

5 个不同灵芝种菌丝体多糖理化性质及免疫活性研究

陈春锋¹ 杨晓彤^{1*} 李绪全¹ 糜 可¹ 杨庆尧^{1,2*}

(¹上海师范大学微生物与免疫学研究所 上海 200234)

(²上海杨杨百草研究所 上海 200234)

摘 要 对灵芝属 *G. lucidum*, *G. tsugae*, *G. oerstedii*, *G. resinaceum*, *G. subamboinens* 5 个不同种用同一条件进行了液体发酵培养、多糖提取、理化性质及免疫活性的分析。结果表明, 5 种灵芝的菌丝体多糖得率相差较大, 以 *G. oerstedii* 最高, 但各多糖提取物分子量分布相似, 单糖组成均以葡萄糖为主, 并含半乳糖、甘露糖、盐酸氨基葡萄糖、岩藻糖。5 种多糖提取物均能显著增强小鼠巨噬细胞 Raw264.7 吞噬作用、释放 NO, 但以 *G. subamboinens* 菌丝体多糖提取物的活性最强。这些多糖提取物还均能促进小鼠脾细胞的增殖, 并对 ConA 诱导的淋巴细胞增殖有抑制作用。研究表明灵芝属内其他 3 个物种的菌丝体多糖提取物理化特征与 *G. lucidum* 和 *G. tsugae* 接近, 并同样具有免疫调节作用。

关键词: 多糖; 分子量分布; 单糖组成; 免疫调节

中图分类号: Q935 R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0628-06

灵芝是灵芝属(*Ganoderma*)内所有真菌的统称, 为我国传统中药中的补益上品, 有着 2000 多年的药用历史, 可补中益气、滋补强体、扶正固本、延年益寿^[1,2]。灵芝属内物种种类丰富, 仅在中国发现的灵芝亚科真菌就达 98 种之多, 然而目前得到较多研究的仅有赤芝(*Ganoderma lucidum*)、紫芝(*G. sinensis*)和松山灵芝(*G. tsugae*)等极少几个《中华人民共和国药典》(2000 年版)收录的也只有赤芝和紫芝两种。除该几个种外, 其他灵芝物种是否也具有与之相似甚至更好的药理活性则尚未得到很好的研究。

已知灵芝多糖是灵芝滋补强壮、扶正固本的主要物质基础, 具有提高机体免疫力、抑制肿瘤等多方面的生物活性和药理作用^[3-5]。本研究首先对灵芝属内 *G. oerstedii*, *G. resinaceum*(无柄灵芝)和 *G. subamboinens* 真菌进行了液体培养和多糖提取, 分析了菌丝体生物量、多糖得率、分子量分布及单糖组成等指标, 测定了体外免疫调节活性。结果与在相同条件下培养、提取的 *G. lucidum*(赤芝)和 *G. tsugae*(松山灵芝)多糖物质进行了比较, 为探索灵芝物种新资源、筛选高产免疫活性多糖的灵芝属真菌提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞: BALB/c 纯系雄性小鼠(18 ~ 22g)购自中国科学院上海实验动物中心(SLACCAS)(合格证号: SCXK(沪)2003-0003); 小鼠巨噬细胞系 Raw264.7 由香港大学 Jennifer M. F. Wan 博士惠赠。

1.1.2 菌种和试剂: 灵芝属 5 个种: 赤芝(*Ganoderma lucidum*), 松山灵芝(*Ganoderma tsugae*, *Ganoderma oerstedii*), 无柄灵芝(*Ganoderma resinaceum*, *Ganoderma subamboinens*)均经钟顺昌博士鉴定, 由上海师范大学微生物与免疫研究所保藏。

1.1.3 试剂和仪器: 多糖分子量测定用标准品 Dextran T 系列(平均分子量分别为 4.6kDa、7.1kDa、41.1kDa、84.4kDa、133.8kDa)为 Pharmacia 公司产品; 9 种单糖标准品(葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖、岩藻糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、盐酸氨基葡萄糖)购自 Sigma 公司; 胎牛血清(FBS)、DMEM 培养基、Con A、胰酶均为 Sigma 产品; RPMI1640 培养基、青霉素链霉素双抗为 Invitrogen Gibco 产品; 其他试剂均为国产分析纯。UV-2450 紫外-可见分光光度计(岛津公司), CO₂ 培养箱(Heraeus), 680 型酶标仪

