

中药非药用部位栽培灵芝的活性成分及药效变化

郭耀辉¹, 罗霞², 余梦瑶², 郑林用^{1,3*}

¹四川农业大学资源与环境学院, 雅安 625000

²四川省中医药科学院, 成都 610041

³四川省农业科学院, 成都 610066

摘要:【目的】以丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bge.)、菊花 (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.)、桔梗 (*Platycodon grandiflorum* A. DC.) 3种中药材的非药用部位作为灵芝袋料栽培的原料, 研究灵芝子实体活性成分及药效变化。【方法】试验比较测定了非药用部位配方组与常规组(常规组作为实验对照组, 配方由玉米芯、棉籽壳等常规基质组成)的灵芝农艺性状, 子实体多糖和三萜含量, 并对各组灵芝进行了小鼠急性毒性试验及药效试验。【结果】结果表明, 非药用部位栽培灵芝生物转化率接近或者高于常规组, 生长周期有所延长; 活性成分上, 除了丹参组(SM. G)的三萜含量有所降低外, 其余各组的活性成分较常规配方组(OF. G)均有提高, 菊花组(CM. G)灵芝的多糖和三萜含量最高, 分别为2.47%和0.79%。最大耐受量试验表明, 非药用部位栽培的灵芝子实体的小鼠最大耐受量均为100 g/kg。溶血素试验和促睡眠试验中菊花组效果优于常规组灵芝; 抗疲劳上, 只有常规组灵芝表现出一定的抗疲劳功效, 而非药用部位栽培的灵芝没有该药效。【结论】中药材非药用部位栽培灵芝是可行的, 且子实体活性成分含量和部分药效发生了改变。

关键词: 中药非药用部位, 灵芝, 多糖, 三萜, 药效

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)06-0764-05

中药非药用部位是指传统中草药入药部位以外的组织结构, 如菊花通常以花入药, 根茎叶即为非药用部位; 丹参、桔梗通常以根入药, 地上部分为非药用部位; 厚朴以树皮入药, 树皮以外的大量木质部为非药用部位。国内每年有大量的非药用部位被作为废弃物处理, 得不到科学合理利用, 而研究表明, 非药用部位含有丰富的碳源和氮源, 具有栽培食用菌的潜力; 灵芝作为一种腐生真菌, 传统中药, 能够分解利用许多植物残体, 满足自身生长代谢, 同时合成多糖、三萜等次生代谢产物,

这两种活性物质又是灵芝的主要药效成分^[1-2], 灵芝三萜类化合物能起到镇静、抗疲劳的作用^[3], 灵芝多糖是一种生物免疫调节剂^[4-9], 利用中药非药用部位栽培灵芝, 一方面充分利用了废弃物, 变废为宝; 另外从中药非药用部位检测到含有少量药用成分, 如桔梗的根茎叶中有一定量的皂苷和糖类等活性成分^[10]。这些药用成分可能会对灵芝的次生代谢产生影响, 从而改变灵芝多糖, 三萜的含量与组成, 进一步会改变灵芝的药效, 对于定向选择不同药效灵芝提供了可能性。

基金项目: 国家农业产业技术体系四川食用菌创新团队精深加工研究岗位建设项目 [川农业(2009)75号]; 国家农业产业技术体系药用菌栽培岗位; 四川省科技平台建设项目: 农业微生物菌种资源标准化整理、整合及共享服务

* 通信作者。Tel: +86-28-84504005; E-mail: zly6559@126.com

作者简介: 郭耀辉(1985-), 山西省文水县人, 硕士研究生, 从事专业为微生物学。E-mail: a402331146@qq.com

收稿日期: 2010-12-10; **修回日期:** 2011-01-27

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种: 灵芝 13 号 (*Ganoderma lucidum* Karst.), 四川中医药科学院提供。

1.1.2 中药非药用部位材料: 丹参、菊花、桔梗非药用部位均购自四川省德阳市中江县中药材交易市场, 所购材料颗粒体积为: 长 × 宽 × 高 = (0.3 - 1.2) cm × (0.2 - 1.0) cm × (0.4 - 0.8) cm, 均为自然风干, 含水量约为 13%。

栽培配方: 各配方料水比为 干料: 水 = 1: 1.2, 未灭菌前 PH = 7。具体配方如下:

