

· 综述 ·

## 灵芝多糖的研究进展

向俊宇<sup>1</sup>, 徐安<sup>1</sup>, 夏懋<sup>1</sup>, 周婷婷<sup>2,3</sup>, 范国荣<sup>2,3</sup> (1. 第二军医大学生物技术本科 2008级, 上海 200433; 2. 第二军医大学药学院药物分析学教研室, 上海 200433; 3. 上海市药物(中药)代谢重点实验室, 上海 200433)

**[摘要]** 灵芝多糖是灵芝中的一种重要活性物质, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老以及活血化瘀等多种生物活性。灵芝多糖已成为目前研究的一大热点, 具有很大的开发利用价值。本文综述了目前在灵芝多糖提取、分离纯化、含量测定、结构分析和生物活性方面的研究情况, 并对灵芝多糖的发展利用前景做了展望。

**[关键词]** 灵芝多糖; 含量测定; 结构分析; 生物活性

**[中图分类号]** R28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2010)04-0241-04

## Progress on research of ganoderma polysaccharides

XIANG Jun-yu<sup>1</sup>, XU An<sup>1</sup>, XIA Mao<sup>1</sup>, ZHOU Ting-ting<sup>2,3</sup>, FAN Guo-rong<sup>2,3</sup> (1. Biological Technology 2008, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** Ganoderma polysaccharides (GP) contain active substances with remarkable bioactivities such as immunoregulation, anticancer, anti-oxidant, anti-aging and promoting blood circulation by removing blood stasis. Their recent research progress is of great significance and be paid more and more attention. The progress on extraction, isolation and purification, structural analysis and biological activity of GP were summarized and the development prospects were forecasted in this paper.

**[Key words]** Ganoderma lucidum polysaccharides; assay; structural analysis; biological activity

灵芝 *Ganoderma lucidum* 具有很高的药用价值。灵芝中所含的活性物质有多糖类、核苷类、氨基酸蛋白质类、三萜类、呋喃类、生物碱类、油脂类、甾醇类、有机锗、无机离子等。灵芝多糖 (Ganoderma polysaccharides, GP) 是灵芝中一类主要的活性成分<sup>[1,2]</sup>, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗衰老以及活血化瘀等广泛的药理活性, 因此灵芝多糖也是目前灵芝研究的一个热点。本文就近年来灵芝多糖的制备与测定方法以及结构分析、生物活性研究的新进展作一综述。

### 1 灵芝多糖的制备

灵芝多糖既存在于灵芝子实体、孢子和发酵产生的菌丝体内, 即胞内多糖; 也存在于细胞外发酵液中, 即胞外多糖。目前对于灵芝多糖的制备过程的研究主要包括提取方法 (包括原料的预处理)、分离纯化和纯度鉴定。

#### 1.1 灵芝多糖的提取方法 针对不同的多糖来源,

目前灵芝多糖的提取方法主要是传统的水提醇沉法, 此外还有膜分离法、酶解法、超声提取方法、微波提取方法等。

传统的灵芝多糖提取方法耗时长, 而且提取率较低, 而超声提取方法以其加热快速、回收率高、容易控温等优点逐渐受到人们的重视。目前已有多组实验利用超声波法及正交实验法对灵芝多糖的提取工艺进行了研究, 对超声时间、超声功率、提取温度、水提时间等影响因素进行了考察, 确定了最佳的提取条件<sup>[3-5]</sup>, 为灵芝多糖的提取提供了一定的参考。干伟伟等<sup>[6]</sup>则用 Box-Behnken Design 设计研究了提取温度等自变量及它们的交互作用对多糖提取率的影响。利用 SAS 和响应面分析相结合的方法, 模拟得到回归方程的预测模型, 确定了灵芝孢子粉多糖提取的最佳条件, 对提取工艺进行了优化。

除了超声波提取法外, 一些方法也被应用于辅助提取灵芝多糖。靳丹虹等<sup>[7]</sup>对分别用索氏、超声波、微波三种方法提取的灵芝多糖含量进行了比较, 发现微波提取法最省时, 提取率最高, 可用于灵芝多糖的工业化提取。周明等<sup>[8]</sup>则采用超声波-微波协同的方法萃取灵芝子实体中的多糖, 并对提取时间

