

灵芝转化苦参水提物的 3 个新生成分体外抗乙型肝炎病毒作用

李雁群¹ 章克昌²

(¹ 华南师范大学生命科学学院 广州 510631)

(² 江南大学生物工程学院 无锡 214036)

摘 要 先在基础培养基中添加苦参水煎汁,然后培养灵芝,得到灵芝培养液,再按乙醇-氯仿-5%碳酸氢钠溶液-氯仿的顺序提取培养液中的有机酸成分,用制备高效液相色谱分离,得到 6 个新组分,用这些组分分别作用于转染了乙型肝炎病毒 DNA 的 2.2.15 细胞,用固相放射免疫法测定细胞培养上清液中的乙肝病毒表面抗原(HBsAg)和 e 抗原(HBeAg)的含量,用四甲基偶氮唑盐(MTT)法测定细胞的存活率。结果表明,其中的 3 个组分对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 和 HBeAg 有抑制作用,提示可能具有抗乙肝病毒的作用。

关键词 灵芝,苦参,乙肝,液体培养,抗病毒

中图分类号:Q936 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)04-0643-04

灵芝作为一味名贵中药用于益气强身、扶正祛邪。近年来的研究表明,灵芝具有调节免疫^[1]、抗肿瘤^[2]、抗病毒^[3]等作用。灵芝中最受到关注的是灵芝多糖和灵芝酸。有研究表明,灵芝酸具有抑制人免疫缺陷病毒(HIV)蛋白酶的作用^[4]。苦参是一味清热解暑中药,常用来消炎、抗菌。近年来苦参用于抗病毒,有文献报道^[5]苦参具有抗疱疹病毒的作用。苦参含有苦参碱,而苦参碱已经是临床用来治疗肝炎或护肝的注射用药。

在中医实践中,灵芝常常与苦参一类的清热解暑中药配伍合用,以起到扶正祛邪的作用。中医的做法是用灵芝子实体与苦参饮片共煎,取水煎汁服用。但是野生灵芝很难得到,栽培灵芝生长缓慢,产量低,难于满足需要。目前液体培养灵芝的技术已经成熟,虽然液体培养的灵芝与野生或栽培的灵芝子实体是否具有相同的药效目前尚无定论,但是实践上液体培养的灵芝培养液已经在逐渐替代灵芝子实体。

灵芝液体培养液中成分复杂,既有灵芝的代谢产物又有灵芝对培养基转化的产物。在一般的液体培养条件下,培养基的成分相对简单,与生长在野外树木中的野生灵芝相比其产物的成分可能也不够丰富。基于这种考虑,我们将苦参的水煎汁添加到灵芝培养基中,以期通过灵芝对苦参进行转化产生增强药效的成分,或通过向灵芝提供丰富的前体物使其产生更丰富的代谢产物而增强药效,同时苦参还和灵芝形成配伍作用。研究发现,在 120 h 的培养时间内,苦参中的重要药效成分——苦参碱不会损失,苦参也不会抑制灵芝的生长,相反还促进灵芝生长^[6]。药效试验表明,培养液比苦参煎汁和普通的灵芝培养液(培养基中不添加苦参煎汁)的混合物在体外抑制 2.2.15 细胞分泌乙肝表面抗原和 e 抗原

有更强的作用^[7]。我们的研究还表明,添加苦参的发酵液的氯仿提取有机酸混合物,在体外抑制 2.2.15 细胞分泌乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原和 e 抗原的能力上,比不加苦参的灵芝发酵液和苦参提取液的氯仿提取有机酸都强[△]。为了对此现象进行深入研究,我们将发酵液中氯仿提取的有机酸进行分离,并对各类组分进行药效比较研究。本文对氯仿提取的有机酸成分中的 6 个新产生的组分,在体外抑制乙肝病毒 DNA 转染的细胞分泌表面抗原和 e 抗原的作用进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌体 灵芝菌 *Ganoderma lucidum*(Fr.) Krast, 本研究室保存的菌种。

