

# 灵芝子实体超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物 与醇提物生物活性的比较

章 慧<sup>1,2</sup>, 冯 娜<sup>1</sup>, 张劲松<sup>1,\*</sup>, 杨 焱<sup>1</sup>, 汪雯翰<sup>1</sup>, 贾 薇<sup>1</sup>, 唐庆九<sup>1</sup>, 潘迎捷<sup>2,\*</sup>

(1. 国家食用菌工程技术研究中心, 农业部南方食用菌资源利用重点实验室, 上海市农业科学院食用菌所, 上海 201403; 2. 上海海洋大学, 上海 201306)

**摘要:**采用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和醇提法对灵芝子实体进行提取, 利用体外抗肿瘤、抗神经细胞损伤和抗氧化模型比较了两种方法获得的萃取物生物活性的差异。在 100 μg/mL 时, 灵芝子实体超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物(SFE-CO<sub>2</sub>E)对肿瘤细胞 LNCaP、K562、HepG2 增殖的抑制率分别为 78.37%、87.09%、78.85%, 均高于灵芝子实体醇提物(EtOHE)的 60.65%、82.29%、66.15%; 在体外抗神经细胞损伤模型中, 在 200 μg/mL 时 SFE-CO<sub>2</sub>E 对 PC12 的修复率为 59.29%, 优于 EtOHE 的 17.77%; 然而在清除羟基自由基、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DPPH 自由基的实验中, 在 800 μg/mL 时, EtOHE 的清除率分别为 61.90%、67.33%、52.07%, 均高于 SFE-CO<sub>2</sub>E 的 29.24%、39.43%、17.05%。可见, 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和醇提法在提取灵芝子实体的不同的活性物质上各有优势。

**关键词:**超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物, 醇提物, 灵芝, 抗肿瘤, 抗衰老, 抗氧化

## Comparison on bioactivities of supercritical CO<sub>2</sub> fluid extracts and ethanol extracts from the fruit body of *Ganoderma lucidum*

ZHANG Hui<sup>1,2</sup>, FENG Na<sup>1</sup>, ZHANG Jin-song<sup>1,\*</sup>, YANG Yan<sup>1</sup>,  
WANG Wen-han<sup>1</sup>, JIA Wei<sup>1</sup>, TANG Qing-jiu<sup>1</sup>, PAN Ying-jie<sup>2,\*</sup>

(1. National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of South Mushroom Resource Utilization, Ministry of Agriculture, People's Republic of China; Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The comparison on bioactivities of two sorts of extracts from the fruit body of *Ganoderma lucidum* obtained from supercritical CO<sub>2</sub> fluid extraction (SFE-CO<sub>2</sub>) and ethanol extraction separately was investigated through applying a series of *in vitro* analytical methods including antitumor model, neurocyte anti-injury models and antioxidant model. The inhibition rate of supercritical CO<sub>2</sub> fluid extracts (SFE-CO<sub>2</sub>E) against proliferation of tumor cell LNCaP, K562 and HepG2 was 78.37%, 87.09% and 78.85% respectively when inhibitory concentration reached 100 μg/mL, which were higher than the inhibition effect of ethanol extracts (EtOHE) with 60.65%, 82.29% and 66.15% respectively. *In vitro* neurocyte anti-injury determination revealed that the repair effect of SFE-CO<sub>2</sub>E on cell PC12 (59.29%) was much more obvious compared with that of EtOHE (17.77%) at the concentration of 200 μg/mL. The free radical scavenging experiments, however, demonstrated the scavenging activity of SFE-CO<sub>2</sub>E (29.24%, 39.43% and 17.05% respectively) was greatly lower than that of EtOHE (61.90%, 67.33% and 52.07% respectively) in analytical sequence of ·OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and DPPH· when effective concentration reached 800 μg/mL. It was concluded that SFE-CO<sub>2</sub> and ethanol extraction indicates various advantages on extracting different bioactive substances from the fruit body of *Ganoderma lucidum*.