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30801541)。

**[作者简介]** 向俊宇 (1990-), 男, 第二军医大学生物技术本科 2008 级。E-mail: xjyheio@sina.com

**[通讯作者]** 周婷婷。E-mail: ting0618@tom.com

和料液比等因素对灵芝多糖提取率的影响进行了研究。发现超声波-微波协同萃取法比热水提取方法节省提取时间,多糖提取效率更高。目前一些新的专利技术,如真空气流植物细胞破壁技术<sup>[9]</sup>等,也同样开始受人关注。

多糖的提取技术在不断完善和更新。目前已建立动态模型并将之应用到灵芝发酵液的胞外多糖提取中,对胞外多糖的生产具有现实指导意义<sup>[10]</sup>。针对不同的提取方向和需求选择合适的提取方法,才有助于我们进行灵芝多糖的研究和生产。

**1.2 灵芝多糖的分离纯化与纯度测定** 通过有机溶剂沉淀得到的多糖粗品中,有低聚糖、蛋白质和色素等杂质须除去。低聚糖可通过透析或超滤的方法除去。用活性炭吸附、20%过氧化氢溶液即可除去色素,但采用活性炭吸附法耗时长,多糖损失量大;采用双氧水氧化法可能破坏多糖的生物活性。曹鹏伟等<sup>[11]</sup>研究了 D392 阴离子交换树脂对色素静态吸附行为和热力学性质,发现其对色素的吸附等温线更符合 Freundlich 模型,且静态吸附速率曲线符合 Lagergerm 一级速率方程,吸附速率受颗粒内扩散和膜扩散的共同控制,为这一新方法的应用提供了参考。对于蛋白质的除去,虽然较常用的方法是单一的 Sevag 法。但此方法需反复处理导致劳动强度大,目前正逐渐被更简便、处理效果更好的蛋白酶与 Sevag 结合法以及三氯乙酸法所替代<sup>[12]</sup>。

除杂质后的多糖混合物就需要分离来进一步纯化。方法包括柱层析法、沉淀法、离子交换分级法、超滤分级法等。其中较常用的是柱层析法,利用 DEAE 纤维素柱和 Sephadex 型柱层析即可得多糖纯品。

所得多糖的纯度测定方法有超离心法、电泳法、高效凝胶渗透色谱法、光谱法、测旋光度法等。其中高效凝胶渗透色谱法和电泳法中的玻璃纤维纸高压电泳法则是目前使用较多的两种方法。

## 2 灵芝多糖的含量测定

测定灵芝多糖含量的方法很多,但相关研究缺乏一个统一的控制标准。测量方法包括紫外分光光度法、容量滴定法等。由于紫外分光光度法方便快捷而目前被广泛运用。李坚等<sup>[13]</sup>用分光光度法测定灵芝中多糖的含量,证明该方法有操作简便快速,灵敏度高和重复性好等优点。分光光度法中根据显色剂的不同可分为苯酚-硫酸法、蒽酮-硫酸法等。黎晶晶等<sup>[14]</sup>通过对苯酚-硫酸法检

测条件系统详细的研究,确定了灵芝多糖含量测定的最佳条件,使含量测定的结果更稳定和准确。刘琳等<sup>[15]</sup>还用实验证明了苯酚-硫酸法样品前处理中的沉淀葡聚糖步骤能排除灵芝产品中麦芽糊精辅料的干扰,说明了此方法的优越性。另外,针对配制的硫酸蒽酮溶液可能是混浊液,导致的实验偏差大或无法显色测定的情况,杨瑞瑞等<sup>[16]</sup>通过考察配制的硫酸浓度,确定了合适的反应条件并使反应系统自行升温,优化后的含量测定方法简便易行且结果更准确。

## 3 灵芝多糖的结构分析

目前对于药用真菌多糖结构的分析方法主要分为三大类:化学方法、物理方法和生物学方法<sup>[17]</sup>。对于灵芝多糖一级结构的分析,常用的化学方法有高碘酸氧化法、Smith 降解法以及甲基化法等,用于测定多糖结构中单糖的连接方式。物理分析方法有红外吸收光谱法(IR)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、核磁共振波谱法(NMR)以及气相色谱与质谱联用技术等。由于仪器分析操作简便,目前研究以物理方法为主。生物学方法则是以酶解法为主。

Qian 等<sup>[18]</sup>用高效液相分析出灵芝多糖由 5 种单糖和二糖组成,包括木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖,其分子含量比分别是为 0.4% : 14.4% : 12.8% : 0.7% : 50.9%。Ye 等<sup>[19]</sup>则做了更深入的研究。他们用三氟乙酸水解灵芝子实体中的水溶性多糖,由高效液相色谱法测出分子量为 12 000 Da。利用阴离子交换层析来确定其单糖成分,测得葡萄糖:岩藻糖:半乳糖的摩尔比为 1.00 : 1.09 : 4.09,另外还含有少量甘露糖。