基金项目: 上海市教育委员会科学项目(04DB20)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-21-64322895; E-mail: xtyang@shnu.edu.cn; yangsherb@vip.sina.com

作者简介: 陈春锋(1981-)男, 山东陵县人, 硕士研究生, 主要从事微生物药物学研究。

收稿日期: 2006-11-22 接受日期: 2007-02-02 修回日期: 2007-03-22

(BioRad),125 Solvent Module 高效液相色谱仪、CS-15R 型离心机(Beckman),132 示差检测器(Gilson),冷冻干燥机(Virtis 2KBTES-55)。

1.2 多糖的提取及理化性质的初步研究

1.2.1 灵芝的液体发酵培养:参照文献[6]方法进行液体发酵培养,菌丝体离心分离、蒸馏水洗涤、冰冻干燥。

1.2.2 灵芝菌丝体多糖提取:分别称取冰冻干燥后各灵芝菌株菌丝体干粉适量,按菌丝体 1:30(W/V)比例加入蒸馏水,95℃下浸提 1h,离心分离提取液,残渣重复提取两次,合并提取液,减压浓缩 3 倍量 95%乙醇沉淀,4℃条件下静置一昼夜后离心,以无水乙醇、丙酮、乙醚洗涤,冷冻干燥,得灵芝菌丝体多糖提取物^[7]。赤芝子实体经粉碎后用相同方法提取多糖样品。

1.2.3 总糖含量测定:采用苯酚-硫酸法,参照文献[8]进行。

1.2.4 多糖的分子量大小及分布测定:采用高效液相凝胶渗透色谱法(HPGPC)。色谱柱为 Shodex Ohpak SB-800HQ 凝胶柱(7.5mm × 300mm),流动相为 0.05mol/L 乙酸钠,流速 0.5mL/min,柱温 25℃。首先用不同分子量的葡聚糖标准品进样,测定保留时间(Rt),由 $\lg MW$ 对 Rt 作图获得标准曲线,然后以相同条件获得各种菌丝体多糖 HPGPC 图谱,由 GPC 软件计算得分子量及其分布^[9]。

1.2.5 多糖的单糖组成分析:用高效液相色谱法对各菌丝体多糖进行单糖的组成分析[△]。将葡萄糖(Glc)、甘露糖(Man)、半乳糖(Gal)、木糖(Xyl)、岩藻糖(Fuc)、鼠李糖(Rha)、葡萄糖醛酸(GlcUA)、半乳糖醛酸(GalUA)、盐酸氨基葡萄糖(GlcN)等 9 种单糖标准品混合物经 PMP 衍生后,进行液相色谱分析,确定各种单糖的出峰顺序。HPLC 条件为:Hypersil BDS-C18 柱,250nm 紫外检测,溶剂 A:含 15%(V/V)乙腈的 50mmol/L 磷酸缓冲液(pH6.9),溶剂 B:含 40%(V/V)乙腈的 50mmol/L 磷酸缓冲液,流速 1.0mL/min,柱温 25℃。

各多糖样品用 4mol/L 的三氟醋酸(TFA)120℃封管水解 6h。减压蒸发去除三氟醋酸,干燥后进行 PMP 衍生化和 HPLC 分析。

1.3 小鼠巨噬细胞刺激活性测定

1.3.1 促 NO 生成活性测定:酶解获取对数生长期

的 Raw264.7 细胞,用完全 DMEM 培养基(含 10%胎牛血清,100EU/mL 青霉素及 100μg/mL 链霉素)调密度为 2×10^6 个/mL 种于 96 孔培养板(50μL/孔),在 CO₂ 培养箱(37℃、5%CO₂、饱和湿度)中孵育 2h。洗去未贴壁的细胞后,加入终浓度为 200μg/mL 各灵芝多糖提取物(50μL/孔),以相同浓度的赤芝子实体多糖提取物作为阳性对照。板在 CO₂ 培养箱中继续培养 24h,然后用 Griess 反应测定培养上清液中 NO 的生成量^[10]。以仅加培养基的孔作为对照,无细胞孔作为空白,计算 NO 生成指数:NO 生成指数 = $(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{样品空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{对照空白}}) \times 100\%$ 。

