

## 灵芝孢子副产物体外抗氧化活性的研究

陈亚莉<sup>1</sup>, 逢增润<sup>1</sup>, 张雯<sup>1\*</sup>, 徐靖<sup>2</sup>, 王瑛<sup>3</sup>, 郑化先<sup>2</sup><sup>1</sup>华东师范大学生命科学学院, 上海 200241; <sup>2</sup>浙江寿仙谷生物科技有限公司;<sup>3</sup>浙江省珍稀植物药工程技术研究中心, 浙江 321200

**摘要:** 利用有机溶剂萃取法获得灵芝孢子副产物五个不同极性部位, 以总抗氧化能力(T-AOC)及羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )和2,2-(4-叔辛基苯基)-1-苦肼基自由基(DPPH $\cdot$ )的清除能力为评价指标筛选最优抗氧化活性部位, 并对其进行抗脂质过氧化研究, 结果显示: 不同极性部位均能清除上述自由基, 其中乙酸乙酯相活性最强。进一步研究发现, 乙酸乙酯相能够显著抑制 $\beta$ -胡萝卜素/亚油酸体系, 同时对小鼠肝脏自氧化及 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的肝脂质过氧化和红细胞过氧化溶血均有较好保护作用。实验表明: 灵芝孢子副产物不同极性部位提取物均具有一定程度的抗氧化活性, 其中乙酸乙酯相活性最强。

**关键词:** 灵芝孢子副产物; 自由基; 乙酸乙酯相; 脂质过氧化

中图分类号: R285

文献标识码: A

Antioxidant Activities of Extracts of By-products of *Ganoderma lucidum* SporesCHEN Ya-li<sup>1</sup>, PANG Zeng-run<sup>1</sup>, ZHANG Wen<sup>1\*</sup>, XU Jing<sup>2</sup>, WANG Ying<sup>3</sup>, ZHENG Hua-xian<sup>2</sup><sup>1</sup>School of life science, East China Normal University, Shanghai 200241; <sup>2</sup>Zhejiang Shouxiangu Biology Sci-tech Co. Ltd.; Wuyi; <sup>3</sup>Zhejiang Research Center of Rare Plant Medicine Engineering and Technology; Wuyi, Zhejiang 321200, China

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the antioxidant activities of by-products of *Ganoderma lucidum* spores. Ethanol soluble extract of by-products of *Ganoderma lucidum* spores was prepared by 80% alcohol, followed by fractional extraction respectively with petroleum ether, chloroform, ethyl acetate and n-butanol. Then the antioxidant activities of above five different fractions were evaluated by T-AOC and free radical-scavenging power like DPPH $\cdot$  and  $\cdot\text{OH}$  to identify the most efficient fraction. The results indicated that all fractions showed high radical scavenging efficiency, especially the ethyl acetate fraction (EA) which was chosen to take a further study on anti-lipid peroxidation. In this study, the protective effects of EA at 0.5 mg/mL on  $\beta$ -carotene/linoleic acid system was 70.32%. The inhibitory activity of EA at 2 mg/mL on hemolysis of erythrocytes and lipid peroxidation of mice homogenate induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  were 41.39% and 51.00%. Taking together, each extract has significant antioxidant activities, especially the ethyl acetate extract.

**Key words:** by-products of *Ganoderma lucidum* spores; free radicals; ethyl acetate extract; lipid peroxidation

灵芝(*Ganoderma lucidum*)包括菌丝体和子实体两部分, 是我国传统珍贵药材, 具有很高的药用价值<sup>[1]</sup>。子实体成熟后木质化, 产生并释放出褐色孢子。由于灵芝孢子具有两层坚韧的外壁, 因此限制了对其化学组成和生物活性成分的认识。直到上世纪90年代, 人们才建立起有效的破壁方法, 从而促进了灵芝孢子生物活性成分的提取和药用价值的研究<sup>[2]</sup>。研究表明, 灵芝孢子含有多种氨基酸以及灵

芝多糖、灵芝酸、三萜类等有效成分, 具有广泛的药理作用, 如抗肿瘤<sup>[3]</sup>、抗衰老抗氧化<sup>[4]</sup>和降血脂<sup>[5]</sup>等。

