doi:10.3969 / j.issn.1006 – 4931.2022.20.013

灵芝孢子类产品对模型小鼠肝损伤的改善作用*

袁抒捷[1],张　静[1],崔馨戈[1],祝朋玲[1],李思雨[1],周　俊[2],张正高[3],彭　灿[1,4,5,6,7△]

(1. 安徽中医药大学药学院,安徽 合肥　230012; 2. 安徽祥云谷现代中药有限公司,安徽 宣城　242600; 3. 安徽黄山云乐灵芝有限公司,安徽 宣城　242600; 4. 药物制剂技术与应用安徽省重点实验室,安徽 合肥　230012; 5. 中药复方安徽省重点实验室,安徽 合肥　230012; 6. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心,安徽 合肥　230012; 7. 安徽省中医药研究院中药资源保护与开发研究所,安徽 合肥　230012)

摘要:目的　探讨灵芝孢子类产品对模型小鼠肝损伤的改善作用。**方法**　将 42 只小鼠随机分为空白对照组[等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC – Na)]、模型组(等体积 0.5% CMC – Na)、破壁灵芝孢子粉组(破壁组,0.1 g / kg)、富硒破壁灵芝孢子粉组(富硒破壁组,0.1 g / kg)、灵芝孢子油组(孢子油组,0.1 g / kg)、未破壁灵芝孢子粉组(未破壁组,0.1 g / kg),各 7 只。尾静脉注射 0.25 mg / mL 刀豆蛋白 A,以复制肝损伤小鼠模型,正常对照组给予等体积生理盐水,隔天 1 次,连续 2 周;建模成功后各组小鼠灌胃相应药物或 0.5% CMC – Na,每天 1 次,连续 30 d。采用苏木素 – 伊红(HE)染色,观察小鼠肝组织形态学变化;检测小鼠血清中天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、肿瘤坏死因子 – α(TNF – α)、γ 干扰素(IFN – γ)及肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的水平。**结果**　与模型组比较,破壁组、富硒破壁组、孢子油组小鼠的肝细胞坏死程度均显著减轻,肝索排列较规范,炎性程度减轻;未破壁组小鼠肝细胞坏死程度虽减轻,但坏死处仍有炎性细胞浸润。与模型组比较,破壁组、富硒破壁组、孢子油组、未破壁组小鼠血清中 AST, ALT, TNF – α, IFN – γ 水平及肝组织中 MDA 水平均显著降低,肝组织中 SOD 水平均显著升高($P < 0.05$)。**结论**　上述 4 种灵芝孢子类产品具有一定的保肝护肝作用,其机制与修复损伤肝细胞、促进肝细胞生长、抗氧化和免疫调节相关。

关键词:灵芝孢子粉;破壁;灵芝孢子油;肝损伤模型;小鼠

中图分类号:R96;R285　　**文献标志码:A**　　**文章编号:1006 – 4931(2022)20 – 0049 – 04**

*基金项目:安徽省科技重大专项[17030801015;202103a07020001];安徽高校协同创新项目[GXXT – 2019 – 043;GXXT – 2020 – 025]。
第一作者:袁抒捷,女,在读硕士研究生,研究方向为药物制剂,(电子信箱)1641300294@qq. com。
△通信作者:彭灿,男,博士,副教授,研究方向为药物制剂新技术与药物体内外分析,(电子信箱)pengcanking@hotmail. com。

development of the gut microbiome in early childhood from the teddy study[J]. Nature, 2018, 562(7728): 583 – 588.

[17] RIDAURA VK, FAITH JJ, REY FE, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice[J]. Science, 2013, 341(6150): 1241214.

[18] GUO Z, ZHANG J, WANG Z, et al. Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20602.

[19] SHAO T, SHAO L, LI H, et al. Combined signature of the fecal microbiome and metabolome in patients with gout[J]. Front Microbiol, 2017, 8(578527): 268.

[20] XING SC, MENG DM, CHEN Y, et al. Study on the diversity of bacteroides and clostridium in patients with primary gout[J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2): 707 – 715.

[21] YAN R, WANG K, WANG QQ, et al. Probiotic Lactobacillus casei Shirota prevents acute liver injury by reshaping the gut microbiota to alleviate excessive inflammation and metabolic disorders[J]. Microbial Biotechnology, 2022, 15(1): 247 – 261.

[22] XLA B, XG B, HUI ZB, et al. The anti – hyperuricemic effects of green alga Enteromorpha prolifera polysaccharide via regulation of the uric acid transporters *in vivo*[J]. Food Chem Toxicol, 2021, 158: 112630.