1.3.2 促吞噬作用活性测定:按上述方法种植、培养 Raw264.7 细胞并加各灵芝多糖提取物(200μg/mL),以相同浓度的赤芝子实体多糖提取物为阳性对照。于 CO₂ 培养箱中培养 6h 后,弃培养基,细胞用预温 PBS 洗涤两次,然后每孔加入 50μL 0.072% 中性红溶液继续培养 1h。用预温的 PBS 洗涤 2 次以除去未被吞噬的染料,最后每孔加入 100μL 细胞裂解液(1mol/L 乙酸:乙醇 = 1:1)裂解过夜,于 550nm 波长条件下测定各孔中性红吸光度值^[11]。同样以仅加培养基的孔作为对照,无细胞孔作为空白,按下式计算巨噬细胞吞噬指数:中性红吞噬指数 = $(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{样品空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{对照空白}}) \times 100\%$ 。

1.4 小鼠脾细胞增殖刺激活性分析

小鼠断颈处死后,无菌收取脾细胞,用完全 RPMI1640 培养基(含 10%胎牛血清,100EU/mL 青霉素及 100μg/mL 链霉素,CRPMI)调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL,加入 96 孔培养板(50μL/孔)。多糖提取物溶液,或含 2μg/mL ConA 的多糖提取物溶液分别加入孔中(50μL/孔),使终浓度为 100μg/mL。置 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 68h 后,加 MTI(5mg/mL,10μL/孔)继续培养 4h 后于 550nm 波长处测定光密度(OD)^[12]。加入完全 RPMI1640 培养基的孔作为对照,无细胞孔作为空白,计算脾细胞刺激指数:脾细胞刺激指数 = $(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{样品空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{对照空白}})$ 。

1.5 统计

试验结果均以平均数 ± 标准偏差表示,各灵芝样品组间差异显著性采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行分析处理,两均数间差异显著性采用

[△]杨晓彤,李绪全,糜可,等.一种同时测定 9 个 PMP 衍生化单糖的改良 HPLC 方法及其在灵芝菌丝体多糖组成分析中的应用.第七届海峡两岸真菌学术研讨会论文集.台湾.2005.

双尾 t 检验。所用统计软件包为 SPSS 10.0。

2 结果

2.1 液体发酵菌丝体生物量和多糖提取物得率

5 个灵芝种用相同的液体发酵条件进行了培养和提取,并对菌丝体生物量及多糖产量进行了比较。结果表明不同种的灵芝菌丝体生物量及胞内多糖含量均存在差异(图 1)。菌丝体生物量从高到低顺序为 GR、GL、GT、GS 和 GO,平均为 15.71g/L,最高可达

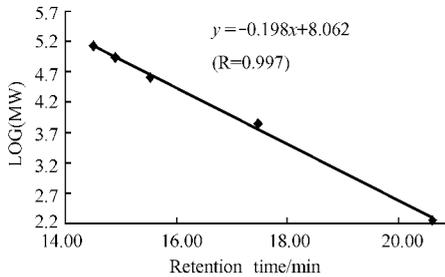


图 1 分子量-保留时间标准曲线

Fig.1 The standard curve of molecular weight-retention time

21.01g/L(GR),而最低仅有 11.40g/L(GO)。常用的 GL 种菌丝体生物量居于平均值以上,但远少于 GR,GT 更是低于平均值。

菌丝体多糖提取物得率从高到低顺序为 GO, GL、GR、GS 和 GT,平均值为 0.56g/L。GO 中提取物得率可达 1.11g/L,比最低的 GT(0.24g/L)高出近 4.6 倍。GL 提取物的得率虽居第二,但只有最高(GO)的 73%左右,而 GT 的更是低于平均值。

苯酚-硫酸法测得多糖提取物中多糖含量介于 34.30% ~ 62.23% 之间,平均含量为 $45.05 \pm 1.19\%$,多糖含量由高至低依次为 GT、GR、GO、GL、GS。其中 GT($62.23 \pm 2.66\%$)显著高于其余的种,而 GL 提取物中多糖含量在 5 个种中仅位于倒数第二。

综合多糖提取物得率和多糖含量计算得到的多糖产量结果显示,GO 的产量最高(0.44g/L),最低为 GS(0.11g/L),平均为 0.11g/L。GL 和 GT 在 5 个种中分别排在 2、4 位(表 1)。

表 1 5 个灵芝种液体发酵菌丝体生物量和多糖产量

Table 1 The mycelial biomass and polysaccharide yield of five *Ganoderma* species cultured by using submerge fermentation