常规组 (OF. G): 玉米芯 80%, 棉籽壳 10%, 麸皮 8%, 石膏粉 1.0%, 过磷酸钙 1.0%。丹参组 (SM. G): 丹参非药用部位 30%, 玉米芯 30%, 棉籽壳 10%, 麸皮 8%, 石膏粉 1.0%, 过磷酸钙 1.0%。

菊花组 (CM. G): 菊花非药用部位 50%, 玉米芯 30%, 棉籽壳 10%, 麸皮 8%, 石膏粉 1.0%, 过磷酸钙 1.0%。桔梗组 (PG. G): 桔梗非药用部位 50%, 玉米芯 30%, 棉籽壳 10%, 麸皮 8%, 石膏粉 1.0%, 过磷酸钙 1.0%。

(以上配方为 2009 年配方优化试验所得, 试验从 30%, 50%, 70% 3 个非药用部位添加梯度筛选出每个中药材非药用部位最佳添加量。)

1.2 灵芝栽培

灵芝栽培方法同参考文献^[11]采用袋料栽培的方式, 每袋 (43 cm × 22 cm × 0.04 cm) 装干料 1 kg, 装料后袋长 23 cm, 每组设 100 个重复。

1.3 农艺指标测定

分别测定灵芝各个生长周期所需天数及生物转化率。菌丝满袋时长, 即从接种日期到有半数菌袋菌丝长满整个袋子所需的天数; 子实体分化时长为菌丝满袋期到半数菌袋出现子实体原基所需的天数; 子实体成熟时长为子实体分化期到半数子实体菌盖白边即将消失, 孢子开始弹射时经历的天数。生物转化率 = 子实体总鲜重/袋料干重 × 100%

1.4 多糖与三萜测定方法

1.4.1 多糖测定: 参照 2005 版药典^[12]提供的灵芝多糖测定方法。

1.4.2 三萜测定: 三萜测定方法参照参考文献^[13]。

1.5 药效试验

1.5.1 样品制备: 将试验采收的灵芝子实体于 45 - 55℃ 烘干到恒重, 将干样粉碎, 加入十倍体积蒸馏水, 浸提 2 h, 沸水提取 3 次, 每次 30 min, 过滤, 合并滤液, 浓缩到 0.4 g/mL。

1.5.2 最大耐受量试验: 健康昆明种小鼠 80 只, 雌雄各半, 18 - 22 g, 随机分为 4 组, 每组 20 只小鼠。取 50 g 干粉, 将小鼠禁食 8 h 后, 按最大浓度 0.83 g 生药/mL 和最大给药量 0.4 mL/10g 灌服样品液, 一天 3 次。连续观察 14 d, 观察动物的行为活动及毒性反应症状, 第 1 天、第 7 天、第 14 天时称体重, 最后脱颈椎处死, 解剖动物对各主要脏器进行肉眼观察。当有死亡情况发生, 说明样品有毒性, 需要做 LD50, 如果没有出现死亡且一切正常, 以不使动物产生死亡的剂量作为最大耐受量, 并计算最大耐受倍数^[14]。小鼠的最大耐受倍数 = 每只老鼠的耐受药量/小鼠平均体重 × 成年人平均体重 (60 kg)/药典规定成年人每日灵芝用量 (9 - 12 g)。

1.5.3 对鸡红细胞所致小鼠溶血素抗体生成的影响试验: 健康昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 18 - 22 g, 随机分为 6 组, 每组 10 只小鼠。动物组别为: 正常组 (N. G); 模型组 (M. G); 常规组 (OF. G); 丹参组 (SM. G); 菊花组 (CM. G); 桔梗组 (PG. G)。给药组每只每天按照 9 g/kg (子实体水煎液) 灌胃给药, 模型组、正常组每天以等容积生理盐水灌胃。连续给药 15 d, 在给药第 7 天, 注射 5% 鸡红细胞悬液 0.2 mL/只, 于第 7、9、11 天, 模型组和给药组腹腔注射环磷酰胺 20 mg/kg 进行造模, 正常组注射等量生理盐水。最后一次给药 30 min 后, 眼眶取血, 测定溶血素形成。

1.5.4 小鼠负重游泳时间试验: 健康昆明种小鼠 50 只, 全雄, 18 - 22 g, 随机分为 5 组, 每组 10 只小鼠。动物组别为常规组 (OF. G)、丹参组 (SM. G)、菊花组 (CM. G)、桔梗组 (PG. G)、正常组 (N. G)。给药组每只每天按照 9 g/kg (子实体水煎液) 灌胃量给药, 正常组以等容积生理盐水灌胃, 连续 15 d, 于第 15 天给药 30 min 后开始试验。试验当天给小鼠尾部负重相当于自身体重 8% 的重物, 将小鼠放入水温为 20℃ ± 0.5℃ 的水缸中, 水深 20 cm, 记录小鼠入水至完全沉入水中不可上浮 5 s 的时间, 减去 5 s 即为小鼠的游泳时间。