**Key words:** supercritical CO<sub>2</sub> fluid extracts; ethanol extracts; *Ganoderma lucidum*; antitumor; antiaging; antioxidant  
中图分类号: TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-0306(2013)05-0076-04

灵芝 [*Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) Karst.] 隶属于真菌门 (*Eumycota*), 担子菌亚门 (*Basidiomycotina*), 层担子菌纲 (*Hymenomycetes*), 无

隔担子菌亚纲 (*Holobasidiomycetidae*), 非褶菌目 (*Aphyllorphorales*), 灵芝菌科 (*Ganodermataceae*), 灵芝属 (*Ganoderma* P. Karst.) 真菌<sup>[1]</sup>, 是一种药用价值极高的药用真菌。灵芝和紫芝的干燥子实体 2010 年已被收录于《中华人民共和国药典》作为药材灵芝的来源。三萜是灵芝子实体中的主要有效成分之一, 具有广泛的药理作用<sup>[2]</sup>, 由于灵芝中的三萜成份复杂且含量低, 因此不易分离, 给灵芝三萜的深入研究和临床应用带来很大的限制。已有报道称超临界 CO<sub>2</sub>

收稿日期: 2012-08-24 \* 通讯联系人

作者简介: 章慧 (1985-), 女, 在读博士, 主要从事食、药用菌活性成分的提取、分离纯化、结构鉴定和生物活性的研究。

基金项目: 珍稀真菌高值利用技术与产品开发 (2012BAD36B05); 科技部国家十二五科技支撑项目。

萃取灵芝子实体的萃取物中三萜的含量及种类都高于醇提法<sup>[3]</sup>,但是对于萃取物的生物活性至今没有看到相关报道。因此本文利用多种体外模型比较超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和醇提法获得的灵芝提取物生物活性的差别,以期对灵芝子实体三萜生产工艺的改进及其药理作用的研究提供基础的科学数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

沪农灵芝 (*G.lucidum*) 1 号的子实体产于安徽金寨,由上海市农业科学院食用菌所加工技术和发酵工程研究室提供;人前列腺癌细胞株 LNCaP、人红白血病细胞株 K562、人肝癌细胞株 HepG2 和小鼠源性神经元样细胞 PC12 中国科学院上海生命科学院细胞资源中心;鲁米诺 (luminol)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (DPPH)、邻菲罗啉 (1,10-Phenanthroline monohydrate)、四甲噻唑蓝四氮唑盐 (MTT)、二甲亚砜 均为 Sigma 公司的产品;胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、RPMI-1640、DMEM 高糖培养基、马血清和胰酶 (含 0.25% EDTA) Gibco 公司;其余试剂 均为国产分析纯。

SFE-2000-2 型超临界流体萃取装置 美国 Thar 公司;Clarity PC 化学发光仪 BIO-TEK 公司;Synergy HT 多功能酶标仪 Bio-TEK 公司;CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;二氧化碳气体 质量分数为 99.9%,上海成功气体厂。

### 1.2 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和醇提法萃取灵芝子实体三萜

用超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和醇提法提取灵芝子实体三萜的方法参照文献[3]进行,提取物按作用浓度的 200 倍溶于 DMSO 中待用。

### 1.3 细胞培养

1.3.1 K562 悬浮细胞的培养 用 RPMI1640 完全培养基 (内含 100mL/L 胎牛血清,青霉素 100IU/mL,链霉素 100μg/mL),在 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下传代培养,混悬液 1000r/min 离心 3min 后收集细胞,再用 RPMI1640 培养基将细胞调成所需浓度。

1.3.2 LNCaP 和 HepG2 贴壁细胞的培养 用 RPMI1640 完全培养基在 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下传代培养,再用 0.25% 胰酶溶液消化后,混悬液 1000r/min 离心 3min 后收集细胞,再用 RPMI1640 培养基将细胞调成所需浓度。

1.3.3 神经细胞 PC12 的培养 用内含 25mL/L 胎牛血清和 150mL/L 马血清,青霉素 100IU/mL,链霉素 100μg/mL 的 DMEM 培养基,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的条件下对 PC12 细胞传代培养,后续步骤同 1.3.2。

### 1.4 抑制肿瘤细胞增殖实验

将细胞浓度为  $2 \times 10^4$  个/mL 肿瘤细胞悬浮液 199μL 加入到 96 孔板中,悬浮细胞 4h 后加入样品 1μL (贴壁细胞待 1d 后加入样品),以 DMSO 为阴性对照,5-Fu (20μg/mL) 为阳性对照,每个样品设 3 个重复,在 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下培养 72h 后加入 20μL MTT,继续培养 4h 后吸出培养液,并加入 150μL DMSO 溶解蓝紫色沉淀,置低速摇床上振荡均