Species	Biomass (g/L)	Yield of polysaccharide extract (g/L)	Contents of polysaccharide/%	Yield of polysaccharide (g/L)
GL	18.75	0.81	35.99 ± 0.12	0.29
GO	11.40	1.11	39.67 ± 1.47	0.44
GR	21.01	0.34	53.02 ± 0.90	0.18
GS	12.38	0.32	34.30 ± 1.04	0.11
GT	15.01	0.24	62.23 ± 2.66	0.15
average	15.71	0.56	45.05 ± 1.19	0.23

GL: *G. lucidum*; GO: *G. oerstedii*; GR: *G. resinaceum*; GS: *G. subamboinens*; GT: *G. tsugae*.

Yield of polysaccharide = Yield of polysaccharide extract \times Contents of polysaccharide.

2.2 多糖分子量分布比较结果

5 个灵芝种菌丝体多糖提取物经高效液相凝胶渗透色谱分析后,结果显示分子量分布相当近似。5 种多糖提取物均有一个出现在 16min 左右的主峰及 1 个 12min 左右的小峰和 2 个 18~19min 的小峰(图 2)。

用 GPC 软件分析各色谱峰的分子量分布,以归一化法计算各组分在被分析色谱峰中的比例,发现

5 个种的菌丝体多糖提取物分子量分布范围集中在 1~50kDa,此分子量区段的物质要占全部物质的 50%左右(图 2、表 2)。

5 个种多糖提取物分子量分布虽然近似,但并不完全相同。如 GR 在 200kDa 以上部分较其他 4 个多,GO 主峰后的小分子成分较多,而 GL、GS 和 GT 的分子量分布更为接近(图 2)。

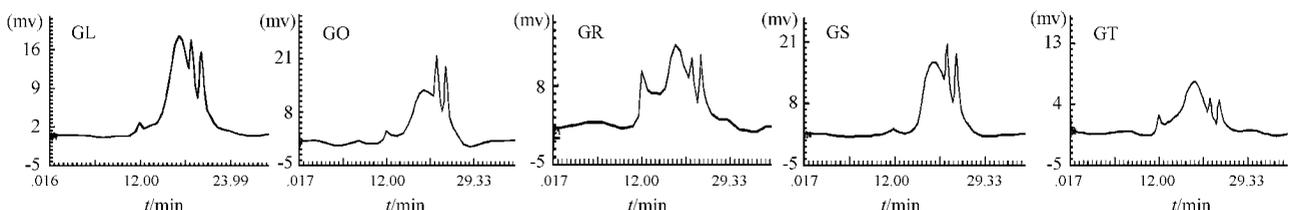


图 2 5 种灵芝菌丝体多糖提取物的 HPGPC 图谱

Fig.2 HPGPC chromatograms of mycelial polysaccharides extracted from five *Ganoderma* species.

表 2 5 种灵芝菌丝体多糖提取物不同分子量段的分布比较

Table 2 A comparison of five polysaccharide extracts distribution in different molecular weight segments

Molecular weight(Da)	Different molecular weight segments ratios					共计
	< 1 × 10 ³	1 × 10 ³ ~ 5 × 10 ⁴	~ 1 × 10 ⁵	~ 2 × 10 ⁵	> 2 × 10 ⁵	
GL	40.16	53.86	1.98	1.37	3.33	100.00
GO	45.45	48.57	2.12	1.33	3.22	100.00
GR	32.99	47.27	4.09	3.87	12.57	100.00
GS	31.81	53.64	5.49	3.24	6.67	100.00
GT	21.62	66.00	4.39	4.04	4.83	100.00

GL: *G. lucidum*; GO: *G. oerstedii*; GR: *G. resinaceum*; GS: *G. subamboinens*; GT: *G. tsugae*.

