

## 灵芝多糖 GLP 的抗疱疹病毒作用机理

刘 静<sup>1</sup>, 阳 帆<sup>1</sup>, 李珊珊<sup>1</sup>, 王玉华<sup>1</sup>, 杨小骏<sup>1</sup>, 吴正辉<sup>1</sup>, 郜金荣<sup>1,2</sup>, 叶林柏<sup>1\*\*</sup>

(1. 武汉大学生命科学院 病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉 430072; 2. 武汉科技大学中南分校, 湖北 武汉 430223)

### Inhibition of Herpes Simplex Virus Infection by a GLP Isolated from Mycelium of *Ganoderma lucidum*

LIU Jing<sup>1</sup>, YANG Fan<sup>1</sup>, LI Shan-shan<sup>1</sup>, WANG Yu-hua<sup>1</sup>, YANG Xiao-Jun<sup>1</sup>, WU Zheng-hui<sup>1</sup>, GAO Jin-rong<sup>1,2</sup>, YE Lin-bai<sup>1\*\*</sup>

(1. College of Life Sciences, state Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. Zhongnan Branch, Wuhan University of Science and Technology, Hubei 430223, China)

**Abstract :** We reported here that a *Ganoderma lucidum* polysaccharide (GLP), one of the components extracted and purified from the liquid fermentation of mycelium of *Ganoderma lucidum*, was active against HSV-1 infection in Vero cells. The CC<sub>50</sub> (50 % cytotoxic concentration) value of GLP for Vero cells growth was more than 2000 μg/mL. The EC<sub>50</sub> (50 % effective concentration) of GLP for virus yield reduction assay was 4.6 μg/mL and 11 μg/mL when virus or Vero cells were pre-mixed with GLP, 17 μg/mL when virus and GLP were added into the cell culture simultaneously, and 50 μg/mL when GLP was added after virus infection. Meanwhile, the selective index (SI, ratio of CC<sub>50</sub> to EC<sub>50</sub>) of GLP were more than 435, 182, 118 and 40, respectively. There was no significant antiviral activity to be detected when the GLP was presented in the culture after beginning infection and before progeny virus release. Quantitative real-time PCR of the infective supernatant further confirmed that the GLP blocked HSV-1 infection at early stages of the infection.

**Key words :** *Ganoderma lucidum* Polysaccharide; Antiviral Activity; Mechanism

**摘要 :** 从灵芝菌丝体中分离得到的多糖 GLP 具有抑制单纯疱疹病毒 I 型感染的作用, 并对 GLP 抑制疱疹病毒复制的作用机制进行了初步探讨。GLP 对 Vero 细胞的 CC<sub>50</sub> 值大于 2 000 μg/mL, GLP 在疱疹病毒感染细胞前、感染后和病毒感染细胞时加入到细胞悬液中的 EC<sub>50</sub> 分别为 4.6、50 和 17 μg/mL; 而如果将 GLP 与细胞共同孵育后再用病毒去感染, 其 EC<sub>50</sub> 为 11 μg/mL。同时, GLP 抑制病毒感染的选择指数分别为 435、40、118 和 182。如果在病毒感染细胞后加入 GLP, 在病毒的生物大分子的合成完成后而子代病毒粒子还未释放出来前去掉 GLP, 这时 GLP 对病毒感染就没有抑制作用。定量 PCR 试验进一步证明 GLP 发挥抑制疱疹病毒感染作用是通过阻断病毒感染细胞早期与细胞表面蛋白的吸附来实现的。

**关键词 :** 灵芝多糖; 抗疱疹病毒; 作用机制

**中图分类号 :** R373 **文献标识码 :** A **文章编号 :** 1003-5125(2005)04-0362-04

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 是一类大型真菌, 属于担子菌纲, 多孔菌属, 灵芝科。由于灵芝具有较高的药用价值, 可以被用来预防和治疗多种疾病如高血压、支气管炎、关节炎、神经衰弱、肝病、慢性肝炎、肾炎、胃溃疡、肿瘤性疾病、高胆固醇症、免疫失

调以及硬皮症等。灵芝由于它潜在的药效和广泛地被人们认可, 因而在中国或亚洲的其他一些国家有着广泛地应用。灵芝无毒而且服用非常安全<sup>[1,2]</sup>, 因此值得我们研究<sup>[3]</sup>。