匀后,用酶联免疫检测仪于 570nm 下测吸光值,用公式计算样品对细胞增殖的影响。抑制率 (%) =  $\{1 - [(OD_{\text{样品孔}} - OD_{\text{调零孔}}) / (OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{调零孔}})]\} \times 100$

### 1.5 对 PC12 神经细胞损伤修复实验

用胰酶将对数生长期的 PC12 细胞消化,然后用培养液将细胞稀释至  $5 \times 10^4$  个/mL,每孔 190μL 接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,加入 1mol/L 的 NaN<sub>3</sub> 处理液 10μL,处理 4h 后,将培养基吸出,每孔加入含有血清的 DMEM 培养液 199μL,然后加入 1μL 不同浓度的样品,每个样品重复 3 孔,设 NaN<sub>3</sub> 损伤对照组 (NaN<sub>3</sub> 处理后加 DMSO) 和正常对照组 (未加 NaN<sub>3</sub> 处理),置于 37℃ 和 5% CO<sub>2</sub> 培养 48h 后加入 20μL MTT,后续步骤同 1.4,通过 MTT 实验检测细胞存活率。用公式计算样品对损伤细胞的修复率。修复率 (%) =  $(OD_{\text{样品孔}} - OD_{\text{损伤孔}}) / (OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{损伤孔}}) \times 100$

### 1.6 抗氧化实验

将 SFE-CO<sub>2</sub>E 和 EtOHE 用 70% 乙醇溶液溶解为 5mg/mL 的储备液,将储备液用 70% 乙醇溶液稀释为 20、50、100、200、400、800μg/mL 的工作液,测定清除羟自由基、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DPPH 自由基实验方法均参照文献[4]进行,清除羟自由基的实验以 20μg/mL 的丁基羟基茴香醚 (BHA) 为阳性对照,清除 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的实验以 20μg/mL 的儿茶素 (Catechin) 为阳性对照,清除 DPPH 自由基的实验以 50μg/mL 的儿茶素 (Catechin) 为阳性对照。清除率 (%) = (空白发光值 - 样品发光值) / 空白发光值 × 100。

## 2 结果与分析

### 2.1 灵芝子实体超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物和醇提物对肿瘤细胞的抑制活性

2.1.1 对前列腺癌细胞 LNCaP 作用 在不同的浓度下 SFE-CO<sub>2</sub>E 对前列腺癌细胞株 LNCaP 的抑制率均高于 EtOHE (见图 1),两种萃取物对 LNCaP 的抑制作用均呈现浓度依赖性,在 100μg/mL 时,SFE-CO<sub>2</sub>E 对 LNCaP 的抑制率为 78.37%,EtOHE 为 60.65%。

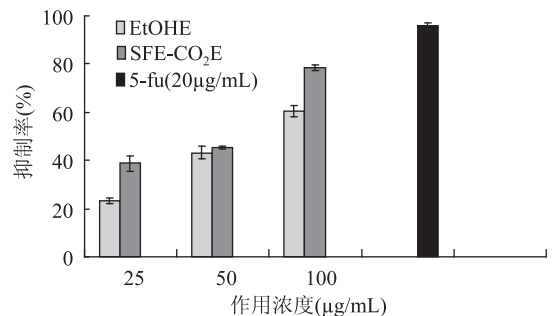


图 1 灵芝子实体 SFE-CO<sub>2</sub>E 和 EtOHE 对 LNCaP 细胞的生长抑制作用的比较

Fig.1 Comparison of the antiproliferative activities on LNCaP cells of SFE-CO<sub>2</sub>E and EtOHE from the fruit body of *Ganoderma lucidum*

2.1.2 对白血病细胞 K562 作用 在不同浓度下 SFE-CO<sub>2</sub>E 对白血病细胞株 K562 的抑制率均高于 EtOHE (见图 2),两种萃取物对 K562 的抑制作用均呈现浓度依赖性,在低浓度时两者差异明显,随着作

用浓度的升高两者的差距缩小。在  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  时, SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对 K562 的抑制率为 87.09%, EtOHE 为 82.29%。