1.1.2 培养基 每升含葡萄糖 40g,蛋白胨 4g, MgSO₄ 0.75g, KH₂PO₄ 1.5g, VB1 10mg, pH5.3。

1.1.3 主要试剂和仪器 苦参 RADIX SOPHORAE FLAVSCENTIS 购自无锡山禾药业集团。2.2.15 细胞为克隆的 HBV DNA 转染的 Hep-G2 细胞^[9],由解放军 302 医院病毒室惠赠。细胞培养基 MEM 干粉、胎牛血清、G418(Geneticin), MTT 均为美国 GibCo 公司产品。HBsAg 固相放射免疫试剂盒购自中国原子能研究院同位素所原博公司。HBeAg 固相放射免疫试剂盒购自北京北方生物技术研究所。培养瓶、24 孔培养板购自美国 Corning 公司,γ-计数器(GC911 型)购自科大创新股份有限公司中佳分公司,酶标仪 3022A 型购自东方电子仪器厂。

1.2 色谱条件

Waters 650E HPLC 系统,色谱柱 C18, 250 × 10mm, 5μm, 紫

作者简介 李雁群(1963-)男,江西崇义人,博士,副教授,主要从事生物制药研究。Tel/Fax 86-20-31708125; E-mail: liyq2004@126.com

收稿日期 2004-12-23, 修回日期 2005-03-28

△ 李雁群. 中药的灵芝发酵及其产物抗乙肝活性的研究. 江南大学博士论文, 2004.

外检测 254 nm 柱温 30℃, 流速 2mL/min, 流动相 A :10% 乙腈水溶液中含 0.5% 乙酸, 流动相 B :80% 乙腈水溶液中含 0.25% 乙酸, 梯度洗脱 0 ~ 15min 100% A, 15 ~ 25min 70% A, 25 ~ 35min 0% A, 35 ~ 40min 100% A。

1.3 药汁煎制

称取中药材(已切片)加适量水浸泡 1h, 在电炉中煎熬, 调整适当的加热速度, 使保持温和的沸腾状态。煮沸 30min, 倒出药汁, 补加适量冷水于药渣中, 再煮沸 20min, 倒出药汁。合并药汁, 用 8 层纱布过滤, 药汁用于灵芝液体培养。

1.4 灵芝培养

将药汁倒入 250mL 三角瓶中, 加入基础培养基, 溶解。100kPa 灭菌 30min。冷却后接入灵芝液体种, 接种量 10%。摇瓶条件: 三角瓶 250mL, 装液量 80mL, 温度 30℃, 转速为 150r/min, 培养时间为 7d。

1.5 氯仿提取有机酸成分的分离

先将灵芝培养液离心分离得上清液和菌丝体。上清液中加入 95% 乙醇 4℃ 过夜沉淀大分子, 离心去除沉淀得到胞外乙醇提取液, 菌丝体经 50℃ 真空干燥后磨碎, 用 95% 乙醇 50℃ 回流提取 24h, 过滤得到胞内乙醇提取液。将 2 种提取液合并, 减压蒸馏除去乙醇, 再加少量蒸馏水悬浮蒸发残留物。用 2.5 倍氯仿提取 3 次, 在 45℃ 下减压浓缩到原体积的 1/15, 得浓缩的氯仿提取液。用等体积 5% NaHCO₃ 溶液对浓缩的氯仿提取液反提取, 所得到的 5% NaHCO₃ 提取液在冰浴条件下用 6mol/L HCl 调 pH 到 3.0, 然后再用 2 倍氯仿提取, 减压蒸干除去氯仿即得粗提取物。苦参煎汁中的氯仿提取有机酸按上述同样的程序提取。所得粗提取物再用制备 HPLC 分离, 收集需要的峰, 挥发除去溶剂, 称重, 用少量二甲亚砜溶解后, 用 MEM 细胞培养液定容, 用 2.5cm 微孔滤器