单纯疱疹病毒能够给人类造成多种疾病的病毒,

收稿日期: 2004-12-27, 修回日期: 2005-02-05

作者简介: 刘 静 (1963-), 男, 湖北武汉籍, 博士研究生, 从事抗病毒药物研究

\*\* 通讯作者: Corresponding author. Tel: 027-68752372, E-mail: linbaiye@whu.edu.cn

包括有急性的和周期性的疾病。甚至有的报道认为单纯疱疹病毒的感染会给人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)的感染提供机会<sup>[4]</sup>, HSV-1 可以引起神经性的疾病,它能在外周神经中枢进行转移并感染神经元<sup>[5,6]</sup>。临床上用于治疗单纯疱疹病毒的药物一般有干扰素、阿昔洛韦(acyclovir, ACV)、ara-A (vidarabine)、DHPG(ganciclovir)以及 PFA(phosphonoformic acid)。但是这些药物在治疗疾病的同时往往伴随有不利副反应。如有毒、引起突变、导致宿主细胞的畸变和对药物产生耐受性等<sup>[7]</sup>。因此能找到能抑制疱疹病毒复制同时又不产生副作用的抗病毒药物是非常必要的。我们的研究已经证明灵芝多糖能够抑制 I 型和 II 型疱疹病毒的复制<sup>[8]</sup>,但是其抗病毒作用机制还不十分清楚。

灵芝被报道含有多种具有生物活性的成分<sup>[9-11]</sup>。多糖和三萜类是灵芝的两种重要的活性成分。有研究者报道三萜类具有抗氧化、肝保护、降血压和降低胆固醇的作用<sup>[12]</sup>。作为灵芝的主要活性成分的灵芝多糖的研究已有 30 多年的历史了,研究者发现灵芝多糖具有免疫调节功能、抑制肿瘤生长以及防止病毒入侵等功能<sup>[13-15]</sup>。Miyazaki 和 Nishijima 从灵芝子实体中分离得到的异聚多糖具有抗肿瘤的活性<sup>[16]</sup>。

虽然灵芝的子实体和孢子粉作为药物应用了近 2000 年的时间,但至今还尚未见到有关从灵芝菌丝体中提取有效成分用于抗病毒的研究。本文就是从灵芝的菌丝体中提取多糖并对多糖的抗病毒活性以及作用机制进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

发酵用的灵芝菌种由广东省微生物研究所陶家法副研究员赠送。灵芝菌丝体多糖 GLP 的提取按文献的方法<sup>[8]</sup>进行,单纯疱疹病毒 I 型(HSV-1, No. SM40)由湖北省疾病预防控制中心病毒研究所龚镇奎研究员惠赠。细胞培养板是美国 Falcon 公司产品。结晶紫由美国 Sigma 公司出品。荧光标记探针由大连宝生物工程公司合成。基因扩增仪 Rotor-Gene 3000 是澳大利亚 Corbett Research 公司产品。

### 1.2 空斑试验

空斑减少试验<sup>[17]</sup>一共分为 5 组,即分别在病毒感染细胞前、感染中和感染后用 GLP 处理病毒。感染前不仅病毒用 GLP 孵育,同时另设一组将 Vero

细胞用 GLP 孵育,这两组在 GLP 分别与病毒或细胞孵育 1h 后,再分别将孵育好的病毒加到细胞中或将病毒加到用 GLP 孵育好的细胞中,然后让它们保温吸附 2h;感染后用 GLP 处理病毒就是将病毒和 GLP 同时加到细胞中去感染细胞;感染后处理就是在病毒吸附感染 2h 后再加入 GLP;另外,在病毒吸附感染 2h 后,加入含有不同浓度 GLP 的琼脂糖, GLP 浓度从 0.78 $\mu$ g/mL 至 100 $\mu$ g/mL,于 37 $\pm$ 5% CO<sub>2</sub> 继续培养 48~72h,然后用结晶紫染色观察空斑形成情况。但是增加了一组,这一组是在病毒感染细胞 2h 后再加入 GLP, GLP 与感染了病毒的细胞共同培养 14h,然后去掉 GLP,用 PBS 洗净。按前述的研究方法进行空斑试验,最后加入的 0.5% 的低熔点琼脂糖,琼脂糖中不含 GLP。

### 1.3 引物和探针的设计

以 GeneBank 上的 HSV-1 的序列作为参考,用 Primer Premier 5.0 软件针对 HSV-1 的 US7 基因设计并选出一对引物,上游引物从 221bp 到 241bp, 5'-GACGGCGTAGTGGAGGAA GAC-3';下游引物从 499bp 到 481bp, 5'-CCTCTGGACCCGCAAAAGC-3',引物覆盖范围为 279bp,探针位于 301-326bp,长度为 26bp,序列为 5'-CGATGGGGGCGTAGAGCTGTGGCACT-3',其 5'端标记有荧光基团 FAM,3'端带有淬灭基团 TAMRA,引物和探针均由大连宝生物工程有限公司合成。

