323: 133-141.
- [13] Cao L Z, Lin Z B. Regulation on maturation and function of dendritic cells by *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. Immunol Lett, 2002, 83: 163-169.
- [14] Zhang Y J, Zhang L X, Yang J F, et al. Structure of investigation of water soluble polysaccharide CPPS3 isolated from the *Codonopsis pilosula* [J]. Fitoterapia, 2010, 81: 157-161.
- [15] Oades J M. Gas-liquid chromatography of alditol acetates and its application to the analysis of sugars in complex hydrolysates [J]. J Chromatogr, 1967, 28: 246-252.
- [16] Zhang L X, Zhang Y J, Zhang L P. Structure and immunological activity of a novel polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum* [J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(53): 10923-10929.
- [17] Zhang L X, Fan C, Liu S C, et al. Chemical composition and antitumor activity of polysaccharide from *Inonotus obliquus* [J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2011, 5(7): 1251-1260.