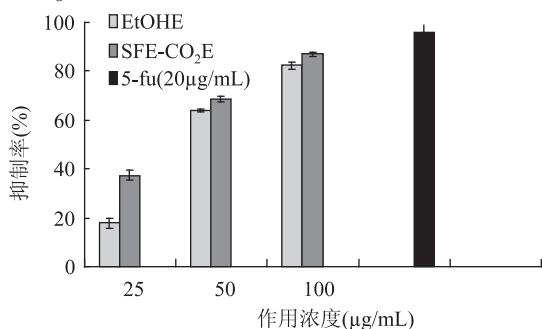


图2 灵芝子实体 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  和 EtOHE 对 K562 细胞的生长抑制作用的比较

Fig.2 Comparison of the antiproliferative activities on K562 cells of SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  and EtOHE from the fruit body of *Ganoderma lucidum*

2.1.3 对肝癌细胞 HepG2 作用 在不同浓度下 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对肝癌细胞 HepG2 的抑制率均高于 EtOHE (见图 3), 两种萃取物对 HepG2 的抑制作用均呈现浓度依赖性, 在  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  时, SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对 HepG2 的抑制率为 78.85%, 醇提物为 66.15%。

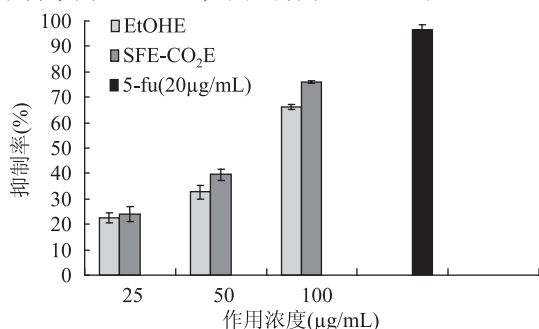


图3 灵芝子实体 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  和 EtOHE 对 HepG2 细胞的生长抑制作用的比较

Fig.3 Comparison of the antiproliferative activities on HepG2 cells of SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  and EtOHE from the fruit body of *Ganoderma lucidum*

## 2.2 灵芝子实体超临界 $\text{CO}_2$ 萃取物和醇提物对神经细胞 PC12 作用

在不同浓度下 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对  $\text{NaN}_3$  诱导 PC12 细胞活力下降的修复作用均明显的高于 EtOHE (见图 4), 两种萃取物的作用均呈现浓度依赖性, 在浓度达到  $200\mu\text{g}/\text{mL}$  时, SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对 PC12 的修复率为 59.29%, EtOHE 为 17.77%。

## 2.3 灵芝子实体超临界 $\text{CO}_2$ 萃取物和醇提物的抗氧化活性

2.3.1 对羟基自由基的清除作用 在不同浓度下 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对羟基自由基的清除作用均明显的低于 EtOHE (见图 5), 两种萃取物对  $\cdot\text{OH}$  的清除作用均呈现浓度依赖性, 在低浓度时两种萃取物对羟基自由基的清除作用并不明显, 当浓度达到  $400\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 两种萃取物对羟基自由基的清除率大大的提高,

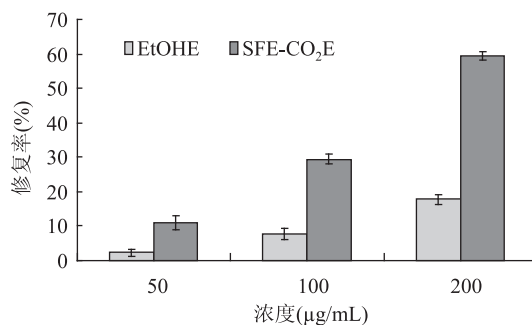


图4 灵芝子实体 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  和 EtOHE 对神经细胞 PC12 损伤修复作用的比较

Fig.4 Comparison of the repair effect of SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  and EtOHE from the fruit body of *Ganoderma lucidum* on activity injury of PC12 induced by  $\text{NaN}_3$

在浓度为  $800\mu\text{g}/\text{mL}$  时, SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  和 EtOHE 对羟基自由基的清除率分别为 29.24%、61.90%。

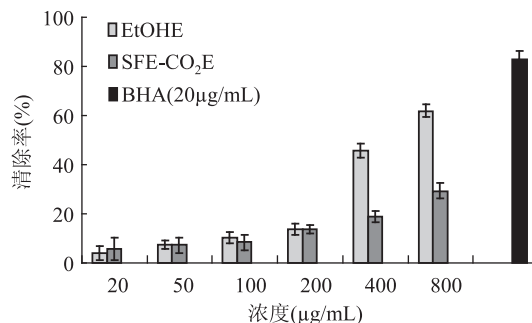


图5 灵芝子实体 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$

和 EtOHE 清除羟基自由基作用的比较

Fig.5 Comparison of the  $\cdot\text{OH}$  scavenging effect of SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  and EtOHE from the fruit body of *Ganoderma lucidum*