### 1.4 定量 PCR 标准品的制备

实验所用的标准品为扩增得到的与定量扩增片段相同的 US7 基因片段。常规 PCR 扩增得到的片段经纯化鉴定后测定浓度,然后计算出所得到的样品的分子数,再作为标准品在进行定量 PCR 时做对照。

### 1.5 病毒 DNA 的提取

参照文献<sup>[18]</sup>病毒 DNA 提取方法略作修改进行。

### 1.6 常规 PCR

PCR 反应在 Biometra 热循环仪(德国 Whatman 公司)上进行。总体积 25 $\mu$ L。PCR 扩增结束后用 1.5% 琼脂糖电泳分析扩增结果。

### 1.7 定量 PCR 检测

定量 PCR 在基因扩增仪 Rotor-Gene 3000(澳大利亚 Corbett Research 公司产品)上进行。反应结束后,直接由仪器自带软件计算给出定量结果。

## 2 结果

### 2.1 空斑减少试验检测 GLP 的抗病毒作用

通过空斑减少试验来确定 GLP 的抗病毒活性,

图 1 显示,如果把 Vero 细胞或病毒用 GLP 分别进行处理后再进行感染,结果发现,如果将细胞与 GLP 共同孵育 1h 后,再用 HSV-1 感染,当 GLP 浓度达到  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  时,几乎可以完全抑制空斑的形成,GLP 抑制空斑的形成率为 98% (图 1A);如果将 GLP 和 HSV-1 共同孵育 1h 后,再去感染 Vero 细胞,当 GLP 浓度达到  $100\mu\text{g}/\text{mL}$  时,GLP 对空斑形成的抑制率可以达到 96% (图 1B)。

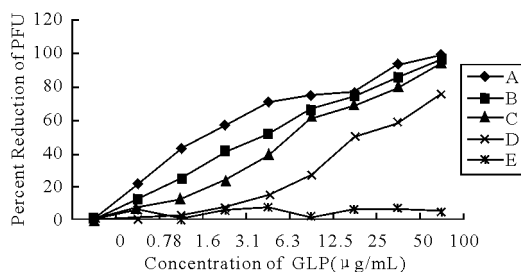


图 1 不同浓度 GLP 和处理时间对空斑形成的影响

Fig. 1 Plaque forming units in different concentration of GLP

Ratio of inhibition: test group divided by control group and multiply 100%. A: Vero cells were treated with GLP before HSV-1 infection. B: HSV-1 were treated with GLP before infection. C: GLP and HSV-1 were present during infection of Vero cells simultaneously. D: GLP was added after HSV-1 infected. E: GLP was added after HSV-1 infected, and inoculums treated with GLP for 14h and removed before progeny virus released.

从图中我们可以得出,在不同时期加入 GLP 所得到的  $\text{EC}_{50}$  分别为  $4.6\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $11\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $17\mu\text{g}/\text{mL}$  和  $50\mu\text{g}/\text{mL}$  (图 1A、B、C、D)。根据 MTT 和台盼兰试验我们检测得到 GLP 的  $\text{CC}_{50}$  值大于  $2000\mu\text{g}/\text{mL}$ ,因此在感染前用 GLP 分别处理疱疹病毒和 Vero 细胞的选择指数分别为 435 和 182;如果 GLP 和病毒同时加入感染细胞的 SI 为 118;而如果在病毒感染细胞后加入 GLP 其 SI 为 40。

为了进一步研究在病毒吸附感染后 GLP 是否抑制病毒的生物大分子的合成过程,我们在病毒吸附感染后加入 GLP,浓度从  $0.78\mu\text{g}/\text{mL}$  到  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在 GLP 作用 14h 后移去 GLP,同时用 PBS 洗净,再加入含有 2% 血清的细胞培养维持液,再继续观察空斑的形成,图 1E。结果显示,即使 GLP 浓度达到  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ ,空斑形成没有受到任何抑制。由此可见,GLP 不能抑制病毒的生物大分子的合成,GLP 对病毒的抑制作用是通过抑制病毒对细胞的吸附或进入来实现的。