(0.22μm) 过滤除菌, 放冰箱备用。

1.6 细胞培养

将 2.2.15 细胞悬液接种 24 孔板, 细胞数为 1 × 10⁵/孔, 加培养液 1mL, 培养液中含 10% 胎牛血清, 200μg/mL G418, 链霉素 100μg/mL, 青霉素 100U/mL, 置 5% 二氧化碳培养箱 37℃ 培养。48h 后换含药培养液, 培养液中胎牛血清降低为 2%, G418 增加到 380μg/mL。每 4d 换一次培养液, 共换 3 次培养基, 培养第 12 天取出培养孔中的上清液, 检测 HBsAg, HBeAg。板中细胞用 MTT 法测细胞活性。

1.7 HBsAg、HBeAg 测定

用固相放射免疫分析法(RIA)^[8]测定。

1.8 细胞存活率测定

倾去培养板中培养液, 每孔加浓度为 0.5mg/mL MTT 的 PBS 溶液 1.5mL/孔, 37℃ 培养 4h, 弃去上清, 每孔加入 1.0mL 二甲基亚砜, 振荡 10min, 置酶标仪下测定 OD₄₉₀ 值, 与空白对照孔 OD₄₉₀ 值比较, 以空白对照孔的细胞存活率为 100%, 计算各孔存活细胞百分比。

2 结果

2.1 氯仿提取有机酸成分分离结果

表 1 是在基础培养基中培养的灵芝培养液、苦参煎汁、基础培养基加苦参煎汁后培养的灵芝培养液三者的氯仿提取有机酸经 HPLC 分离后的结果。在基础培养基中培养的灵芝培养液中提取的有机酸有 5 个组分, 苦参水煎汁中有 13 个组分, 基础培养基加苦参煎汁培养的灵芝培养液中有 18 个组分, 其中组分 3、组分 4、组分 8、组分 10、组分 13、组分 16 共 6 个组分是前二者所没有的。收集这 6 个新组分, 评价它们体外抗 HBV 的作用。

表 1 3 种提取物的组分比较

Table 1 The components in 3 extracts separated by HPLC

Components	Extract of <i>G. lucidum</i> broth		Extract of RSF		Extract of <i>G. lucidum</i> broth with adding of RSF	
	Retention time/min	Content/%	Retention time/min	Content/%	Retention time/min	Content/%
1	5.152	21.76			4.906	2.16
2	6.604	13.05			6.658	3.60
3					9.386	1.67
4					9.987	3.80
5			10.771	3.59	10.716	4.81
6			11.712	2.84		
7	12.947	36.33			12.949	2.58
8					13.595	5.48
9			14.207	3.34	14.465	4.48
10					15.734	12.11
11			16.275	3.66	16.205	33.20
12			16.660	2.17		
13					17.032	7.24
14			17.697	2.22	17.577	3.92
15	19.461	23.05			19.420	7.45
16					19.979	1.05
17			21.522	17.04	21.536	2.57
18	23.945	5.62			23.630	1.26

续表 1

Components	Extract of <i>G. lucidum</i> broth		Extract of RSF		Extract of <i>G. lucidum</i> broth with adding of RSF	
	Retention time/min	Content/%	Retention time/min	Content/%	Retention time/min	Content/%
19			24.153	3.06		
20			24.620	3.46		
21			24.727	10.74		
22			25.413	41.25	25.468	0.88
23			27.487	1.26		
24			28.003	5.36	27.995	2.69

2.2 新组分抑制 HBsAg 和 HBeAg 分泌的效果

药物对 HBsAg (或 HBeAg) 分泌的抑制效果以抑制率来反映,抑制率按下式计算:抑制率 =

$$\frac{\text{对照组 HBsAg (或 HBeAg) P/N} - \text{加药组 HBsAg (或 HBeAg) P/N}}{\text{对照组 HBsAg (或 HBeAg) P/N} - 2.1} \times 100\%$$

