

## 灵芝孢子粉指纹图谱建立及灵芝孢子油抗炎活性研究\*

张宇<sup>1</sup> 侯丽慧<sup>1</sup> 王乐<sup>1</sup> 司云珊<sup>2</sup> 温红娟<sup>3</sup> 高颖<sup>4\*\*</sup> 于秀华<sup>5\*\*</sup>

<sup>1</sup>长春中医药大学药学院, 长春 130117; <sup>2</sup>吉林省中医药科学院, 长春 130000; <sup>3</sup>长春中医药大学健康管理学院, 长春 130000; <sup>4</sup>中国人民解放军联勤保障部队第九六四医院, 长春 130012; <sup>5</sup>长春中医药大学附属医院, 长春 130021

**[摘要]** **目的** 建立灵芝孢子粉的指纹图谱检测方法, 探讨灵芝孢子油对炎症因子白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 的影响。**方法** 采用高效液相色谱法(HPLC)和高效薄层色谱法(HPTLC)分析不同产地灵芝孢子粉的化学成分; 采用MTT法测定细胞活力; ELISA法测定RAW264.7细胞上清液中IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的表达水平。**结果** HPLC指纹图谱标定共有峰12个, 其中峰1~5号分别为灵芝酸C2、灵芝酸G、灵芝酸B、灵芝酸A、灵芝酸D; HPTLC现行版药典法显示10批样品均符合规定, 采用三氯甲烷-乙腈-甲醇-甲酸(26:4:1:1)为展开剂进行2次展开后, 不同产地的原料质量斑点差异显著, 与HPLC指纹图谱相似。灵芝孢子油浓度 $\leq 180 \mu\text{g/mL}$ 时, 对RAW264.7细胞活性无明显影响; 对LPS诱导的RAW264.7细胞的保护作用呈剂量依赖性; 与模型组相比, 中剂量组(90  $\mu\text{g/mL}$ )显著降低IL-1 $\beta$ 表达( $P < 0.05$ ), 高剂量组(180  $\mu\text{g/mL}$ )显著降低IL-6和TNF- $\alpha$ 的表达( $P < 0.05$ ), 轻微降低IL-1 $\beta$ 的表达, 但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 灵芝孢子油是通过抑制炎症因子的释放来减轻机体的炎症, 达到对免疫细胞的保护作用。通过HPTLC可初步鉴定孢子粉的质量, HPLC指纹图谱可精准控制原料质量, 保障灵芝孢子油功效。

**[关键词]** 灵芝孢子油; 高效液相指纹图谱; 高效薄层色谱法; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2025.01.016

### Establishment of the fingerprint of ganoderma lucidum spore powder and study on the anti-inflammatory activity of ganoderma lucidum spore oil

Zhang Yu<sup>1</sup>, Hou Lihui<sup>1</sup>, Wang Le<sup>1</sup>, Si Yunshan<sup>2</sup>, Wen Hongjuan<sup>3</sup>, Gao Ying<sup>4\*\*</sup>, Yu Xiuhua<sup>5\*\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130117; <sup>2</sup>Jilin Academy of Chinese Medicine Sciences, Changchun 130000; <sup>3</sup>School of Health Management, Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130000; <sup>4</sup>The 964th Hospital of the Joint Logistics Support Force of the People's Liberation Army of China, Changchun 130012; <sup>5</sup>Affiliated Hospital of Changchun University of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021

\*\* Corresponding author: Gao Ying, email: 1012420479@qq.com; Yu Xiuhua, email: yu0316chen@163.com

**[Abstract]** **Objective** Establishment of a fingerprinting assay for Ganoderma lucidum spore powder and investigation of the effects of Ganoderma lucidum spore oil on the inflammatory factors IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ . **Methods** High Performance Liquid Chromatography and High Performance Thin-layer Chromatography techniques were used to analyze the chemical composition of Ganoderma lucidum spore powder from different origins; MTT method was used to determine the cell viability; ELISA was used to determine the RAW264.7 IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  levels in cell supernatant. **Results** The HPLC fingerprints were calibrated with a total of 12 peaks, of which peaks 1-5 were ganoderic acid C2, ganoderic acid G, ganoderic acid B, ganoderic acid A, ganoderic acid D, respectively; the current version of the Pharmacopoeia method of HPTLC showed that 10 batches of samples complied with the regulations, and the quality of raw materials of different origins was found to be similar to that of the HPLC fingerprints after 2 unfoldings by using trichloromethane-acetonitrile-methanol-formic acid (26:4:1:1) as the unfolding agent. The differences of the spots were significant and similar to the HPLC fingerprints. Ganoderma lucidum spore oil concentration less than or equal to 180  $\mu\text{g/mL}$  had no significant effect on the activity of RAW264.7 cells; the protective effect on LPS-induced RAW264.7 cells was dose-dependent; compared with the model group, the medium-dose group (90  $\mu\text{g/mL}$ ) significantly decreased the expression of IL-1 $\beta$  ( $P < 0.05$ ), and the high-dose group (180  $\mu\text{g/mL}$ ) significantly decreased the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  release ( $P < 0.05$ ), slightly reduced IL-1 $\beta$  release, but not significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Ganoderma lucidum spore oil is used to reduce the inflammation of the body by inhibiting the release of inflammatory factors to achieve the protective effect on immune cells. The quality of spore powder can be initially