2.3 不同灵芝菌丝体多糖的单糖组成及摩尔比

单糖组成分析发现 5 个种菌丝体多糖提取物内均含有 Glc、Gal、Man、GlcN、Fuc 5 种单糖,并都以葡萄糖为主要单糖,其中以 GT 中的含量最高。此外

GL、GS、GT 还含有痕量的 GalUA, GL 中有少量的 Rha, GT 中有少量的 Xyl。各单糖间的摩尔比结果见表 3,其中除 GT 外,其余 4 种的摩尔比较为接近。

表 3 5 种灵芝菌丝体多糖提取物的单糖组成

Table 3 The monosaccharide compositions and molar ratios of five mycelia polysaccharide extracts' derived from different *Ganoderma* species

Species	The monosaccharide compositions and molar ratios								
	Glc	Gal	Man	GlcN	Fuc	Xyl	Rha	GlcUA	GalUA
GL	5.268	2.078	1.000	0.108	0.243	-	0.061	-	trace
GO	5.364	3.699	1.000	0.920	0.568	-	-	-	-
GR	6.628	1.236	1.000	0.708	0.347	-	-	-	-
GS	5.202	2.442	1.000	0.112	0.256	-	-	-	trace
GT	16.448	1.253	1.000	0.327	0.481	0.195	-	-	trace

- undetected; trace molar ratio < 0.01.

2.4 灵芝菌丝体多糖提取物对巨噬细胞 Raw264.7 免疫活性的影响

5 个菌丝体多糖提取物在 200µg/mL 时均能显著促进小鼠巨噬细胞 Raw264.7 产生 NO 和吞噬中性红(表 4)。刺激巨噬细胞活性由强到弱依次为 GS、GR、GO、GT、GL(促 NO 产生)或 GS、GL、GT、GR、GO(促吞噬活性),GS 这两种活性均为最强,且显著高于药典收录的 GI($P < 0.01$)和其他几种灵芝。各菌丝体多糖提取物促小鼠巨噬细胞 Raw264.7 产生 NO 和吞噬中性红活性的差异显著性统计结果见表 5 中。

表 4 不同灵芝多糖提取物刺激巨噬细胞活性的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 A comparison of the stimulation activities on mouse macrophage Raw 264.7 cells by different polysaccharides extracted from five *Ganoderma* species

Sample	NO synthesis index	phagocytic index
Control	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.05
GL	2.00 ± 0.71 ^a	1.26 ± 0.02 ^{bd}
GO	5.80 ± 0.28 ^{bd}	1.11 ± 0.05 ^b
GR	7.00 ± 0.01 ^{bd}	1.18 ± 0.02 ^{bc}
GS	13.44 ± 0.79 ^{bd}	1.31 ± 0.01 ^{bd}
GT	3.18 ± 0.21 ^b	1.22 ± 0.05 ^{bd}
Fruiting body	2.83 ± 0.24 ^b	1.10 ± 0.01 ^b

Fruiting body-*G. lucidum*. a: $P < 0.05$ vs Control, b: $P < 0.01$ vs Control, c: $P < 0.05$ vs Fruiting body, d: $P < 0.01$ vs Fruiting body.

表 5 5 种灵芝菌丝体多糖提取物刺激巨噬细胞生成 NO 和吞噬活性差异统计结果

Table 5 Statistical results of the significant difference among polysaccharide extracts from five *Ganoderma* species on the stimulation of NO production or phagocytosis of mouse macrophage Raw 264.7 cells

Sample	GL	GO	GR	GS
GL				
GO	** / + +			
GR	** / +	* / -		
GS	** / +	** / + +	** / + +	
GT	* / -	** / + +	** / -	** / -

GL: *G. lucidum*; GO: *G. oerstedii*; GR: *G. resinaceum*; GS: *G. subamboinens*; GT: *G. tsugae*. Note: SPSS10.0 statistics software was employed. Method: ANNOVA, LSD (Least Significant Difference). * or **: the significant difference among five polysaccharides on NO production. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$; + or -: the significant difference among five polysaccharides on phagocytic activity; + + $P < 0.01$; + $P < 0.05$; - $P > 0.05$.

2.5 不同灵芝菌丝体多糖提取物对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响

5 种灵芝菌丝体多糖提取物在 100µg/mL 时可显著促进小鼠脾淋巴细胞增殖,与对照比差异显著 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)(表 6),但不同的多糖提取物促脾细胞增殖活性接近,无统计学差异 ($P > 0.05$)。

有 ConA (2µg/mL)存在时,5 种菌丝体多糖提取物在 100µg/mL 时显示出对 ConA 诱导的脾细胞增殖有抑制作用,与对照处理组相比,统计学差异极显著

($P < 0.01$)。但各多糖之间这种抑制作用在统计学上没有差异($P > 0.05$)。

表6 5种灵芝菌丝体多糖提取物刺激小鼠脾细胞增殖活性比较

Table 6 The stimulation effects of polysaccharide extracts from different *Ganoderma* species on mouse splenocyte proliferation