目前研究发现灵芝菌丝体多糖和子实体多糖具有相似的组成、一级结构和相对分子量。总结灵芝多糖组成成分有葡萄糖、甘露糖、岩藻糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖等,大部分多糖以  $\beta$ -(1-3)糖苷键构成主链,以  $\beta$ -(1-6)及 (1-4)糖苷键构成侧链。

## 4 灵芝多糖的生物活性

灵芝多糖具有调节免疫功能、抗肿瘤、抗辐射、抗衰老等多方面的生物活性。GP 对免疫系统有重要的调节作用,不仅能激活巨噬细胞、T 细胞、淋巴因子激活的杀伤细胞 CIK 等免疫细胞,还能促进细胞因子如白介素 2 (IL-2) 等生成,活化补体,从而在抗肿瘤、抗衰老等的防治上具独特功效。

**4.1 免疫调节与抗肿瘤** 灵芝多糖是一种生物免疫调节剂,能增强机体的细胞免疫与体液免疫。

Chen等<sup>[20]</sup>通过研究灵芝多糖对卵巢癌大鼠模型的血清抗氧化酶活性的影响揭示其抗肿瘤作用机制。研究发现灵芝多糖能显著减少丙二醛(MDA)的产生和增加血清抗氧化酶的活性,这表明灵芝多糖的抗氧化活性可用于卵巢癌等癌症的治疗。另外,从灵芝孢子中提取出的名为GSG的灵芝多糖是一种溶于水,且为一种有不同连接的分支葡聚糖。它是鼠类的腹膜巨噬细胞中MAPKs(促分裂原活化蛋白激酶)和TNF(肿瘤坏死因子)以及L(白细胞介素)的一种有效诱导物。并且诱发小鼠体内的GSG可使脾细胞中刀豆球蛋白a诱导发生增殖反应,还表现出对抗刘易斯肺癌的活性。因此GSG是一种有效的免疫调节剂,很有可能成为癌症的辅助治疗手段<sup>[21]</sup>。

Yue等<sup>[22]</sup>在比较不同部位灵芝所含多糖活性时,对比了灵芝子实体不同结构(整个子实体,菌盖和菌柄)以及灵芝孢子(孢壁破损和未破损的)在患有S-180肉瘤的小鼠体内抗肿瘤和免疫活性。实验结果表明灵芝整个子实体或菌柄提取物和孢壁破损的灵芝孢子比灵芝菌盖提取物对肉瘤的生长有更高的抑制作用。另外,实验研究还发现灵芝的热水提取物和灵芝孢子在免疫刺激活性方面没有明显差异。

Ma等通过研究证实了灵芝孢子的多糖提取物能刺激脾单核细胞的增殖和细胞因子的分泌,从而体现其免疫调节活性。研究发现在灵芝孢子多糖处理的脾单核细胞中,可调控肌球蛋白轻链2-A, GDP-解离抑制因子、T细胞特异性GTP酶、磷脂酰肌醇转移蛋白的表达增加<sup>[23]</sup>。

**4.2 抗辐射** 辐射对机体造成损害的机制之一是产生大量自由基,引发一系列脂质过氧化反应,引起细胞中核酸、蛋白质分子结构的破坏,最终对各组织和器官造成严重的损害,同时,辐射引发免疫功能降低,基因突变等也是严重危害人体健康的。

Pillai等<sup>[24]</sup>通过小鼠的生存率、网状细胞内微核的诱导、质粒pBR322 DNA的丝条断裂和制止过氧化作用抑制等试验来研究灵芝多糖在体内外的防辐作用。结果表明灵芝多糖在作为一种新的辐射防护剂上有很大前景。