初步试验表明,组分 3、组分 4、组分 16 没有抑制表面抗原和 e 抗原的作用,只有组分 8、组分 10、组分 13 表现出明显的抑制作用。在确定了试验用药浓度范围后,药物浓度按倍比稀释分 5 个级,每个样品 4 个平行孔,结果取均值。ID₅₀ 为药物抑制 HBsAg 或 HBeAg 达到 50% 时的药物浓度。试验结果如表 2 和表 3 所示。

表 2 组分 8、组分 10、组分 13 对 HBsAg 抑制率(%)

Component	C(Components) (μg/mL)					ID ₅₀	Therapeutic Index
	640	320	160	80	40		
8	94	82	49	30	10	165	3.2
10	100	100	84	41	15	100	2.6
13	83	51	23	9	0	320	1.8

表 3 组分 8、组分 10、组分 13 对 HBeAg 的抑制率(%)

Component	C(Components) (μg/mL)					ID ₅₀	Therapeutic Index
	640	320	160	80	40		
8	60	32	19	13	10	520	1.0
10	76	40	18	12	9	400	0.7
13	56	27	13	8	5	570	1.0

为了考察 3 个组分是否影响 HBsAg 和 HBeAg 的测定,取未加药物的对照培养的 2.2.15 细胞培养上清液按实验剂量分别加入 3 个组分,然后按上述样品测定的程序测定 2 种抗原,结果表明 3 个组分在实验剂量范围内不会明显影响 HBsAg 和 HBeAg 的测定。

2.3 细胞存活率测定

MTT 法检测存活细胞灵敏度高,重复性和稳定性也较好,是测定细胞存活率的常用方法之一。3 个组分对细胞生长产生影响,表现出一定的毒性作用,使得细胞存活率如表 4 所示。CD₅₀ 为试验组存活细胞为对照组的 50% 时的药物浓度。

表 4 细胞存活率测定结果(%)

Component	C(Components) (μg/mL)					CD ₅₀
	640	320	160	80	40	
8	40	69	75	82	90	530
10	25	46	58	71	84	265
13	46	67	83	88	95	570

3 讨论

HBV DNA 转染的 HepG2 细胞系是一个被广泛应用的体外抗 HBV 药物筛选的细胞模型,应用这一模型,已对抗 HBV 药物如病毒唑、逆转录酶抑制剂 DDA、抗超螺旋 HBV DNA 的萘啶酸以及干扰素等进行了体外抗 HBV 的研究^{9,10}。如果药物对 HBV DNA 转染细胞分泌病毒颗粒组装蛋白有抑制作用,可以认为药物可能有抗 HBV 活性。本试验表明 3 个组分对 HBsAg 和 HBeAg 的表达有不同程度的抑制效果,且其抑制效果与剂量呈正相关,可能预示着这 3 个组分具有抗 HBV 的活性。

在我们的研究中,将苦参煎汁添加到灵芝的培养基中参与到灵芝的培养过程,这样所得的培养液比起灵芝培养液与苦参煎汁的简单混合液有更好的药效⁷。研究还表明,添加苦参的发酵液的氯仿提取有机酸(混合物),在体外抑制 2.2.15 细胞分泌 HBV 表面抗原和 e 抗原的能力上,比不加苦参的灵芝发酵液的氯仿提取有机酸和苦参提取液的氯仿提取有机酸都强。将苦参煎汁在发酵前添加到灵芝培养基中,与在发酵后把苦参煎汁添加到发酵完成的发酵液中两种做法相比,在成分变化上来说,由于灵芝的转化作用,会有 3 种情况:一是某些成分含量发生变化,或者增加或者减少;二是出现新的成分;三是某些成分消失了。药效上的变化,究其原因应该是成分的变化。发酵前添加苦参的灵芝发酵液其药效比不添加的强,比单独的苦参提取液强,比苦参和灵芝简单混合的也强。药效的增强要么是某些新产生的成分带来的结果,要么是某些有效成分含量增高后带来的结果。哪些因素引起药效增强,需要逐项去研究。本文首先对氯仿提取的有机酸类成分中新产生的 6 个成分的药效进行了研究,实验证明其中的 3 个成分有一定的药效,这起码可以说明这 3 个新产生的成分对药效的增强有贡献。当然,这 3 个成分究竟是什么物质,还需要进一步的研究才能确定。从另