2.3.2 对过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )的清除作用 在不同浓度下 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用均明显的低于 EtOHE (见图 6), 两种萃取物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用均呈现浓度依赖性, 在低浓度时两种萃取物对羟基自由基的清除作用并不明显, 但随着浓度的提高, 两种萃取物对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除率大大的提高, 在浓度为  $800\mu\text{g}/\text{mL}$  时, SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除率为 39.43%, EtOHE 为 67.33%。

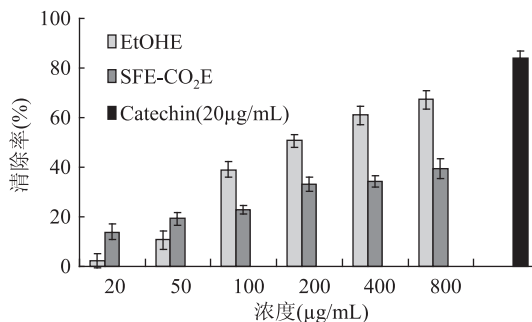


图6 灵芝子实体 SFE- $\text{CO}_2\text{E}$

和 EtOHE 对  $\text{H}_2\text{O}_2$  的清除作用

Fig.6 Comparison of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  scavenging effect of SFE- $\text{CO}_2\text{E}$  and EtOHE from the fruit body of *Ganoderma lucidum*

2.3.3 清除 DPPH 自由基 在不同浓度下 SFE-CO<sub>2</sub>E 对 DPPH· 的清除作用均明显的低于 EtOHE (见图 7), 两种萃取物对 DPPH· 自由基的清除作用均呈现浓度依赖性, 随着浓度的提高, EtOHE 对 DPPH· 的清除率大大的提高, 但 SFE-CO<sub>2</sub>E 却没有明显的变化。在浓度为 800 μg/mL 时, SFE-CO<sub>2</sub>E 对羟基自由基的清除率为 17.05%, EtOHE 为 52.07%。

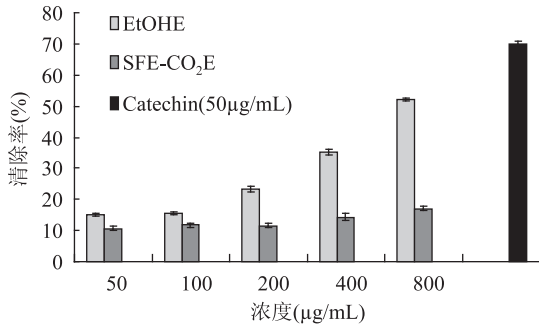


图 7 灵芝子实体 SFE-CO<sub>2</sub>E 和 EtOHE 清除 DPPH· 的实验

Fig.7 Comparison of the DPPH· scavenging effect of SFE-CO<sub>2</sub>E and EtOHE from the fruit body of *Ganoderma lucidum*

### 3 结论与讨论

目前市场上以灵芝为主要成分的保健品或中药的种类很多, 都具有较广阔的发展空间; 灵芝的科研成果转化为商品的力度还较小, 所以开发灵芝产品仍有很大的潜力。超临界 CO<sub>2</sub> 萃取具有溶解能力强、萃取效率高、天然环保等特点, 同时由于操作温度低, 能较完好地保存产品有效成分不被破坏, 因此, 广泛应用于医药、化工、食品、保健品等行业。笔者前期研究表明, 运用超临界萃取法制备灵芝子实体三萜与传统的醇提法相比, 虽然萃取得率和总三萜的萃取率略低于醇提法, 但是超临界 CO<sub>2</sub> 萃取物中三萜的种类和含量却多于醇提物<sup>[3]</sup>。灵芝三萜已被报道能抑制多种癌细胞的增殖<sup>[5-6]</sup>, 从总体上来说, 总三萜含量影响抑瘤活性<sup>[7]</sup>, 这与本文的研究结果相符合。本文的研究结果表明灵芝子实体的 SFE-CO<sub>2</sub>E 在抑制肿瘤细胞 LNCaP、K562、HepG2 的增殖活性方面都要优于 EtOHE。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's Disease, AD) 是一种与衰老密切相关的老年性疾病, 研究已证明此病患者线粒体内细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome c oxidase, COX) 活性明显降低, 此研究结果提示 COX 活性与衰老发生有着密切的联系<sup>[8]</sup>。叠氮钠 (sodium azide, NaN<sub>3</sub>) 作为一种特异性 COX 抑制剂, 已被广泛地应用于衰老的相关性研究, 它可以通过抑制 COX, 造成线粒体损伤, 导致一系列类似衰老现象出现<sup>[9]</sup>。目前对于灵芝提取物的抗衰老研究比较少见。本实验选用 NaN<sub>3</sub> 诱导 PC12 细胞损伤的修复模型比较了灵芝子实体的 SFE-CO<sub>2</sub>E 和 EtOHE 的抗衰老活性, 发现灵芝子实体的 SFE-CO<sub>2</sub>E 修复 NaN<sub>3</sub> 诱导 PC12 细胞损伤的活性要高于 EtOHE, 这可能也与 SFE-