[23] 范顺明,张春玲,李　星,等. 基于 16S rDNA 测序技术分析药对知母 – 黄柏盐炙前后配伍对 2 型糖尿病大鼠肠道菌群的影响[J]. 中药药理与临床,2020,36(6):150 – 156.

[24] 王　琨,吴珊珊,黎　攀,等. 茯苓对高尿酸血症大鼠肾损伤及肠道菌群的影响[J/OL]. (2022 – 03 – 11)[2022 – 04 – 12]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220309.2206.042.html.

[25] 吕彩兰,杨　楠,陈　静,等. 苍术 – 白术药对治疗小儿厌食症的机制研究[J]. 中医药临床杂志,2022,34(1):76 – 81.

[26] 田丽芳,闫永平,张　涛. 酯化牛膝多糖对产蛋鸡肠道微生物及小肠黏膜形态的影响[J]. 今日畜牧兽医,2018,34(9):6 – 7.

[27] 王　韬,费建东,聂双发,等. 薏苡仁油对小鼠肠道菌群及炎症因子的影响[J]. 中国医药导报,2020,17(36):31 – 35.

[28] 李　娜,王　坤,李　琦. 加味忍冬藤汤对尿酸性肾病湿热内蕴证患者血尿酸、血 β2 微球蛋白的影响[J]. 四川中医,2020,38(9):125 – 128.

[29] 李鼎鹏,谢兴文,郑先丽,等. 忍冬藤颗粒对大鼠急性痛风性关节炎模型抗炎作用研究[J]. 中药药理与临床,2018,34(4):123 – 127.

(收稿日期:2021 – 11 – 26;修回日期:2022 – 05 – 18)

Effect of *Ganoderma Lucidum* Spore Products on Improving Liver Injury in Model Mice

YUAN Shujie[1], ZHANG Jing[1], CUI Xinge[1], ZHU Pengling[1], LI Siyu[1], ZHOU Jun[2], ZHANG Zhenggao[3], PENG Can[1,4,5,6,7]

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012; 2. Anhui Xiangyungu Modern Chinese Medicine Co., Ltd., Xuancheng, Auihui, China 242600; 3. Anhui Huangshan Yunle Ganoderma Lucidum Co., Ltd., Xuancheng, Auihui, China 242600; 4. Anhui Province Key Laboratory of Pharmaceutical Preparation Technology and Application, Hefei, Anhui, China 230012; 5. Anhui Province Key Laboratory of Chinese Medicinal Formula, Hefei, Anhui, China 230012; 6. Synergetic Innovation Center of Anhui Authentic Chinese Medicine Quality Improvement, Hefei, Anhui, China 230012; 7. Institute of Traditional Chinese Medicine Resources Protection and Development, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012)

Abstract: Objective To investigate the improvement of *Ganoderma lucidum* spore (GLS) products on liver injury in model mice. **Methods** Forty-two mice were randomly divided into the blank control group [equal volume of 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na)], model group (equal volume of 0.5% CMC-Na), wall-broken GLS powder group (wall-broken group, 0.1 g/kg), selenium-enriched wall-broken GLS powder group (selenium-enriched wall-broken group, 0.1 g/kg), GLS oil group (broken group, 0.1 g/kg), wall-unbroken GLS powder group (wall-unbroken group, 0.1 g/kg), seven mice in each group. Mice were injected with 0.25 mg/mL concanavalin A (Con A) via tail vein to duplicate the model mice with liver injury. The mice in the normal control group were given an equal volume of normal saline once every other day for two weeks. After successful modeling, mice in each group were given corresponding drugs or 0.5% CMC-Na by gavage once a day for 30 d. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes in liver tissue in mice. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ) in serum, and the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in liver tissue were detected. **Results** Compared with those in the model group, the necrosis degree of liver cells reduced significantly, the arrangement of liver cords was more standardized, and the degree of inflammation reduced in the wall-broken group, selenium-enriched wall-broken group and GLS oil group. Although the necrosis degree of liver cells reduced, there was still inflammatory cell infiltration in the necrotic area in the wall-unbroken group. Compared with those in the model group, the levels of AST, ALT, TNF-α and IFN-γ in serum and the level of MDA in liver tissue in the wall-broken group, selenium-enriched wall-broken group, GLS oil group and wall-unbroken group were significantly lower, while the levels of SOD in liver tissue in the above groups were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusion** The above four GLS products have certain liver protective effects, and their mechanisms are related to repairing damaged liver cells, promoting the growth of liver cells, anti-oxidation and adjusting the immune system.