在工业生产上, 人们通过孢子破壁技术和孢壁分离技术回收药用价值更高的孢子粉, 剩余部分为孢子副产物, 属于工业废渣, 含量高达75%, 造成极大资源浪费。由此, 我们以抗氧化能力为指标来评价副产品是否具有活性。现代医学证明: 衰老、癌症及炎症等疾病与自由基和体内脂质过氧化有直接关系, 对清除自由基和抑制脂质过氧化效应的探讨已得到普遍关注<sup>[6]</sup>。目前尚未见有对孢子副产物提取物抗氧化活性的研究报道, 为此, 本文以废弃的灵

收稿日期: 2013-05-13 接受日期: 2013-10-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(61172149); 浙江省产业技术创新战略联盟建设项目(2011LM201)

\* 通讯作者 Tel: 86-21-24201011; E-mail: wzhang@bio.ecnu.edu.cn

芝孢子副产物为材料,从自由基清除能力和抗脂质过氧化活性两方面展开研究,旨在为灵芝孢子副产物的开发和利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 药品与动物

总抗氧化能力(T-AOC)测试盒,南京建成生物工程研究所; DPPH,美国 Sigma 公司;β-胡萝卜素、亚油酸、肝素钠、硫酸亚铁( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、水杨酸、30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、盐酸、邻苯三酚、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、无水乙醇、硫代巴比妥酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三氯乙酸等试剂均为国产市售。

SPF 级 ICR 雄性小鼠,体重 18~20 g,上海西普尔-必凯实验动物有限公司。合格证号 SCXK(沪)2008-0016。

#### 1.1.2 主要仪器

RE-2000 型旋转蒸发仪,上海亚荣生化仪器厂; DHG-9246A 型电热恒温鼓风干燥箱,上海精宏实验设备有限公司;BioTekexl 800 酶联免疫测定仪,美国 BioTek 公司;HHS 型电热恒温水浴锅,上海博迅实业有限公司医疗设备厂;梅特勒-托利多 B-L 系列电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司; L-16R 台式高速冷冻离心机,上海市离心机机械研究所。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 原料预处理

灵芝孢子副产物,由浙江寿仙谷药业提供。置烘箱 50 °C 烘至恒重,密封避光保存备用。

#### 1.2.2 灵芝孢子副产物不同极性部位的制备

准确称取 100 g 灵芝孢子副产物粉末,加入 10 倍体积 80% 乙醇于 80 °C 下回流提取 3 次,抽滤并合并滤液,45 °C 减压浓缩后真空冷冻干燥,得到乙醇提取物 4.550 g。称取 4 g 醇提取物热水复溶后转入分液漏斗中,加入相同体积的石油醚,充分振摇后静置 8 h,收集上层石油醚部分;下层水溶液重复萃取至上层无色,合并萃取液,减压浓缩干燥后得到 2.333 g 石油醚相(PE)。石油醚萃取后的剩余水溶液按上述方法依次用二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取,分别得到 0.270 g 二氯甲烷相(T)、0.200 g 乙酸乙酯相(EA)、0.310 g 正丁醇相(B)。

#### 1.2.3 灵芝孢子副产物体外抗氧化活性部位的筛选

用含 1% DMSO 的无水乙醇将灵芝孢子副产物

不同极性部位提取物分别配制成 0.125、0.25、0.5、1 mg/mL 四个浓度梯度的样液备用。

#### 1.2.3.1 总抗氧化能力(T-AOC)测定

依照南京建成总抗氧化能力(T-AOC)测试盒方法进行。

#### 1.2.3.2 对·OH 自由基的清除能力

按照 Smirnoff 的方法<sup>[7]</sup>略作改动,在试管中依次加入 1 mL 6 mmol/L 的  $\text{FeSO}_4$  溶液,1 mL 6 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液和 1 mL 样液,混匀后加入 1 mL 0.1% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液启动反应,用蒸馏水补足至总体积 5 mL,充分混匀后于 37 °C 水浴 0.5 h,离心,于 510 nm 处测定吸光值,并计算该自由基的清除率。其中对照组以 1 mL 含 1% DMSO 的无水乙醇代替样液,样底组以乙醇代替水杨酸溶液。计算公式:清除率(%) =  $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$  ( $A_1$  为样液组平均吸光值; $A_2$  为样底组平均吸光值; $A_0$  为对照组平均吸光值)。