收稿日期: 2024-03-18 修回日期: 2024-04-16 录用日期: 2024-04-30

\* 吉林省科技发展计划项目(20210401097YY)

\*\* 通信作者: 高颖, 电子邮箱 1012420479@qq.com; 于秀华, 电子邮箱 yu0316chen@163.com

identified by HPTLC, and HPLC fingerprinting can accurately control the quality of raw materials and guarantee the efficacy of *Ganoderma lucidum* spore oil.

[Key words] *Ganoderma lucidum* spore oil; HPLC fingerprinting; HPTLC; IL-1 $\beta$ ; IL-6; TNF- $\alpha$

炎症反应是宿主在内外因素刺激下产生的一种防御反应。在炎症反应过程中,激活的炎症相关信号诱导一系列促炎因子的转录和翻译,包括肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(Interleukin, IL)-1 $\beta$ 等<sup>[1]</sup>。IL-6是启动全身炎症反应最强的内源性炎症因子,是体现机体炎症程度与病情轻重的一个重要指标。IL-1 $\beta$ 可调控炎症介质的分泌和释放,在自然免疫中起着关键作用。TNF- $\alpha$ 是机体发生炎症反应后分泌最早,对全身或局部炎症反应起重要作用的细胞因子,由激活的单核/巨噬细胞产生,参与人体多种生理和病理过程的调节。有研究发现,过度的炎症反应与机体多种疾病密切相关,如癌症、神经退行性疾病、心血管疾病、代谢综合征、炎症性肠病、关节炎等<sup>[2]</sup>。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)为担子菌门伞菌纲多孔菌科灵芝属真菌,始载于《神农本草经》,被列为上品,性味甘平,归心、肺、肝、肾经,具有滋补强壮、扶正固本的功效,是亚洲国家历史悠久的著名中草药和食用菌。据现代医学研究,多糖和三萜类化合物是灵芝的主要活性成分,具有抗炎、抗菌、保肝、免疫调节等作用<sup>[3]</sup>。灵芝孢子是灵芝在成熟后的生殖细胞,由于其体积微小,易堆积成粉末状,也被称为灵芝孢子粉,它通过调节TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-10等炎症因子的水平,抑制促炎因子的产生和表达可减少炎症反应,可治疗肝炎、动脉粥样硬化、克罗恩病、神经炎症等多种疾病<sup>[4]</sup>。灵芝孢子油是通过超临界二氧化碳萃取技术从破壁灵芝孢子中提取得到的脂溶性活性物质,集灵芝精华,富含灵芝孢子的有效成分,易被人体吸收利用,其保健功效已成为一个研究热点。现代研究表明,灵芝孢子油富含三萜类化合物、甾醇和不饱和脂肪酸,具有良好的抗氧化作用及增强免疫功能<sup>[5-6]</sup>。目前关于灵芝抗炎作用的相关研究主要集中在灵芝子实体上,而对灵芝孢子油的抗炎作用研究鲜少有人报道。为了分析灵芝孢子油在抗炎方面的物质基础及其作用机制,本课题组拟通过高效液相色谱法(High performance liquid chromatography, HPLC)和高效薄层色谱法(High performance thin-layer chromatography, HPTLC)确定灵芝孢子油原料的质量,探究灵芝孢子油对脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的RAW264.7细胞是否产生影响,为其临床应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 甲醇、95%乙醇、乙腈、二甲基亚

砷(Dimethyl sulfoxide, DMSO)购自广东光华科技股份有限公司;对照品灵芝酸A、灵芝酸C2、灵芝酸D、灵芝酸B、灵芝酸G、灵芝醛A购自成都普思生物科技股份有限公司;纯水、超纯水由长春中医药大学附属医院实验中心提供;小白鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW264.7购自中科院上海细胞所细胞库;DMEM培养液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)、磷酸盐缓冲液购自Cytiva公司;胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)购自内蒙古奥普赛生物科技有限公司;LPS购自Sigma公司;噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自Biosharp公司;IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 试剂盒购自Sinobestbio公司。