1.5.5 延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间试验: 健康昆

明种小鼠 60 只,雌雄各半,18 - 22 g,随机分为 6 组,每组 10 只小鼠。动物组别为模型组(M. G),阳性组(P. G),丹参组(SM. G),菊花组(CM. G),桔梗组(PG. G),常规组(OF. G)。每天给药量 0.3 mL/10g,模型组和阳性组给相等剂量的生理盐水,连续 15 d。末次给药半小时后均腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 进行造模,阳性组给以安定,以观察翻正反射消失的时间及睡眠持续的时间。

1.5.7 统计方法:上述药效试验数据均以 $\bar{X} \pm SD$ 的表达形式,用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验。

表 1 农艺性状

Table 1 Agronomic characters

Groups	Mycelium growth full bag duration/d	Fruit body differentiation duration/d	Fruit body maturity duration/d	Biological conversion efficiency/%
SM. G	41	10	16	20
CM. G	39	8	14	28
PG. . G	38	7	15	25
OF. G	32	7	13	20

2.2 多糖与三萜测定结果

表 2 结果显示,非药用部位栽培的灵芝子实体多糖含量较常规组均有所提高,菊花组(CM. G)提高最为显著,是常规组(OF. G)的 1.39 倍;菊花组(CM. G)和桔梗组(PG. G)灵芝子实体三萜含量较常规组分别提高了 25.1% 和 14.7%,而丹参组(SM. G)三萜含量低于常规组。

表 2 多糖和三萜含量

Table 2 Contents of polysaccharide and triterpene

Groups	Content of polysaccharide /%	Content of triterpene/%
SM. G	1.58	0.46
CM. G	2.47	0.79
PG. . G	1.45	0.73
OF. G	1.04	0.63

2.3 最大耐受量试验结果

一日内给小鼠 3 次灌胃最大浓缩浓度的试验样品后,各动物行为活动未见异常,在观察期内各天然孔无异常分泌物,无动物死亡,且体重自然增长(表 3)。实验结束时解剖各动物,主要脏器均无肉眼可见病变。小鼠的最大耐受量均为:100 g/kg 体重。动物日摄入量相当于药典规定剂量的 500 - 666 倍,说明非药用部位栽培的灵芝是可以安全入药的。

2 结果和分析

2.1 农艺性状测定结果

表 1 显示的灵芝菌丝生长速度,非药用配方组均低于常规对照组;从接种到灵芝子实体成熟的整个生长周期,丹参组(SM. G)、菊花组(CM. G),桔梗组(PG. G)较常规组(OF. G)分别延长了 15 d、9 d、8 d;在生物转化率上,菊花组,桔梗组都高于常规组,菊花组生物转化率较常规组提高了 40%,桔梗组提高了 25%。

表 3 小鼠体重变化表(n=20)

Table 3 Change of weight of mice in acute toxicity of Ganoderma lucidum (n=20)

Groups	Weight of mice before drug/g	Weight of mice seventh days after drug/g	Weight of mice fourteenth days after drug/g
SM. G	19.6 ± 0.9	28.3 ± 0.9	33.0 ± 0.9
CM. G	19.4 ± 1.1	29.7 ± 1.2	34.5 ± 1.1
PG. . G	20.1 ± 1.0	28.5 ± 1.3	35.9 ± 1.3
OF. G	18.8 ± 1.1	27.7 ± 0.7	35.2 ± 0.7

2.4 对鸡红细胞所致小鼠溶血素抗体生成的影响试验结果

表 4 结果显示,造模成功,菊花组(CM. G)OD 值最高,较模型组(M. G)差异显著(P < 0.01);丹参

表 4 小鼠溶血素 OD 值测定结果(n=10)

Table 4 OD value measurement results

of mice hemolysin test (n=10)

Group	Drug dosage/ (g/kg/day)	OD value
N. G	9	0.34 ± 0.12
M. G	9	0.16 ± 0.06
SM. G	9	0.23 ± 0.05*
CM. G	9	0.26 ± 0.08**
PG. G	9	0.12 ± 0.03
OF. G	9	0.22 ± 0.09*

Injection; Data of test expressed by $\bar{X} \pm SD$, * represent compared with model group significant differences $P < 0.05$; ** represent compared with model group significant difference $P < 0.01$.