**4.3 抗衰老与抗氧化** 很多疾病如衰老、肿瘤、心血管疾病的病理生理过程都与存在过量的自由基有关,因此寻找有效的抗氧化剂具有重要意义。

Jie与其实验组在实验用威斯塔成年雄性大鼠,

用腹膜注射链脲霉素诱导糖尿病,实验组注射溶解于15% DMSO的灵芝多糖30 d,结果发现注射过灵芝多糖的大鼠体内抗氧化酶量、胰岛素量有明显升高,脂质过氧化作用和血糖量明显下降,得出结论:灵芝多糖可作为一个有效的抗氧化物<sup>[25]</sup>。Chen等<sup>[26]</sup>研究了灵芝多糖对患宫颈癌的大鼠的血清中抗氧化酶和免疫反应的影响,抗氧化反应是通过DPPH自由基、氧自由基、氢氧根自由基的含量,结果表明灵芝多糖能有效提高对上述自由基的清除能力。Xie等<sup>[27]</sup>通过测定灵芝多糖对皮肤衰老基因表达水平的影响揭示其抗衰老作用机制,在角蛋白细胞培养过程中用灵芝多糖处理,结果在总量18 346个人基因中,103个基因的表达受到了增量调节,从而证实了灵芝多糖能诱导细胞因子的分泌进而提高有丝分裂和细胞增长的能力。

灵芝多糖羧甲基化后可显著增强其抗氧化活性。Xu等<sup>[28]</sup>研究了羧甲基化的灵芝多糖的水溶性、化学性质和其在体外的抗氧化活性。研究发现羧甲基化的灵芝多糖在蒸馏水中溶解度达到了100 mg/ml,远超过灵芝多糖的水溶性。另外,羧甲基化的灵芝多糖有更高的抗氧化活性,尤其是在清除羟自由基(5 mg/ml达83.7%)和过氧化氢(10 mg/ml达51.6%),这表明不溶于水的灵芝多糖经过羧甲基化后可在食品和药物制剂中成为一种有发展前景的抗氧化物质。

**4.4 其他活性** 灵芝多糖还具有其它多种生物活性,有研究表明灵芝多糖提取物中一种含岩藻糖残基的糖蛋白成分(EORP)能提高鼠类体内巨噬细胞J774A. 细胞表面的CD14和TLR4的表达,促进J774A. 细胞在依靠CD14的模式中对LPS的结合与吸收。提供了一种EORP引起白细胞介素1的表达和巨噬细胞清除受污染的LPS来治疗细菌感染的保护机制<sup>[29]</sup>。

目前还发现了灵芝多糖GI-PS在抗阿霉素(ADM)的白细胞系的反转作用,即能把细胞抗K562/ADM的性质转为抗多柔比星<sup>[30]</sup>。

## 5 展望

由于灵芝多糖的复杂性以及分离和分析方法的种种限制,灵芝多糖的种类至今尚未探明,其分子结构也未完全确定,灵芝多糖结构与它药理关系的报道也并不多见。因此,进一步探明灵芝多糖的化学结构,更大幅度的提高提取效率,浓缩精华,并对灵芝多糖的结构进行修饰以提高其免疫和抑癌活性等,应是以后的研究方向。