1.1.2 仪器与设备 高效液相色谱仪(日本岛津有限公司,型号LC-2030plus UV检测器)、分析天平(上海精密仪器科技有限公司,型号BT125D)、台式离心机(Eppendorf公司,型号Centrifuge 5804 R)、超纯水机(上海康雷仪器分析有限公司,型号Smart-P-UV)、研究级生物显微镜(日本Olympus公司,型号IX-73)、数显式水浴锅(常州普天仪器设备制造有限公司,HH-8)、CO<sub>2</sub>恒温箱(Thermo Fisher Scientific,型号3121)、细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司,型号TC20)、X-30R超低温离心机(上海跃进医疗器械有限公司,型号TGL-20000-cR)、酶标仪(美国博腾仪器有限公司,型号Epoch2)。

1.1.3 灵芝药材产地批次 D1(对照药材)购自中国食品药品检定研究院(批号120968-202111);灵芝孢子粉:S1灵芝孢子粉产地四川(吉林安国药业有限公司,批号220629)、S2灵芝孢子粉产地吉林(吉林安国药业有限公司,批号20211201)、S3灵芝孢子粉产地吉林(吉林安国药业有限公司,批号20211202)、S4灵芝孢子粉产地吉林(吉林安国药业有限公司,批号20220101)、S5灵芝孢子粉产地吉林(吉林安国药业有限公司,批号20220102)、S6灵芝孢子粉产地吉林(吉林安国药业有限公司,批号20220103)、S7灵芝孢子粉产地山东(吉林安国药业有限公司,批号20220106)、S8灵芝孢子粉产地山东(吉林安国药业有限公司,批号20220107)、S9灵芝孢子粉产地江苏(吉林安国药业有限公司,批号20220104)、S10灵芝孢子粉产地江苏(吉林安国药业有限公司,批号20220105)。

### 1.2 HPLC指纹图谱建立

1.2.1 供试品溶液制备 取锥形瓶,分别加入精密称定的灵芝孢子样品10.0 g,精密量取50 mL浓度为90%的乙醇溶液回流提取1 h,过滤,第一次

滤完后将滤渣及滤纸复入锥形瓶中, 第二次精密加入 60 mL 浓度为 90% 乙醇溶液, 继续回流 1 h, 合并两次滤液, 于 40 °C 水浴锅上浓缩至约 2 mL, 用 90% 乙醇定容于 5 mL 量瓶中, 上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

**1.2.2 对照品溶液制备** 精密称取灵芝酸 A、灵芝酸 C2、灵芝酸 B、灵芝酸 D、灵芝酸 G 对照品, 用甲醇溶解并制成浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液母液, 置 -20 °C 冰箱保存, 备用。精密吸取各对照品储备液适量, 制备成混合系列对照品溶液。

**1.2.3 HPLC 色谱条件** 色谱柱 Waters Symmetry C18 (5 μm, 4.6×250 mm Column), 梯度洗脱条件见表 1, 流量为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm; 进样量为 20 μL, 柱温为 30 °C。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序表 (%)

时间 (min)	流动相 A (乙腈)	流动相 B (0.1% 磷酸水)
0	27	73
40	27	73
60	35	65
80	45	55
90	65	35
100	75	25
110	85	15
115	27	73
130	27	73

**1.2.4 方法学考察** ①精密度试验: 精密吸取上述混合对照品溶液 1 份, 按照 1.2.3 中色谱条件连续进样 6 次, 以灵芝酸 A 为参照峰, 计算各峰的相对保留时间及相对峰面积的相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD) 值。②重复性试验: 按上述供试品溶液制备方法同时制备供试品溶液 6 份, 进样色谱条件按照 1.2.3 中内容, 以灵芝酸 A 为参照峰, 计算得各峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值。③稳定性试验: 供试品溶液制备方法按 1.2.1, 分别在 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h 按照 1.2.3 中色谱条件进样, 以灵芝酸 A 为参照峰, 计算得各峰的相对保留时间及相对峰面积的 RSD 值。④相似度评价: 按照 1.2.1 中方法制备 10 批不同产地的灵芝孢子供试品溶液, 按 1.2.3 中的方法进行测定, 采用“药典委员会 2012A 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对数据进行分析。

### 1.3 HPTLC 图谱构建供试品制备

按照 1.2.1 中方法制备 10 批不同产地的灵芝孢子的供试品溶液。对照药材制备按照 1.2.1 中方法制备。色谱条件 1 见表 2, 色谱条件 2 见表 3。

表 2 灵芝 HPTLC 色谱条件 1

项目	条件
薄层板	HPTLC 预制板 (使用前应先在 105 °C 活化 30 min)
展开剂	石油醚 (60 °C ~ 90 °C) - 甲酸乙酯 - 甲酸 (15 : 5 : 1)
检视	365 nm
点样量	5 μL