组(SM. G), 常规组(OF. G) OD 值较模型组差异显著($P < 0.05$), 均具有提高小鼠免疫的功效。桔梗组(PG. G)没有表现出提高免疫的功效。

2.5 小鼠负重游泳试验结果

结果如表5, 常规组(OF. G)灵芝可以延长小鼠负重游泳时间($P < 0.05$), 其它组较正常组没有统计学差异, 不具有抗疲劳功效。

表5 小鼠负重游泳时间(n=10)

Table 5 Mice Loaded swimming times (n = 10)

Groups	Drug dosage/(g/kg/day)	Swimming times/s
N. G	9	520.5 ± 22.1
SM. G	9	516.1 ± 29.6
CM. G	9	526.1 ± 33.4
PG. G	9	535.1 ± 34.8
OF. G	9	577.6 ± 22.8*

Injection; Data of test expressed by $\bar{X} \pm SD$, * represent compared with normal group significant differences $P < 0.05$; ** represent compared with normal group significant difference $P < 0.01$.

2.6 延长戊巴比妥钠小鼠睡眠时间试验结果

表6结果显示, 菊花组(CN. G)小鼠睡眠时间大于模型组($P < 0.01$), 睡眠潜伏时间小于模型组($P < 0.05$); 常规组(OF. G)小鼠睡眠时间大于模型组($P < 0.05$), 这两组灵芝均有促睡眠功效, 且菊花组效果优于常规组; 丹参组(SM. G)、桔梗组(PG. G)不具有促睡眠功效。

表6 戊巴比妥钠诱导下小鼠睡眠时间(n=10)

Table 6 Sleeping times of mice by Pentobarbital driven (n = 10)

Groups	Drug dosage/(g/kg/day)	Latent time/s	Sleeping time/s
M. G	9	228.6 ± 5.6	5975.0 ± 58.6
P. G	9	147.0 ± 7.5**	14400.0 ± 86.8**
SM. G	9	236.8 ± 6.4	6598.0 ± 56.1
CM. G	9	185.1 ± 5.2*	8989.0 ± 79.6**
PG. G	9	203.4 ± 6.7	5464.0 ± 55.5
OF. G	9	201.3 ± 5.8	7230.6 ± 87.9*

Injection; Data of test expressed by $\bar{X} \pm SD$, * represent compared with model group significant differences $P < 0.05$; ** represent compared with model group significant difference $P < 0.01$.

3 小结

综合分析农艺指标, 活性成分测定及药效试验结果, 表明三种中药的非药用部位均能够用于灵芝栽培, 且灵芝生物转化率有所提高, 实现了中药废弃物的循环利用。非药用部位配方组灵芝生长周期有所延长, 可能与中药抑菌成分有关, 当然也可能是配方营养变化所致。但同时我们发现, 非药用部位配

方组菌袋污染率(1%)明显小于常规组(5%), 说明非药用配方具有一定的抗杂菌污染能力, 这在生产上是至关重要的。

小鼠急性毒性试验表明非药用部位栽培的灵芝在药典剂量下是安全的。但灵芝药效上发生了变化, 原因可能与多糖和三萜含量变化有关, 尤其是菊花组灵芝在多糖和三萜含量上有显著提高, 而其促睡眠和免疫调节能力也表现最好, 很值得进一步探究。非药用部位与常规配方材料的最大区别就是含有少量的药用成分, 这在许多文献中已经有报道, 作者试图从这些中药材的药用成分对灵芝菌丝的生理生化作用的角度去阐述造成灵芝活性成分变化和药效变化的关系, 迄今还没有文献关于这些药用成分可以被灵芝或其他大型真菌菌丝吸收或转化内容的报道, 这也是我们今后努力的方向。但是本实验现有的结果无疑为灵芝药效的定向选择提供了思路。