CO<sub>2</sub>E 中三萜的种类和含量都要多于 EtOHE 有关。

现有报道的抗氧化方法较多, 然而对同种样品采用不同抗氧化方法评价, 结果往往存在差异, 目前尚无一种普遍、有效的抗氧化评价方法能够定量、精确地反映天然药物的抗氧化能力<sup>[10-11]</sup>, 因此笔者选用了清除羟基自由基、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 DPPH 自由基这 3 种典型的抗氧化模型进行综合评价, 在这三个实验中灵芝子实体的 EtOHE 表现出的活性要大大高于 SFE-CO<sub>2</sub>E, 但在抗肿瘤和抗衰老模型的实验中 SFE-CO<sub>2</sub>E 表现的活性比 EtOHE 强。导致这一差异的具体原因推测可能与 SFE-CO<sub>2</sub>E 的提取物中包含有色素等杂质有关, 其化学基础还有待进一步研究。

有文献提出超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法提取灵芝子实体可替代醇提法且较醇提法优越<sup>[12]</sup>, 本研究认为未必如此。实际应用中应以产品的用途来选择提取方法, 如开发抗肿瘤功能产品就应以超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法来提取, 如开发抗氧功能性产品就应以醇提法来提取。

### 参考文献

- [1] 邵力平, 沈瑞祥, 张素轩, 等. 真菌分类学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1983, 1-345.
- [2] 罗俊, 林志彬. 灵芝三萜类化合物药理作用研究进展 [J]. 药学学报, 2002, 37(7): 574-578.
- [3] 章慧, 张劲松, 贾薇, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取灵芝子实体三萜工艺优化及其与醇提法比较研究 [J]. 食用菌学报, 2011, 18(3): 75-79.
- [4] 王钦博. 桑黄抗氧化活性成分的筛选及其分离纯化 [M]. 上海: 上海师范大学, 2011.
- [5] LIN SB, LIA CH, LEE SS, et al. Triterpene-enriched extracts from *Ganoderma lucidum* inhibit growth of hepatoma cells via suppressing protein kinase C, activating mitogen-activated protein kinases and G2-phase cell cycle arrest. [J]. Life Sciences, 2003, 72: 2381-2390.
- [6] L I CH, CHEN PY, CHAN G UM, et al. Ganoderic acid X, a lanostanoid triterpene inhibit stopoisomerases and induces apoptosis of cancer cells [J]. Life Sciences, 2005, 77: 252-265.
- [7] 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 [J]. 菌物学报, 2005, 24(2): 251-258.
- [8] Parker WD Jr, Filley CM, Parks JK. Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease [J]. Neurology, 1990, 40(8): 1302-1303.
- [9] 秦艳, 张婷婷, 赵蕾, 等. 叠氮钠损伤的神经元内硫氧还蛋白 mRNA 水平的变化 [J]. 实验生物学报, 2002, 35(1): 26-30.
- [10] YANG JH, LIN HC, MAU JL. Antioxidant properties of several commercial mushrooms [J]. Food Chem, 2009, 115(2): 581-584.
- [11] NIKI E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2010, 49(4): 503-515.
- [12] 贾晓斌, 宋师花, 陈彦, 等. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取法和醇回流法提取灵芝中三萜类成分的比较 [J]. 中成药, 2010, 32(5): 868-871.