表 3 灵芝 HPTLC 色谱条件 2

项目	条件
薄层板	HPTLC 预制板 (使用前应先在 105 °C 活化 30 min)
展开剂	三氯甲烷-乙腈-甲醇-甲酸 (26 : 4 : 1 : 1)
显色剂	40% 硫酸乙醇溶液, 105 °C 加热至斑点清晰
展开方式	2 次展开, 展开高度依次为 3 cm、8 cm, 每次展开前均将高效薄层板置于 50 °C 加热板上干燥 15 min 后放冷再展开
检视	365 nm、日光
点样量	5 μL

### 1.4 灵芝孢子油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的影响

**1.4.1 灵芝孢子油样品的制备** 取本品内容物 500 mg, 使用 0.5 mL DMSO 溶解, 制成 1 000 mg/mL 的母液置于 -20 °C 冰箱保存, 使用前放置常温后稀释 1 000 倍, 待用。

**1.4.2 细胞培养** 使用完全 DMEM 培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基) 对

RAW264.7 细胞进行换液、传代后再放置于 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中, 待细胞处于对数生长期时可进行所需的细胞实验。

**1.4.3 MTT 法筛选最佳浓度** 对细胞消化并进行计数, 将密度为  $7 \times 10^4$  个/孔的细胞铺至 96 孔板中, 每孔加入 100 μL, 贴壁培养 24 h 后给予不同浓度的样品溶液, 浓度分别为 11.25 μg/mL、22.50 μg/mL、45.00 μg/mL、90.00 μg/mL、

180.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 设空白对照组。37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后加入 5  $\text{mg}/\text{mL}$  的 MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$  让其和细胞生成蓝紫色结晶, 于培养箱中孵育 4 h 后弃去上清, 加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 让蓝色结晶溶解, 震荡后设置酶标仪波长为 490 nm 读取 OD 值。按照公式计算出细胞存活率。

#### 1.4.4 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞的保护作用

取对数生长密度为  $7 \times 10^4$  个/孔的细胞铺至 96 孔板中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h 后弃去培养基, 空白对照孔和模型孔分别加入培养液 100  $\mu\text{L}$ , 灵芝孢子油低、中、高剂量组分别加入浓度为 45.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、180.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的溶液各 100  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h 后, 空白对照孔加入 100  $\mu\text{L}$  完全培养液, 模型组和实验组加入 LPS 溶液, 使 LPS 终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 培养 24 h, 加 5  $\text{mg}/\text{mL}$  MTT 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 方法同 1.4.3 测定 OD 值, 计算细胞存活率。

#### 1.4.5 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 的影响

将密度为  $1 \times 10^5$  个/孔的 RAW264.7 细胞铺至 6 孔板中, 培养 24 h, 分组为空白对照组、模型组 (LPS 终浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、灵芝孢子油低、中、高剂量组, 空白对照组 100  $\mu\text{L}$  完全培养基、模型组和实验组加入 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LPS 溶液, 培养 24 h 后弃去上清液, 空白对照组加入 100  $\mu\text{L}$  完全培养基, 模型组继续加 LPS 溶液, 实验组加入不同浓度 (45.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、180.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的样品溶液培养 24 h 后进行 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  测定, 采用 ELISA 试剂盒测定上述炎症因子含量。

#### 1.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析,

正态分布计量资料采用单因素方差分析, 任意两组比较采用 Turkey 法, 检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 灵芝孢子的 HPLC 指纹图谱结果分析

#### 2.1.1 精密度试验

以灵芝酸 A 色谱峰为参照峰, 计算各峰的相对保留时间范围为 0.00% ~ 0.38%, 相对峰面积的 RSD 值范围为 0.00% ~ 1.05%, 均小于 3%, 表明该仪器精密度良好。

#### 2.1.2 重复性试验

各峰的相对保留时间范围为 0.00% ~ 0.13%, 相对峰面积的 RSD 值范围为 0.00% ~ 4.69%, 均小于 5%, 表明该方法重复性良好。

#### 2.1.3 稳定性试验

供试品溶液在 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h 各峰的相对保留时间范围为 0.00% ~ 0.20%, 相对峰面积的 RSD 值范围为 0.00% ~ 4.61%, 均小于 5%, 表明在 12 h 内灵芝孢子供试品溶液稳定性良好。

#### 2.1.4 相似度评价

采用“药典委员会 2012A 版中药色谱指纹图谱相似度评价系统”对数据进行分析。以 S1 样品为参照图谱, 通过分析共标定出共有峰 12 个, 见图 1; 与标准品比对后共出现 5 个特征峰, 依次为灵芝酸 C2、灵芝酸 G、灵芝酸 B、灵芝酸 A、灵芝酸 D, 见图 2; 结果如表 4 所示, 10 批灵芝孢子样品的相似度结果均在 0.949 以上, 样品相似度较好, 但不同批次样品间存在差异。如图 1 所示, 90 ~ 100 min 时, S1 所检出成分峰面积普遍偏高, 其次便是吉林产地的 (S2 ~ S6)。10 批不同产地的灵芝孢子样品指纹图谱叠加图及其对照指纹图谱 (R) 见图 1。