一方面说,由于微生物的转化,变化的成分和新产生的其他成分还有很多,对药效发生影响作用的也不见得就是这3个组分,本文所做的研究只是反映了一部分情况。但是,我们认为,用药用真菌发酵中药是一种新的方法,值得尝试,而在其中发生的成分变化和药效变化上开展研究是有意义的,尽管这是初步的工作。

参 考 文 献

- [1] Zhang J, Tang Q J, Martin Z K, *et al.* Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *Ganoderma lucidum*. *Life Sciences*, 2002, **71**: 623 – 638.
- [2] Wang S, Hsu H H, Tzeng C H, *et al.* The antitumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. *Int J Cancer*, 1997, **70**: 699 – 705.
- [3] Kim Y S, Eo S K, Oh K W, *et al.* Antiherpetic activities of acidic protein bound polysaccharide isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with interferons, *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, **72**: 451 – 458.
- [4] Sahar E M, Meselhy R, Nakamura N, *et al.* Anti-hiv-1 and anti-hiv-1-protease substances from *Ganoderma lucidum*, *Phytochemistry*, 1998, **49**(6): 1651 – 1657.
- [5] Ma Sh, Du J, Paul P H, *et al.* Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial viruses. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, **79**(2): 205 – 211.
- [6] 李雁群, 章克昌. 12 味中药对灵芝发酵的影响. *食品与发酵工业* 2003 **29**(3): 48 – 50.
- [7] 李雁群, 张莲芬, 张志斌, 等. 苦参灵芝发酵液在 2.2.15 细胞中抗 HBV 作用, *无锡轻工大学学报* 2004 **23**(2): 98 – 100.
- [8] 王振英, 张纪云. *放射免疫分析与临床*. 北京: 中国科技出版社, 1995.
- [9] Sells M A, Chen M L, Acs G. Production of hepatitis B virus particles in HepG2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**(4): 1005 – 1009.
- [10] De Clercq E. Perspectives for the treatment of hepatitis B virus infections. *Int J antimicrob Agents*, 1999, **12**: 81 – 95.

In vitro inhibitory effects on HBsAg and HBeAg secretion of 3 new components produced by *Ganoderma lucidum* in the medium contained *Radix sophorae flavescens* extract

LI Yan-qun^{1*} ZHANG Ke-chang²

(¹ College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

(² Biotechnology School, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In order to enhance the medical effects of *Ganoderma lucidum* submergedly cultured broth, the aqueous extract of *Radix sophorae flavescens*, a traditional Chinese medicine, was added into the cultivation medium of *G. lucidum*. The organic acids were extracted with ethanol, chloroform, 5% NaHCO₃ and chloroform in turn from the cultured broth of *Ganoderma lucidum* which cultivation medium contained *Radix sophorae flavescens* extract. Six new components were separated from the organic acids with preparative HPLC. Their inhibitory effects on HBsAg and HBeAg secretion of HBV DNA transferred HepG2 cell (2.2.15 cell) were investigated. The results indicate that 3 components of the six have significant inhibitory effects on the antigen secretion.

Key words: *Ganoderma lucidum*, *Radix sophorae flavescens*, Hepatitis B Virus, Submerged culture, Anti-virus

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-20-31708125; E-mail: liyq9168@hotmail.com

Received date: 12-23-2004