#### 1.2.3.3 对 DPPH 自由基的清除能力

按照 Kim 的方法<sup>[8]</sup>略作改动,在 1.9 mL 0.065 mmol/L 的 DPPH 自由基乙醇溶液中分别加入 0.1 mL 样液。25 °C 温浴 0.5 h,于 517 nm 处测定吸光值,并计算该自由基的清除率。其中对照组以 0.1 mL 含 1% DMSO 的无水乙醇代替样液,样底组以乙醇代替 DPPH 自由基溶液。计算公式:清除率(%) =  $[1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$  ( $A_1$  为样液组平均吸光值; $A_2$  为样底组平均吸光值; $A_0$  为对照组平均吸光值)。

#### 1.2.4 灵芝孢子副产物活性部位对脂质过氧化的抑制作用

选取上述试验中自由基清除效果最佳部位为研究对象,将其配置成 0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mg/mL 的水溶液作为样液备用。

#### 1.2.4.1 对β-胡萝卜素/亚油酸体系的抑制作用

按照 Siddhuraju 等的方法<sup>[9-11]</sup>略作改动。取 5 mg β-胡萝卜素溶于 10 mL 氯仿中,接着加入 250 μL 亚油酸和 3 mL 吐温-20,混匀后上旋转蒸发仪至氯仿完全挥发,加入 250 mL 氧饱和超纯水,超声溶解得乳浊液。取 5 mL 乳状液加入 1 mL 样液溶液,50 °C 温育 2 h,于 470 nm 处每隔 20 min 测定一次吸光值。其中以等体积蒸馏水代替样液作为空白对照组。

#### 1.2.4.2 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的红细胞溶血的抑制作用

参照曹群华等人的试验方法<sup>[12]</sup>。小鼠眼眶取

血,用肝素制成抗凝血,4℃,4000 rpm 离心 5 min,去除上层溶液,下层沉淀用预冷生理盐水洗涤 3 次制成 0.5% 的红细胞悬液备用。

取 0.5% 红细胞悬液 1 mL,分别加入 0.1 mL 试样,加入 0.5 mL 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应,混匀,于 37℃ 温育 1 h 后用生理盐水稀释 4 倍,4000 rpm 下离心 10 min,取上清于 415 nm 处测定 OD 值。其中以等体积蒸馏水代替样液作为空白对照组。

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - A/A_0) \times 100\%$$

(A 为试样的平均吸光值, A<sub>0</sub> 为空白对照的平均吸光值)

#### 1.2.4.3 对肝脏自发性脂质过氧化的抑制作用

参照娄翠等人的试验方法<sup>[13]</sup>。小鼠颈椎脱臼致死,迅速取出肝脏,用冰冷的生理盐水洗净后冰上配制成 10% 的肝脏匀浆液,备用。取 1 mL 肝匀浆液于玻璃试管中,加入 0.5 mL 不同浓度的样液,混匀后 37℃ 温育过夜,加入 1 mL 的 20% 三氯乙酸(TCA)溶液,混匀后再加入 1.5 mL 0.7% 的硫代巴比妥酸溶液于沸水中显色 15 min,4000 rpm 下离心 10 min,取上清于 532 nm 处测定 OD 值。其中以等体积蒸馏水代替样液作为空白对照组。

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - A/A_0) \times 100\%$$

(A 为样液的平均吸光值, A<sub>0</sub> 为空白对照的平均吸光值) 1.2.4.4 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的肝脏脂质过氧化的保护作用

取 1.2.4.3 制备的肝脏匀浆液 1 mL,加入 0.5 mL 不同浓度的样液,混匀并于 37℃ 温育 15 min,然后加入 0.1 mL 100 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 启动反应,充分混匀后继续温育 1 h,用 1 mL 20% 的三氯乙酸终止反应,混匀后加入 1 mL 0.7% 的硫代巴比妥酸溶液于沸水中显色 15 min,4000 rpm 下离心 10 min,取上清液于 532 nm 处测定 OD 值。其中以等体积蒸馏水代替样液作为空白对照组。