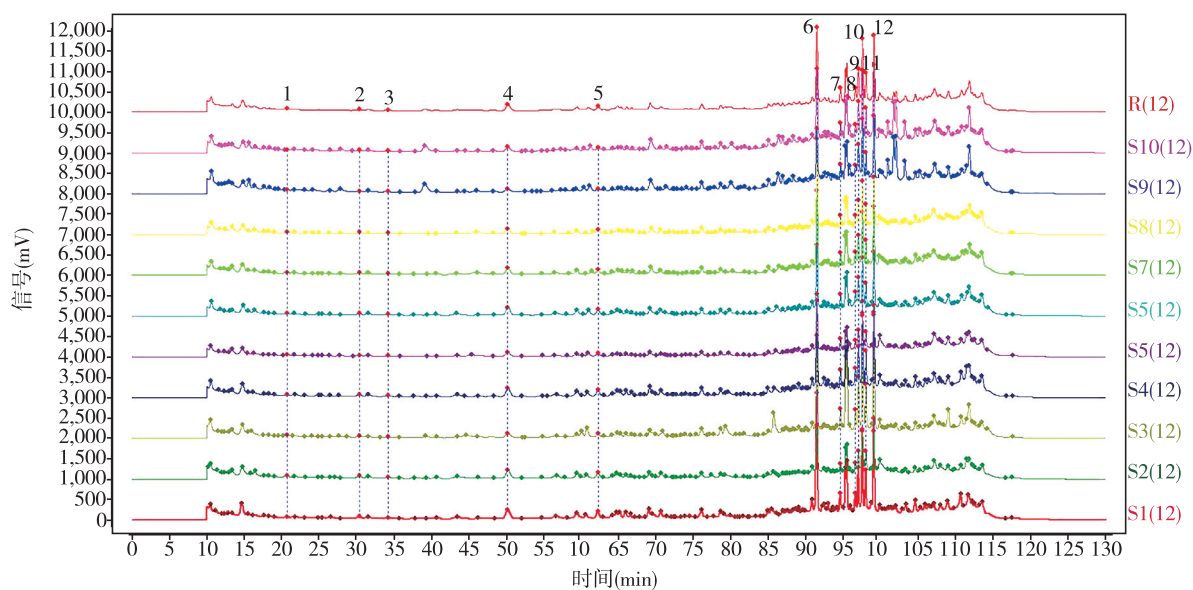


图 1 10 批灵芝孢子粉的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of 10 batches of Ganoderma lucidum spore

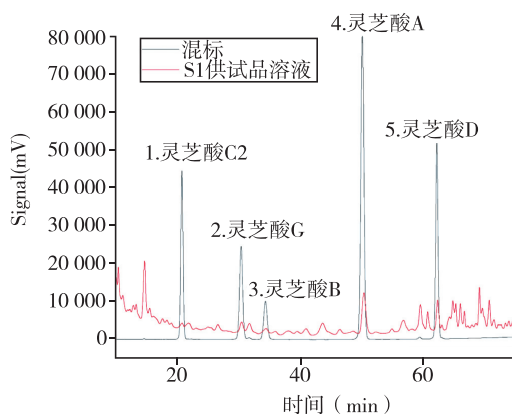


图 2 混合对照品与 S1 供试品对照图  
Fig. 2 Control chart of mixed control and S1 test material

表 4 10 批不同产地灵芝孢子指纹图谱与 R 的相似度

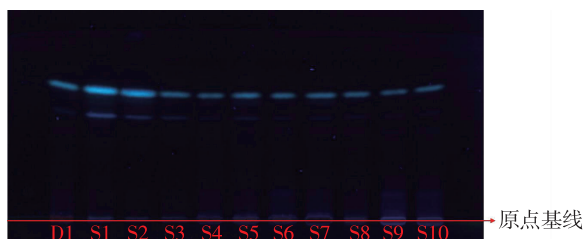
Tab. 4 Similarity between the fingerprints of 10 batches of *Ganoderma lucidum* spore powder from different origins and its control fingerprint

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	R
S1	1.000	0.987	0.975	0.994	0.990	0.987	0.992	0.991	0.966	0.981	0.995
S2	0.987	1.000	0.973	0.991	0.990	0.984	0.976	0.964	0.949	0.962	0.985
S3	0.975	0.973	1.000	0.977	0.979	0.973	0.979	0.953	0.978	0.983	0.987
S4	0.994	0.991	0.977	1.000	0.997	0.996	0.993	0.980	0.969	0.980	0.996
S5	0.990	0.990	0.979	0.997	1.000	0.992	0.989	0.978	0.967	0.976	0.994
S6	0.987	0.984	0.973	0.996	0.992	1.000	0.995	0.974	0.975	0.982	0.994
S7	0.992	0.976	0.979	0.993	0.989	0.995	1.000	0.985	0.983	0.992	0.998
S8	0.991	0.964	0.953	0.980	0.978	0.974	0.985	1.000	0.952	0.969	0.983
S9	0.966	0.949	0.978	0.969	0.967	0.975	0.983	0.952	1.000	0.997	0.984
S10	0.981	0.962	0.983	0.980	0.976	0.982	0.992	0.969	0.997	1.000	0.993
R	0.995	0.985	0.987	0.996	0.994	0.994	0.998	0.983	0.984	0.993	1.000