随着时代的发展,人们的健康意识逐步提高,防

病于未然已深入人心。作为中国传统名贵药材代表之一的灵芝, 将以其特殊的营养、保健、药用功效受到更加广泛的关注与运用。

### 【参考文献】

- [1] Tang YJ, Zhang W, Zhong JJ. Performance analyses of a pH-shift and DOT-shift integrated fed-batch fermentation process for the production of ganoderic acid and Ganoderma polysaccharides by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* [J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(5): 1852.
- [2] Liu W, Xu J, Jing P, *et al*. Preparation of a hydroxypropyl *Ganoderma lucidum* polysaccharide and its physicochemical properties [J]. *Food Chemistry*, 2010, 122: 965.
- [3] 胡斌杰, 韩艳霞, 姬红. 正交实验法超声提取灵芝多糖最佳工艺研究 [J]. *中药材*, 2008, 31(1): 142.
- [4] 黄生权, 王周, 林俊钦. 超声波辅助提取灵芝水溶性多糖的工艺研究 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(23): 10993.
- [5] 陈洁, 雷林生, 常花蕾. 灵芝活性多糖的提取工艺研究 [J]. *广东药学院学报*, 2009, 25(4): 348.
- [6] 干伟伟, 常继东. 灵芝多糖提取条件的响应曲面法优化研究 [J]. *江苏农业科学*, 2009, (1): 259.
- [7] 靳丹虹, 牛艳秋, 陈博. 不同提取方法对灵芝多糖提取率的影响 [J]. *中国药师*, 2008, 11(5): 551.
- [8] 周明, 杜欣, 杨德, 等. 超声波微波协同萃取对灵芝多糖提取率的影响 [J]. *湖北农业科学*, 2009, 48(7): 1727.
- [9] 王艳, 李晶, 张铁军. 真空气流植物细胞破壁技术在灵芝药材提取前处理中的应用 [J]. *天津中医药大学学报*, 2008, 27(2): 84.
- [10] Zhang JG, Chen XM, He XS. A Study on the Synthetic Characteristics of the Extracellular Polysaccharide (EPS) of *Ganoderma lucidum* Cultured in Batch Fermentation Using a Kinetic Model [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2007, 23(6): 1065.
- [11] 曹鹏伟, 彭奇均, 戴军. D392树脂对灵芝多糖色素吸附行为研究 [J]. *化工技术与开发*, 2009, 38(7): 14.
- [12] 杨占涛, 刘超, 李月. 灵芝多糖的研究现状 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(20): 8651.
- [13] 李坚, 刘东波, 夏志兰, 等. 分光光度法快速测定灵芝中多糖含量 [J]. *湖南农业科学*, 2009, (2): 3.
- [14] 黎晶晶, 徐格非. 苯酚硫酸法测定灵芝多糖含量的研究 [J]. *杭州化工*, 2008, 38(1): 23.
- [15] 刘琳, 俞晓玲. 麦芽糊精在苯酚硫酸法测定灵芝多糖中的影响分析 [J]. *海峡药学*, 2009, 21(8): 69.
- [16] 杨瑞瑞, 李国华, 樊宝娟. 灵芝多糖的含量测定方法探讨及改进 [J]. *陕西中医学院学报*, 2009, 32(5): 62.
- [17] 钟昕, 周素梅, 王强. 药用真菌多糖研究进展 [J]. *科技导报*, 2009, 27(9): 97.
- [18] Yang Q, Wang SW, Xie YH, *et al*. HPLC analysis of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes activity and Bax, Bcl2 expression [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 46: 167.
- [19] Ye LB, Zhang JS, Ye XJ, *et al*. Structural elucidation of the polysaccharide moiety of a glycopeptide (GLPCW-) from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies [J]. *Carbohydrate Research*, 2008, 343(4): 746.
- [20] Chen YG, Shen ZJ, Chen XP. Modulatory effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on serum antioxidant enzymes activities in ovarian cancer rats [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(2): 258.
- [21] Guo L, Xie JH, Ruan YY, *et al*. Characterization and immunostimulatory activity of a polysaccharide from the spores of *Ganoderma lucidum* [J]. *International Immunopharmacology*, 2009, 9(10): 1175.
- [22] Yue GL, Fung KP, Leung PC, *et al*. Comparative Studies on the Immunomodulatory and Antitumor Activities of the Different Parts of Fruiting Body of *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma Spores* [J]. *Phytotherapy research*, 2008, 22(10): 1282.
- [23] Ma C, Guan SH, Yang M, *et al*. Differential protein expression in mouse splenic mononuclear cells treated with polysaccharides from spores of *Ganoderma lucidum* [J]. *Phytomedicine*, 2008, 15(4): 268.
- [24] Pillai TG, Nair CK, Janardhanan KK. Polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* occurring in Southern parts of India, protects radiation induced damages both in vitro and in vivo [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2008, 26(1): 80.
- [25] Jia J, Zhang X, Hu YS, *et al*. Evaluation of in vivo antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in STZ-diabetic rats [J]. *Food Chemistry*, 2009, 115(1): 32.
- [26] Chen XP, Chen YL, Shui B, *et al*. Free radical scavenging of *Ganoderma lucidum* polysaccharides and its effect on antioxidant enzymes and immunity activities in cervical carcinoma rats [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77(2): 389.
- [27] Xie SQ, Liao WQ, Yao ZR, *et al*. Related gene expressions in anti-keratinocyte aging induced by *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. *Journal of Medical Colleges of PLA*, 2008, 23(3): 167.
- [28] Xu J, Liu W, Yao WB, *et al*. Carboxymethylation of a polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* enhances its antioxidant activities in vitro [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 78(2): 227.
- [29] Hua KF, Hsu HY, Chao LK. *Ganoderma Lucidum* Polysaccharides Enhance CD14 Endocytosis of LPS and Promote TLR4 Signal Transduction of Cytokine Expression [J]. *Journal of cellular physiology*, 2007, 212(2): 537.
- [30] Li WD, Zhang BD, Wei R. Reversal effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharide on multidrug resistance in K562/ADM cell line [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(5): 620.

[收稿日期] 2010-01-07

[修回日期] 2010-02-04