$$\text{抑制率}(\%) = (1 - A/A_0) \times 100\%$$

(A 为样液的平均吸光值, A<sub>0</sub> 为空白对照的平均吸光值) 1.3 数据处理

数据进行标准差分析,以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示。

## 2 实验结果

### 2.1 灵芝孢子壁体外抗氧化活性部位的筛选

#### 2.1.1 不同极性部位总抗氧化能力(T-AOC)的测定

由图 1 可以看出,在低浓度时各部位的总抗氧化能力均较弱,随着浓度的升高,各极性部位总抗氧

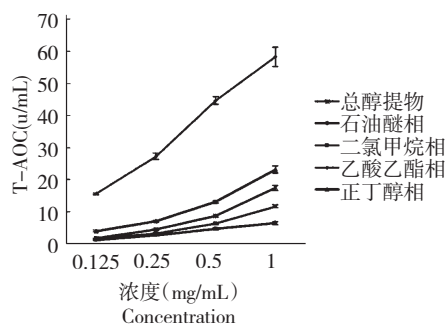


图 1 不同极性部位总抗氧化能力

Fig. 1 Total antioxidant capacity of five different fractions

化能力均明显增强,尤其是乙酸乙酯相,其活性明显优于其他极性部位,在 1 mg/mL 时总抗氧化能力值达到了 58.27 单位。

#### 2.1.2 不同极性部位对 DPPH· 的清除作用

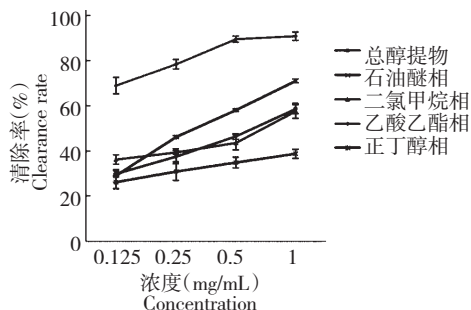


图 2 不同极性部位对 DPPH· 的清除作用

Fig. 2 DPPH· scavenging activity of five different fractions

DPPH 自由基是一种稳定的以氮为中心的自由基,其乙醇水溶液呈紫色。当有自由基的清除剂存在时,DPPH· 的单电子被捕捉致使其颜色变浅,在最大光吸收波长处吸光值也随之下落。由图 2 可知,灵芝孢子副产物各极性部位对 DPPH 自由基均具有明显的清除作用,而且在较低的质量浓度(0.125 mg/mL)下即有较高的清除效果。其中,乙酸乙酯

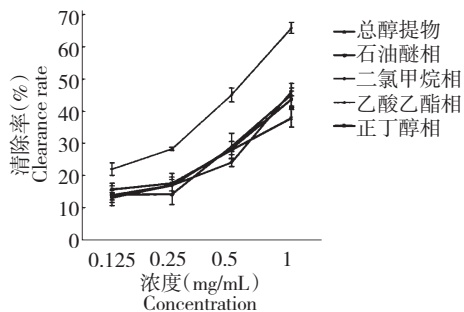


图 3 不同极性部位对 ·OH 的清除作用

Fig. 3 Scavenging activity of five different fractions on ·OH

相提取部位的抑制作用最强,在 0.5 mg/mL 时,清除率高达 89.45%。

### 2.1.3 不同极性部位对·OH 的清除作用

当有  $\text{Fe}^{2+}$  存在时,  $\text{H}_2\text{O}_2$  可生成具有很高反应活性的·OH,水杨酸能有效的捕捉·OH 并产生有色物质,该物质在 510 nm 处有强吸收。若加入具有清除·OH 作用的物质,便会与水杨酸竞争,使有色产物生成量减少。从图 3 可以看出,灵芝孢子壁五个极性部位对·OH 自由基均有较强清除能力,且清除率呈现明显的浓度梯度效应。对比发现,相同浓度下乙酸乙酯部位的清除能力最强,在 1.0 mg/mL 时,清除率达到 65.88%,其余部位则相对较弱,均在 40% 左右。

以上实验结果表明,灵芝孢子壁五个极性部位对自由基都表现出一定的清除作用,且在一定浓度范围内其清除率与浓度呈现正相关效应。综合评价这三种抗氧化体系的实验结果,乙酸乙酯相的抗氧化作用最强,其活性显著高于其余部位,因此选取乙酸乙酯相作为进一步的体外抗氧化研究对象。

## 2.2 乙酸乙酯相(EA)对脂质过氧化的抑制作用

### 2.2.1 对 $\beta$ -胡萝卜素/亚油酸体系的抑制作用

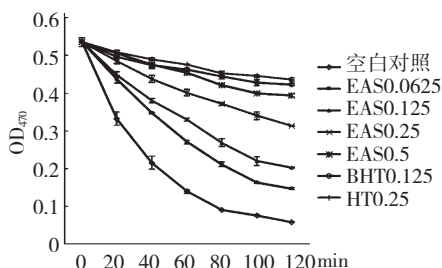


图 4 乙酸乙酯相对 $\beta$ -胡萝卜素/亚油酸氧化体系的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory abilities of EA in a  $\beta$ -carotene/linoleic acid system