2.2 灵芝孢子粉的 HPTLC 鉴别及指纹图谱分析

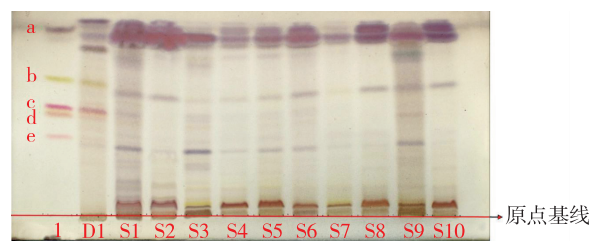
根据色谱条件 1 得到的灵芝孢子 HPTLC 图谱, 见图 3。根据色谱条件 2 得到的灵芝孢子 HPTLC 图谱, 见图 4、图 5。不同来源的灵芝提取物很容易被鉴别, 而且根据其荧光强弱, 也能定性地反应出药材优劣。由图 3 可见, S1~S10 这 10 个产地均符合药典标准, 且 S1 药材质量优于其他产地。由图 4、图 5 可见, 根据色谱条件 2 得到的灵芝孢

子粉的 HPTLC 色谱图斑点更多, 可检出成分比现行版药典法多, 但某些斑点分离度小。不同产地来源及批号的灵芝孢子粉色谱图同样具有较大的差异, 灵芝酸 A 及灵芝酸 C 在样品中具有显著性差异, 可作为药材质量鉴定的标志物, 间接鉴定药材质量。



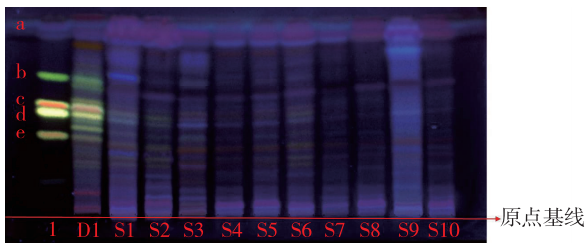
注: D1 为对照药材; S1 为四川产灵芝孢子粉; S2~S6 为吉林产灵芝孢子粉; S7、S8 为山东产灵芝孢子粉; S9、S10 为江苏产灵芝孢子粉

图 3 灵芝孢子粉 HPTLC 指纹图谱 1  
Fig. 3 Fingerprint 1 of *Ganoderma lucidum* spore powder by HPTLC



注: 1 为混合对照品 (a 为灵芝酸 A, b 为灵芝酸 D, c 为灵芝酸 B, d 为灵芝酸 G, e 为灵芝酸 C); D1 为对照药材; S1 为四川产灵芝孢子粉; S2~S6 为吉林产灵芝孢子粉; S7、S8 为山东产灵芝孢子粉; S9、S10 为江苏产灵芝孢子粉

图 4 灵芝孢子粉日光 HPTLC 指纹色谱图  
Fig. 4 HPTLC fingerprint chromatogram of *Ganoderma lucidum* spore powder in daylight



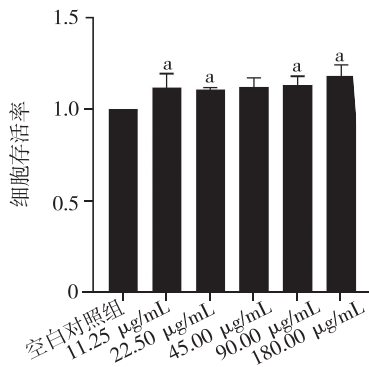
注: 1 为混合对照品 (a 为灵芝酸 A, b 为灵芝酸 D, c 为灵芝酸 B, d 为灵芝酸 G, e 为灵芝酸 C); D1 为对照药材; S1 为四川产灵芝孢子粉; S2~S6 为吉林产灵芝孢子粉; S7、S8 为山东产灵芝孢子粉; S9、S10 为江苏产灵芝孢子粉

图 5 灵芝孢子粉紫外 (365 nm) HPTLC 色谱图

Fig. 5 UV (365 nm) HPTLC chromatogram of *Ganoderma lucidum* spore powder

### 2.2.1 灵芝孢子油对 RAW264.7 细胞存活率的影响

与空白对照组相比, 细胞存活率越高的药物浓度越适宜作为给药浓度。结果显示, 当溶液浓度为 11.25~180.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 无细胞毒性, 且细胞处于增殖状态, 浓度越大, 促增殖作用越强, 见图 6。故分别选择 45.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、90.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、180.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作为低、中、高剂量组浓度。