Sample	Polysaccharide stimulation index	Polysaccharide + ConA stimulation index
Control	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.01
GL	1.11 ± 0.04 ^{ac}	0.76 ± 0.04 ^b
GO	1.15 ± 0.01 ^{bc}	0.70 ± 0.01 ^b
GR	1.18 ± 0.06 ^b	0.64 ± 0.05 ^b
GS	1.15 ± 0.03 ^b	0.70 ± 0.04 ^b
GT	1.20 ± 0.06 ^b	0.74 ± 0.01 ^b
Fruiting body	1.24 ± 0.02 ^b	0.70 ± 0.01 ^b

Fruiting body-*G. lucidum*; a: $P < 0.05$ vs Control, b: $P < 0.01$ vs Control, c: $P < 0.05$ vs Fruiting body, d: $P < 0.01$ vs Fruiting body.

3 讨论

灵芝属内丰富的物种资源中,目前得到开发应用的仅有赤芝、紫芝、松山灵芝等少数几个,有大量的物种资源尚未得到探索。此外,过去的研究往往使用不同的培养方法、提取方法和部位,分析方法等也各不相同,使得对不同灵芝种的研究结果很难进行相互比较。液体深层发酵技术由于具有周期短、产量大、质量稳定可控、无农药污染等优点^[13,14],是大规模获取灵芝多糖、进行工业化生产的方向,也已成为灵芝多糖生产的重要手段之一。因此本研究首先采用液体发酵方法,在相同条件下对5个灵芝种进行了培养,并在同一条件下提取了菌丝体多糖,分析了多糖的部分理化性质和体外免疫活性,使结果更具可比性。结果显示,5种灵芝种经液体发酵培养后获得的菌丝体中均能提取到多糖,多糖得率最高的是 *G. oerstedii* (0.44g/L),是 *G. lucidum* 的1.5倍,*G. tsugae* 的2.9倍。而 *G. resinaceum* 的多糖得率也有0.18g/L,与 *G. tsugae* (0.15g/L)接近。因此可见如果单纯以多糖产量为目标,*G. oerstedii* 是一个理想的候选菌种。

理化特征分析表明,五种灵芝菌丝体多糖提取物分子量分布类似,单糖组成均以葡萄糖为主,并还有 Gal、Man、GlcN、Fuc 四种单糖,表明五种多糖在结构上有类似性。体外免疫活性分析发现5个灵芝的菌丝体多糖提取物均能显著激活巨噬细胞吞噬、产生 NO,促进脾细胞增殖。当小鼠脾细胞受 ConA 刺激时,5种多糖提取物均能抑制细胞增殖,显示出多糖免疫调节的双重活性。这种双重调节的活性,*G. oerstedii*、*G. resinaceum* 和 *G. subamboinens* 与赤

芝 *G. lucidum* 和松山灵芝 *G. tsugae* 之间并不存在显著差异,表明这3个种可能与目前批准药用的赤芝有近似的免疫药理作用。

巨噬细胞激活实验还发现,五种灵芝菌丝体多糖提取物在激活 Raw264.7 免疫活性间存在差异,赤芝和松山灵芝菌丝体多糖提取物的活性并不是最高的,活性最高的是 *G. subamboinens* 的提取物。然而,*G. subamboinens* 种无论是多糖得率还是提取物中多糖的含量在所研究的五个灵芝种里均居末位。这种多糖含量与免疫活性间不一致的原因可能在于多糖的免疫活性与其组成、构型、分支、构象、分子量等多种因素有关。在一个粗多糖提取物的混合体系中,可能存在多种细微结构不同的多糖,而并不是所有多糖均有免疫活性。因此总多糖含量可能并不能反映免疫活性的强弱。由此可见,在筛选菌种时,除测定总多糖含量外,增加药理活性的测定是十分必要的。

我们的研究还表明,赤芝菌丝体多糖有与子实体多糖近似的免疫活性。虽用不同的免疫指标得出的活性强弱略有差异,但均能显著促进巨噬细胞吞噬、产生 NO,促进脾细胞增殖或下调因受 ConA 刺激的脾细胞增殖。该结果显示,菌丝体多糖可能可以用于替代子实体多糖,从而用液体发酵等工业化方法大量生产。