$\beta$ -胡萝卜素与亚油酸耦合生成亚油酸自由基,该自由基上游离的氢攻击 $\beta$ -胡萝卜素分子,使其氧化褪色。当有抗氧化剂存在时,可抑制该自由基的作用,从而保护 $\beta$ -胡萝卜素。该体系褪色程度越低,说明抗氧化剂效果越好。如图 4 所示,在 $\beta$ -胡萝卜素/亚油酸体系中,乙酸乙酯相提取物明显减缓了 $\beta$ -胡萝卜素的褪色速率,且随着浓度的增加,其抑制作用显著增强。反应 2 h 后,0.5 mg/mL 的 EA 的抑制率达到 70.32%,与 0.125 mg/mL 的 BHT (74.62%) 相当;即使是低浓度(0.0625 mg/mL),其

抑制率也达到了 18.50%。由此可预见,EA 具有抗脂质过氧化活性。

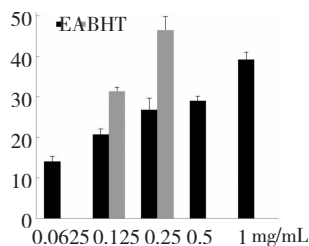


图 5 EA 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的红细胞氧化溶血的抑制作用

Fig. 5 Inhibition activity of EA on  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced hemolysis of mice erythrocytes

### 2.2.2 对 $\text{H}_2\text{O}_2$ 诱导的红细胞氧化溶血的抑制作用

脂质过氧化产物是造成细胞膜结构和细胞损伤的重要原因之一, $\text{H}_2\text{O}_2$  能够诱导红细胞发生氧化反应,破坏细胞膜而造成红细胞氧化溶血。由图 5 可看出,EA 对红细胞氧化溶血有明显的抑制作用,且在测试质量浓度范围内呈良好的量效关系。在 2 mg/mL 时抑制率达到 41.39%,而 0.125 mg/mL 的 BHT 的抑制率为 31.39%。由此可见 EA 在细胞水平上也能够有效抑制氧化损伤。

### 2.2.3 对肝脏自发性脂质过氧化的抑制作用

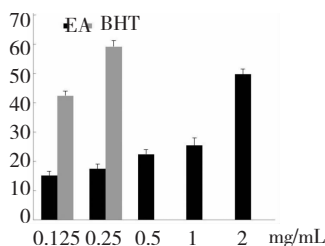


图 6 EA 对自发性肝脏脂质过氧化的保护作用

Fig. 6 Protective effects of EA on lipid peroxidation of mice liver homogenate

肝脏在体外会发生自发性脂质过氧化反应,产生毒害物质丙二醛(MDA),当有 MDA 抑制剂存在时,肝脏毒害降低。由图 6 可知,在所测定的范围内,随着 EA 浓度的升高,产生的 MDA 的生成量降低,对肝脏自发性脂质过氧化损伤的保护作用增强,并呈现出良好的浓度正相关趋势,在 2 mg/mL 时对 MDA 生成的抑制率达到 49.73%,而 0.125 mg/mL 的 BHT 的抑制率为 42.36%,这说明 EA 能够保护肝脏发生脂质过氧化。

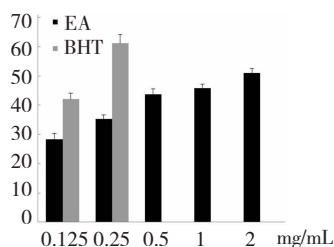


图7 EA对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的肝脏脂质过氧化的保护作用

Fig. 7 Protective effects of EA on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced lipid peroxidation of mice liver homogenate

#### 2.2.4 对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的肝脏脂质过氧化的抑制作用

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激肝脏产生过氧化物MDA,其量越多对组织的损害程度越高。由图7实验结果可知,在低浓度(0.125~0.5 mg/mL)范围内EA对MDA生成的抑制作用随着浓度的升高而显著增强,在2.0 mg/mL时对MDA生成的抑制率达到51.00%;0.125 mg/mL和0.25 mg/mL的BHT对MDA的抑制率分别为42.36%和56.10%,由此可见,2.0 mg/mL的EA的活性相当于0.25 mg/mL的BHT,表明能够有效保护H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的肝脏脂质过氧化反应。