参考文献

- [1] 郑虎占, 董泽宏. 中药现代研究与应用. 北京: 学苑出版社, 1997: 2496-2499.
- [2] Ming-shi Shiao Ms. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record*, 2003, 3(3): 172-180.
- [3] 张朗, 黄能慧. 灵芝三萜类化合物对小鼠抗应激能力的影响. 贵阳医学院学报(*Journal of Guiyang Medical College*), 2007, 32(2): 135-136.
- [4] 李平作, 章克昌. 灵芝胞外多糖的分离纯化及生物活性. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2000, 40(2): 217-220.
- [5] Ahmadi K, Riazipour M. Effect of *Ganoderma lucidum* on cytokine release by peritoneal macrophages. *Iran J Allergy Asthma Immunol*, 2007, 4(4): 220-226.
- [6] 江振友, 林晨. 灵芝多糖对小鼠体液免疫的影响, 暨南大学学报(*Journal of jinan university*), 2003, 24(2): 51-53.
- [7] Zhang J, Tang Q, Zimmerman-Kordmann M. Activation of Blymphocytes by GLIS, a bioactive proteolytan from *Ganoderma Lucidium*. *Life Sciences*. 2002, 71(6): 623-628.
- [8] Jeurink PV, Noguera CL, Savelkoul HF, Wiehers I-IJ. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*, 2008, 8(8): 1124-1133.
- [9] 曹立珍, 林志彬. 椴木栽培及袋栽灵芝多糖对体外培养小鼠脾淋巴细胞增殖活性的比较. 药学报(*Acta Pharmaceutica Sinica*), 2003, 38(2): 92-97.

- [10] 何亚维, 黄泉寿, 李虹阳. 桔梗不同生长期及主要器官中皂甙和糖含量分析. 南京中医学院学报 (*Journal of Nanjing College of Traditional Chinese Medicine*), 1992, 8(1): 22-26.
- [11] 谭伟, 郑林用, 罗霞. 灵芝生物学及生产新技术. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2007.
- [12] 中华人民共和国药典. 化学工业出版社, 2005: 131.
- [13] 弓晓峰, 谢明勇, 陈奕. 黑灵芝中三萜及其皂苷类化合物总量的光度测定. 天然产物研究与开发 (*Natural Product Research and Development*), 2006, 18: 825-829.
- [14] 陈奇. 中药药理研究方法学. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 170.

Active ingredients and efficacies of *Ganoderma lucidum* cultivated on non-medicinal parts of Chinese medicinal herbs

Yaohui Guo¹, Xia Luo², Mengyao Yu², Linyong Zheng^{1,3*}

¹ Resources and Environment Institute of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625000, China

² Sichuan Institute of Chinese Material Medica, Chengdu 610041, China

³ Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China

Abstract: [**Objective**] *Ganoderma lucidum* was cultivated on non-medicinal parts of *Salvia miltiorrhiza*, *Chrysanthemum morifolium*, *Platycodon grandiflorum*, as all are Chinese traditional herbal medicines. We studied the changes of active ingredients and efficacies of the *Ganoderma lucidum* fruit bodies. [**Methods**] The agronomic characters, polysaccharide and terpene contents, acute toxicity and efficacy of *Ganoderma lucidum* grown on the non-medicinal part of the three materials were compared with that grown on the ordinary formula group (OF.G) which was composed of corn cob, cotton seed shell. [**Results**] Biological conversion efficiencies of the *Ganoderma lucidum* fruit body using non-medicinal parts were higher than that of using the ordinary formula group (OF.G), though growth periods became longer; Contents of active ingredients were all improved except that the terpene content of the *Salvia miltiorrhiza* group was decreased. Both polysaccharide and terpene from the *Chrysanthemum morifolium* group were the highest, contents of which were respectively 2.47% and 0.79%; Acute toxicity test showed that *Ganoderma lucidum* fruit bodies were all with low toxicities. Mice maximum tolerance dose were 100 g/kg weight. In hemolysin test and sleeping promotion test, the *Chrysanthemum morifolium* group showed better effect than the ordinary formula group (OF.G). In anti-fatigue test, only the ordinary formula group (OF.G) proved to be more effective. [**Conclusion**] It's feasible to cultivate *Ganoderma lucidum* and active ingredients and efficacies of *Ganoderma lucidum* have been changed using the non-medicinal parts of Chinese medicinal herbs.

Keywords: the Non-medicinal part, *Ganoderma lucidum*, polysaccharide, terpene, efficacy

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Agricultural Industrial Technology System [sichuan agricultural (2009) 75], by the National Agricultural Industrial Technology System Medicinal Fungus Cultivation Post and by the Sichuan Technology Platform Construction Projects: Agricultural Microorganism Strains Resources Integration and Standardized Sorting, Shared Services

* Corresponding author. Tel: +86-28-84504005; E-mail: zly6559@126.com

Received: 10 December 2010/ Revised: 27 January 2011