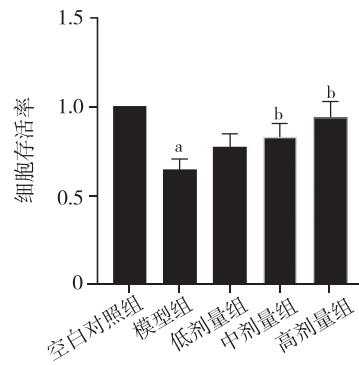
注: 与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$

图 6 灵芝孢子油对 RAW264.7 细胞活力的影响

Fig. 6 Effects of different concentrations of *Ganoderma lucidum* spore oil on RAW264.7 cell viability

2.2.2 灵芝孢子油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞活性的影响 当细胞在与不同浓度的样品溶液共同孵育 24 h 后, 加入 LPS (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 继续培养 24 h, 灵芝孢子油溶液对细胞具有明显的保护作用, 且随浓度增大而增强, 见图 7。

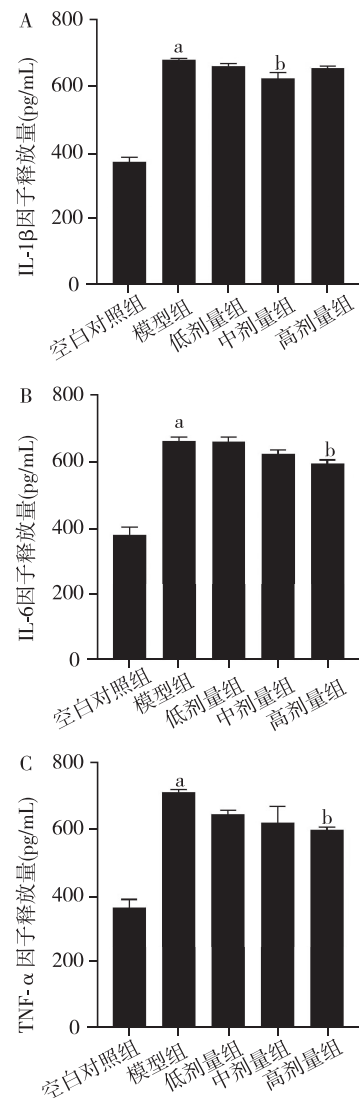
2.2.3 灵芝孢子油对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞释放的炎症因子的影响 与模型组相比, 不同浓度的灵芝孢子油溶液实验组的 IL-1 $\beta$  表达量均有所降低, 中剂量组 IL-1 $\beta$  表达量低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 见图 8A。与模型组比, 各不同浓度的灵芝孢子油实验组的 IL-6、TNF- $\alpha$  释放量均降低, 其中高剂量组 IL-6、TNF- $\alpha$  水平低于模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 8B、图 8C。



注: 与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 7 灵芝孢子油对 RAW264.7 细胞的保护作用

Fig. 7 Protective effects of different concentrations of *Ganoderma lucidum* spore oil on RAW264.7 cells



注: 与空白对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 8 灵芝孢子油对 RAW264.7 细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平的影响

Fig. 8 Effects of *Ganoderma lucidum* spore oil on levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in RAW264.7 cells

### 3 讨论

目前人口老龄化已成为一种全球现象, 老年人健康问题是老龄化社会中最突出的问题。衰弱是老年常见病, 炎症在衰弱中起到了重要作用。炎症是保护人体免受外源病原体侵害的重要防御机制之一, 但是过度或异常的炎症反应会导致各种疾病的发生<sup>[7]</sup>。因此, 调节炎症反应对于治疗相关疾病和保持健康具有重要意义。灵芝在《本草纲目》中记载“久食轻身不老, 延年神仙”<sup>[8]</sup>。自古为延年益寿, 抗衰老, 增强免疫力良药。主要含有多糖类、甾醇、灵芝酸 A、C 等成分。本实验建立了灵芝孢子粉的 HPLC 指纹图谱, 结果显示 10 批样品特征图谱相似度均大于 0.9, 可确保孢子粉质量是可控的。有研究表明, 当提取温度为 40 ℃ 时, 灵芝孢子总三萜的得率达到峰值, 升高提取温度得率反而下降<sup>[9]</sup>。本实验在提取过程中也进行了探究, 结果显示 40 ℃ 水浴蒸干提取效果好, 峰数量多且面积大, 故选择了 40 ℃ 水浴蒸干。