综上所述,我们在同一比较条件下发现灵芝属内存在多糖产量优于现用的赤芝和松山灵芝且同样具有接近或更高的体外免疫活性的物种。我们的研究结果可为进一步开发灵芝种质资源、筛选高产免疫活性多糖的新灵芝提供实验依据和理论基础。

致谢 该项目还得到香港保健协会和上海杨杨百草研究所的部分资助,在此一并致谢。

参考文献

- [1] Lin ZB, Zhang HN. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms. *Acta Pharmacol Sin* 2004 25(11):1387-1395.
- [2] Lin ZB. Cellular and molecular mechanisms of immuno-modulation by *Ganoderma lucidum*. *J Pharmacol Sci* 2005 99(22):144-153.
- [3] 李绪全, 杨晓彤. 灵芝多糖研究新进展. 中国新医药杂志, 2004 9(9):57-59.
- [4] Wasser SP. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002 60(3):258-274.
- [5] Peng YF, Zhang LN, Zeng FB, et al. Structure and antitumor activities of the water-soluble polysaccharides from *Ganoderma*

- [6] 杨晓彤,周月琴,李绪全,等.不同灵芝菌株菌丝体乙醇提取物体外抑瘤活性的比较和机理.菌物学报,2005,24(2):251-258.
- [7] Yang XT,Wan JMF,Mi K,et al. The quantification of (1,3)- β -glucan in edible and medicinal mushroom polysaccharides by using Limulus G test. 菌物学报,2003,22(2):296-302.
- [8] 张惟杰编著.复合多糖生化研究.上海:上海科学技术出版社,1987.
- [9] 杨晓彤,糜可,冯慧琴,等.不同云芝菌株及提取工艺所得结合蛋白多糖的分析比较.中国医药工业杂志,2000,31(12):545-548.
- [10] 王立生,潘令嘉,施理,等.双歧杆菌的全肽聚糖对裸鼠腹腔巨噬细胞产生IL-6、IL-12及一氧化氮的影响.中国病理生理杂志,2000,16(2):153-156.
- [11] Cao QZ,Lin ZB. Antitumor and anti-angiogenic activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(6):833-838.
- [12] Cao LZ,Lin ZB. Comparison of the effects of polysaccharides from wood-cultured and bag-cultured *Ganoderma lucidum* on murine spleen lymphocyte proliferation *in vitro*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2003, 38(2):92-97.
- [13] Fang QH,Zhang JJ. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. *Biochem Eng J*, 2002, 10:61-65.
- [14] Chang MY,Tsai GJ,Houng JY. Optimization of the medium composition for the submerged culture of *Ganoderma lucidum* by Taguchi array design and steepest ascent method. *Enzyme Microb Technol* 2006, 38:407-414.

A comparison study on the physical/chemical properties and immunomodulatory activities of mycelial polysaccharide extracts from five *Ganoderma* species

CHEN Chun-feng¹, YANG Xiao-tong^{1*}, LI Xu-quan¹, MI Ke¹, YANG Qing-yao^{1,2*}

(¹ Institute of Microbiology and Immunology, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

(² Shanghai Yang's Herb Institute, Shanghai 200234, China)

Abstract: Five *Ganoderma* species, including *G. lucidum*, *G. tsugae*, *G. oerstedii*, *G. resinaceum* and *G. subamboinens*, were parallel studied under an identical condition. These species were cultivated using liquid fermentation and their mycelia polysaccharides were extracted and compared on the physical/chemical properties and *in vitro* immunomodulatory activities. These results showed that the polysaccharide yields varied markedly among different species and *G. oerstedii* was the highest among the five. However, HPLC analysis showed all the polysaccharide extracts had similar molecular weight distributions and monosaccharide compositions. They all contained glucose, galactose, mannose, glucosamine hydrochloride and fucose. *In vitro* assays, these polysaccharide extracts significantly stimulated phagocytosis and nitric oxide production by RAW 264.7 macrophage cell line, and *G. subamboinens* exerted the strongest potency. When Con A was not or presented, they all showed an up-or-down immunomodulatory effect on mouse splenocyte proliferation. The results illustrate that in addition to *G. lucidum* and *G. tsugae*, which are the two mostly studied and applied species, other *Ganoderma* species can also produce polysaccharides with similar physical/chemical properties and with similar immunomodulatory activities.

Keywords: polysaccharide; molecular weight distribution; monosaccharide compositions; immunomodulation