### 3 讨论

从自由基理论提出以来,人们通过大量研究逐渐认识到活性氧(ROS)在多种疾病的发病过程中所起的重要作用。ROS包括超氧阴离子自由基(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>)、过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和羟自由基(OH·)等,这些自由基产生过量时能引起机体有机生物大分子如DNA、蛋白质和脂类的损伤,从而导致癌症、动脉硬化、衰老和多种老年慢性疾病<sup>[14,15]</sup>。其中由ROS引发的脂质过氧化反应是许多肝脏疾病的病因,如酒精性肝炎、血色病、内毒素性肝损害、急、慢性肝炎和肝硬化、肝脏肿瘤等<sup>[16]</sup>。如使用生物抗氧化剂切断过氧化链式反应可以抑制机体的自由基损伤,则能在一定程度上预防很多疾病的发生从而维持人体的健康状态。因此研究出天然的抗氧化剂具有重要意义。

灵芝孢子是灵芝的重要活性部位,含有灵芝酸、灵芝多糖等多种抗氧化活性成分,是自由基清除剂的良好载体<sup>[17,18]</sup>。灵芝孢子副产物是孢子粉回收后的废弃物,暂无其活性研究相关报道,本文以体外抗氧化系统来评价其抗氧化活性并筛选其活性最优部位,并对其进行一系列抗脂质过氧化研究。自由基清除法是传统的抗氧化能力测定方法之一,本文

以DPPH·和·OH自由基清除能力以及总抗氧化能力三个指标初步评价并筛选出灵芝孢子副产物最优抗氧化极性部位。综合这三个指标可知,五个极性部位对自由基都表现出良好的清除作用,尤其是乙酸乙酯相,其自由基清除能力显著高于其余部位,这提示我们,乙酸乙酯相提取物可能是良好天然抗氧化物质。为此,我们对该部位进行了进一步的抗脂质过氧化研究,分析实验结果可知,乙酸乙酯相提取物对自发性的肝脏脂质过氧化及H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的肝脏脂质过氧化和红细胞氧化溶血有明显的抑制作用,进一步验证其具有较好的抗氧化活性。虽然萃取出的具体活性物质及其活性机制尚不明确,但这些实验结果为灵芝孢子副产物的重新开发与利用提供理论依据和有利指导。

#### 参考文献

- Lin ZB(林志彬). Modern research of *Ganoderma lucidum* (灵芝的现代研究). Beijing: Publishing house of Peking Union Medical College and China Medical University, 1996.
- Huang JC(黄建城), Liu JH(刘建华), Gao YJ(高玉琼), et al. The advances of research on broken cellular wall spore of *Ganoderma lucidum*. *Chinese Journal of Medicine* (中华医药杂志), 2007, 2: 121-125.
- Gao L(高凌), Kang SH(亢寿海), Zhang NF(张能芳), et al. Antitumor effects of *Ganoderma* spore polysaccharide on experimental tumor. *Jiangsu Pharm Clin Res* (江苏药学与临床研究), 2005, 13(6): 7-8.
- Chen XJ(陈小君), Pan WG(潘伟光), Mei CE(梅承恩), et al. Study on the anti-ageing and antioxidative effects of five *Ganoderma*. *Chinese Pharma* (中国药理通讯), 2003, 20(3): 64-64.
- Yi YJ(衣艳君), Xu CS(徐承水). Experimental research on lowering the serum lipid effect of *Ganoderma lucidum*. *J Anhui Normal Univ, Nat Sci* (安徽师范大学学报, 自科版), 2001, 24: 52-53.
- Gong XF(弓晓峰), Xie MY(谢明勇), Chen Y(陈奕). Comparison of the antioxidative effects of extracts from *Ganoderma atrum* and *Ganoderma lucidum*. *Food Chem* (食品科学), 2006, 27(4): 44-47.
- Smironoff N, Cumbes Q. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 1989, 28: 1051-1560.
- Kim J, Kim H, Kim S, et al. Antioxidative compounds from *Quercus salicina* Blume Stem. *Arch Pharm Res*, 2008, 31: 274-278.