通过 HPTLC 色谱鉴别方法, 本研究前期对不同展开体系、不同显色条件、不同展开次数、不同薄层板及其稳定性进行考察, 结果表明, 在对照品色谱、对照药材色谱相应位置上, 供试品的色谱斑点颜色大小相同, 且各考察因素下结果差异不大, 薄层板对薄层鉴别方法的影响较小。

灵芝多糖具有抗氧化应激的作用和抗衰老、抗氧化作用<sup>[10]</sup>。β-谷甾醇在提高免疫力上发挥着重要的作用, 它可通过抑制一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 合成、减少 IL-1β 等炎症因子分泌从而发挥抗炎作用<sup>[11-12]</sup>。炎症通常是伴随多种疾病状态的一种共有的病理现象, 巨噬细胞是主要的炎症细胞, 有研究发现巨噬细胞受到外界 LPS 等抗原刺激后会发生形态改变, 具体表现为体积增大, 细胞出现多形性, 胞质中出现空泡, 并伴随一系列重要炎症细胞因子如 NO、IL-6、TNF-α 的释放, 它们均会促进炎症反应<sup>[13]</sup>。本实验采用 RAW264.7 小鼠单核巨噬细胞模拟体内巨噬细胞参与抗炎的过程, 应用 MTT 法检测细胞活性, 结果表明不同浓度的灵芝孢子油作用于 LPS 诱导的细胞损伤实验中, 灵芝孢子油对 RAW264.7 细胞具有保护作用。通过对细胞中促炎因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的研究, 表明灵芝孢子油能减轻细胞炎症反应。

综上所述, 本研究中建立的 HPLC、HPTLC 实验条件可为灵芝孢子粉的真伪鉴别和质量评价提供参考, 为灵芝孢子油的制备提供质量保证。而不同浓度的灵芝孢子油作用于 LPS 诱导的细胞损伤实验中, 表明灵芝孢子油对 RAW264.7 细胞具有保护作用。通过对细胞中促炎因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 的研究, 表明灵芝孢子油能减轻细胞的炎症反应, 为未来临床应用灵芝孢子油的抗炎活性提供理论基础。

### 参考文献

- [1] Jiang S Q, Zhang J S, Feng J, et al. Anti-inflammatory activities and mechanism of *Ganoderma lingzhi* β-glucooligosaccharide in vitro [J]. *Mycosystema*, 2024, 43(7): 104-113.
- [2] Tao Q, Li J Y. Advances in research on the relationship between inflammation and disease [J]. *J Tradit Chin Veterin Med*, 2023, 42(5): 34-43.
- [3] Luo H J, Lin D M, Wang L F, et al. Research progress on active ingredient analysis and quality evaluation of *Ganoderma lucidum* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(1): 51-60.
- [4] Gao Y J, Luo S, Song Y, et al. Research progression the anti-inflammatory mechanism of *ganoderma lucidum* [J]. *Edible Fungi of China*, 2021, 40(9): 1-4, 10.
- [5] Zhao Y X, Guo Y, Hu F, et al. Effect of *Ganoderma lucidum* spore oil on the antioxidative capacity of aged mice [J]. *Acad Period Farm Prod Proc*, 2020(3): 4-7.
- [6] Wu X, Cao J L, Li M X, et al. An integrated microbiome and metabolomic analysis identifies immunoenhancing features of *Ganoderma lucidum* spores oil in mice [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104937.
- [7] Liu Y, Wang H H, Lv J L, et al. Inhibitory effect and mechanism of riligustilide from danggui (*angelica sinensis*) on LPS - induced inflammatory response in RAW 264.7 cells [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(7): 140-146, 284.
- [8] Wang D. Experimental study on Ganoderic Acid A delaying the degeneration of lumbar intervertebral disc and its mechanism in rats [D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [9] Wen H P, Lei W M, Ke L Q, et al. Optimization of total triterpenoids extraction from *Ganoderma lucidum* spore powder and evaluations of their biological capacities in vitro [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(4): 705-713.
- [10] Liu C D, Yang N, Song Y, et al. Ganoderic acid C1 isolated from the anti-asthma formula, ASHMI™ suppresses TNF-α production by mouse macrophages and peripheral blood mononuclear cells from asthma patients [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 27(2): 224-231.
- [11] Liu W L, Ji Y, Huang A X. Research and development progress of β-sitosterol [J]. *Acad Period Farm Prod Proc*, 2019(1): 77-79, 82.
- [12] Choi J N, Choi Y H, Lee J M, et al. Anti-inflammatory effects of β-sitosterol-β-D-glucoside from *trachelospermum jasminoides* (Apocynaceae) in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophages [J]. *Nat Prod Res*, 2012, 26(24): 2340-2343.
- [13] Gao X J, Guo M Y, Zhang Z C, et al. Bergenin plays an antiinflammatory role via the modulation of MAPK and NF-κB signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis [J]. *Inflammation*, 2015, 38(3): 1142-1150.