## 2.2 病毒样品的 PCR 扩增片段的特异性分析

各取在病毒感染 Vero 细胞上清液和病毒原液,以双蒸水和 HCV 全长的质粒为阴性对照,标准为阳性对照,经常规 PCR 扩增,1.5% 琼脂糖凝胶

电泳分析显示,病毒样品、感染细胞的上清液扩增的片段大小与标准品一致,阴性对照均没有扩增片段出现,表明该引物对 HSV-1 的 US7 基因片段的扩增为特异性扩增,没有假阳性。

## 2.3 GLP 抑制 HSV-1 吸附细胞

定量 PCR 的结果显示 (表 1),如果没有 GLP 的存在,约有 79% ( $6.3 \times 10^5$ ) 的病毒粒子可以吸附在细胞表面而感染细胞,只有 21% ( $1.7 \times 10^5$ ) 的病毒粒子还残存在培养液内 (表 1);另一方面,如果将 GLP 与病毒粒子孵育 1h 后再去感染 Vero 细胞,那么就有近 93% ( $7.4 \times 10^5$ ) 的病毒粒子还存在于培养液中,只有 7% ( $0.6 \times 10^5$ ) 的病毒粒子吸附到了细胞表面;如果将 GLP 和病毒同时加入到细胞中去感染,那么就有 90% ( $7.2 \times 10^5$ ) 的病毒粒子仍然存在于培养液中,有 10% 的病毒粒子吸附到了细胞表面;通过设立的只有 GLP 和 HSV-1 以及只有 HSV-1 的对照,从表 3 就可以知道 GLP 不能影响病毒粒子是否吸附到载体上。

表 1 定量 PCR 检测 GLP 抑制病毒感染的结果

Table 1 Quantitative real-time PCR to examine the copy numbers of HSV-1 genome base on US7 gene presented in inoculums before and after infected Vero cells before and after treated with GLP

Groups	Copies / mL <sup>a</sup>	Ratio <sup>b</sup> (%)
Control (only HSV-1)	$8.0 \pm 0.19 \times 10^5$	100 %
HSV and GLP	$8.1 \pm 0.13 \times 10^5$	100 %
HSV-1 infected to Vero cells alone	$1.7 \pm 0.22 \times 10^5$	21
GLP incubated with HSV-1 for 1h then infected to Vero cells for 2h	$7.4 \pm 0.26 \times 10^5$	93
GLP, HSV-1 and Vero cell were presented simultaneously	$7.2 \pm 0.13 \times 10^5$	90

a: The copies were measured by quantitative real-time PCR, which was present in inoculums. Viral copies of control group decreased that considered virus adsorbed in cell membrane. b: Test group divided by control group and multiply 100%. The data were reported in the table as a mean values  $\pm$ S. D. for at least three separate experiments.

## 3 讨论

我们以前的研究工作已经证明了从灵芝菌丝体中提取的多糖类物质具有抗病毒活性,与目前的现有的抗病毒药物阿昔洛韦 (ACV) 相比 GLP 用于抗病毒具有更为有利的优点<sup>[8]</sup>。同时对多糖的抗病毒机理进行了初步的研究。为了更清楚地阐明 GLP 的抗病毒作用机制,我们进行了空斑试验和定量 PCR 试验。空斑试验中,图 1A、B、C、D 的结果进一步说明了 GLP 的抗病毒效应是通过抑制病毒的吸附或进入过程来实现的。但是为了阐明 GLP 在病

毒感染细胞后是否影响病毒的生物大分子合成,我们在细胞被病毒吸附感染 2h 后将 GLP 加入到感染的细胞中共同培养 14h,然后再移去 GLP,结果 GLP 对病毒的感染没有任何抑制作用(图 1E)。其原因就在于 HSV-1 在感染细胞后的 4h 左右便开始生物大分子的合成,大约在 12h 后就开始释放子代病毒粒子,虽然这时 GLP 一直存在,但由于 GLP 对病毒生物大分子的合成没有抑制作用,所以当 14h 后移去 GLP 后,病毒的子代病毒便释放出来,由于这时 GLP 已经被移去,阻止病毒感染吸附的因子已经被清除,所以这时的不能被中和,子代病毒就会再去感染其它的细胞,这样形成的空斑数与没有 GLP 加入时病毒感染细胞形成的空斑数相同,也就是说 GLP 对病毒的生物大分子的合成以及后面的装配释放过程没有任何影响。

表 1 是定量 PCR 的结果。从表 1 我们可以看到,对照组的病毒悬液的滴度是  $8.0 \times 10^5$ ,如果将病毒和 GLP 混合 1h, GLP 对病毒的拷贝数没有影响,不会因为 GLP 的存在影响病毒与培养板之间的相互作用,病毒的拷贝数不会因为 GLP 的存在而发生变化。如果将病毒和 GLP 保温孵育 1h 后,再去感染 Vero 细胞,我们就发现病毒粒子的拷贝数下降了 7%,拷贝数只有  $7.4 \pm 0.26 \times 10^5$ ,有 93% 的病毒粒子仍然存在于悬液中;同样地,如果将 GLP 和病毒同时加入到 Vero 细胞中,这时在培养液中的病毒拷贝数也仅仅只下降了 10%,有 90% ( $7.2 \times 10^5$ ) 的病毒粒子仍然存在于培养液中;但是如果病毒去感染细胞而没有经 GLP 处理时,病毒的拷贝数就发生了较大的变化,这时在培养液中的病毒拷贝数只有  $1.7 \times 10^5$ ,是病毒对照的 21%,也就是说,有 79% 的病毒粒子已经吸附到了 Vero 细胞上,由此可见 GLP 可以有效地阻止病毒与细胞之间的相互作用,阻断了病毒对细胞的吸附,从而也就抑制了病毒的安装。

综合定量 PCR 和空斑试验的结果,我们可以断定 GLP 抑制 HSV-1 感染细胞就是通过抑制 HSV 对细胞表面的吸附过程来实现的。

## 参考文献

[1] Sugiura M, Ito H. Toxicological studies of *Ganoderma lucidum*[J]. Tokyo Yakka Daigaku Kenkyu Nempo. 1997, 27: 722-733.

[2] Kim M J, Kim H W, Lee Y S, *et al.* Studies on safety of *Ganoderma lucidum*[J]. Korean Mycol, 1986, 14: 49-59.

[3] Kim K C, Kim I G. *Ganoderma lucidum* extract protects DNA

from strand breakage caused by hydroxyl radical and UV irradiation [J]. Intern J Mol Med, 1999, 4: 273-277.

[4] Hook E W III, Cannon R O, Nahmias A J, *et al.* Herpes simplex virus infection as a risk factor for human immunodeficiency virus infection in heterosexuals[J]. J Infect Dis, 1992, 165: 251-255.

[5] Cook M L, Stevens J G. Pathogenesis of herpetic neuritis and ganglionitis in mice: evidence for intra-axonal transport of infection[J]. Infect Immun, 1973, 7: 272-288.

[6] Townsend J J, Collins P K. Peripheral nervous system demyelination with herpes simplex virus [J]. J Neuropathol Exper Neurol, 1986, 45: 419-425.

[7] Coen D M. The implications of resistance to antiviral agents for herpesvirus drug targets and drug therapy [J]. Antiviral Res, 1991, 15: 287-300.

[8] Liu J, Yang F, Ye L, *et al.* Possible mode of action of antiherpetic activities of a proteoglycan isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* in vitro [J]. J Ethnopharmacol, 2004, 95: 265-272.

[9] Lee S Y, Rhee H M. Cardiovascular effects of mycelium extract of *Ganoderma lucidum*: inhibition of sympathetic outflow as a mechanism of its hypotensive action [J]. Chem Pharm Bulletin, 1990, 38: 1359-1364.

[10] Kawagishi H, Fukuhara F, *et al.* 5-Deoxy-5-methylsulphinyladenosine, a platelet aggregation inhibitor from *Ganoderma lucidum*[J]. Phytochemistry, 1993, 32: 239-241.

[11] Lin J M, Lin C C, Chen M F, *et al.* Radical scavenger and antihepatotoxic of *Ganoderma formosanum*, *Ganoderma lucidum* and *Ganoderma neojaponicum* [J]. J Ethnopharmacol, 1995, 47: 33-41.

[12] Lin S B, Li C H, Lee S S, *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.

[13] 林志彬. 灵芝的药效及临床应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1991. 133-140.

[14] 林志彬. 灵芝的药理作用 [M]. 第二版, 北京: 北京医科大学出版社, 2001. 219 ~ 283.

[15] 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 [J]. J Ethnopharmacol, 2000, 72: 451-458.

[16] Miyazaki T, Nishijima M. Studies on fungal polysaccharides. XXVII. Structural examination of a water soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum* [J]. Chem Pharm Bulletin, 1981, 29: 3611-3616.

[17] Shieh M T, Wu Dunn D, Montgomery R I, *et al.* Cell surface receptors for herpes simplex virus are heparan sulfate proteoglycans [J]. J Cell Biol, 1992, 116: 1273-1281.

[18] Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A laboratory manual [M]. 3<sup>rd</sup> ed, New York: Cold spring Harbor Laboratory Press. 2001. 2.57-2.58.