Key words: *Ganoderma lucidum* spore powder; wall-broken; *Ganoderma lucidum* spore oil; liver injury model; mice

灵芝为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. exFr.) Karst. 或紫芝 *Ganodorma sinense* Zhao, Xu et Zhang 的干燥子实体，始载于《神农本草经》，列为上品，药用历史悠久[1]，有抗肿瘤、抗氧化、提高免疫、抗炎、降血糖、神经保护和保肝[2-5]等药理作用。灵芝孢子粉是灵芝的生殖细胞，不但保留了药材的全部遗传物质，且功效更佳[6]。灵芝孢子具有坚硬的双壁结构[7]，一般物理方法很难破壁，使得壁内有效物质不易被消化，于是市场上出现了破壁孢子粉、富硒破壁孢子粉、孢子油等产品。本研究中以灵芝孢子类产品作用于肝损伤模型小鼠，观察对其血清生化指标及肝组织氧化应激指标的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器：TG16-WS 型离心机（常州市万丰仪器制造有限公司）；BT25S 型十万分之一电子天平（赛多利斯科学仪器<北京>有限公司）；RM2135 型切片机（德国 Leica 公司）；BX53 型显微镜（日本 Olympus 公司）；YB-7B 型石蜡包埋机（孝感市亚光医用电子技术有限公司）；RT-6000 型酶标仪（雷杜生命科学股份有限公司）。

试药：未破壁灵芝孢子粉（批号为 20191027，规格为每袋 250 g）、破壁灵芝孢子粉（批号为 20191027，规格为每袋 250 g）、富硒破壁灵芝孢子粉（批号为 20191027，规格为每袋 250 g）、灵芝孢子油（批号为 20201031，规格为每粒 0.5 g），均购自安徽黄山云乐灵芝有限公司；刀豆蛋白 A（ConA，阿拉丁试剂<上海>有限公司，批号为 39076）、天门冬氨酸氨基转移酶（AST）试剂盒（批号为 20210719）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）试剂盒（批号为 20210402）、丙二醛（MDA）试剂盒（批号为 20210620）、超氧化物歧化酶（SOD）试剂盒（批号为 20210514），均购自南京建成生物科技有限公司；肿瘤坏死因子-α（TNF-α）酶联免疫吸附（ELISA）试剂盒（批号为 GR2021-08）、γ 干扰素（IFN-γ）ELISA 试剂盒（批号为 GR2021-08），均购于武汉基因美生物科技有限公司；苏木素-伊红（HE，武汉赛维尔生物科技有限公司）；羧甲基纤维素钠（CMC-Na，佛山市日特化工有限公司）；硫酸铝、碘酸钠、冰醋酸、中性树胶、二甲苯，均购于沈阳化学试剂厂。

动物：健康 SPF 级 KM 小鼠，雄性，6～8 周龄，体质量 30～45 g，购自安徽医科大学实验动物中心，动物实验

生产许可证号SCXK(皖)2017－001。于室温(23±2)℃、相对湿度50%～60%、12 h光照循环的条件下饲养小鼠。动物实验研究均经动物伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 分组、建模及给药

将42只小鼠随机分为空白对照组(等体积0.5% CMC－Na)、模型组(等体积0.5% CMC－Na)、未破壁灵芝孢子粉组(未破壁组,0.1 g/kg)、破壁灵芝孢子粉组(破壁组,0.1 g/kg)、富硒破壁灵芝孢子粉组(富硒破壁组,0.1 g/kg)、灵芝孢子油组(孢子油组,0.1 g/kg),各7只。均尾静脉注射0.25 mg/mL Con A,以复制肝损伤小鼠模型;空白对照组给予等体积生理盐水,隔天1次,连续2周。建模成功后各组灌胃相应药物或0.5% CMC－Na,每天1次,连续30 d。

1.2.2 观察指标

肝组织形态学:末次给药后禁食不禁饮12 h,小鼠眼球取血,处死,取出肝脏,生理盐水清洗,擦去血液,滤纸吸干水分。在肝右叶同一部位,摘取部分肝组织,以4%多聚甲醛固定,脱水透明、包埋、切片、脱蜡,HE染色,光学显微镜下观察小鼠肝组织形态学变化。

血清生化指标:取上述小鼠血液,室温静置30 min,3 000 r/min离心15 min,取上清。按相应试剂盒说明书方法测定血清中AST,ALT,TNF－α,IFN－γ的水平。

肝组织氧化应激指标:取上述小鼠肝脏,以冰冷生理盐水洗净,擦去血液,用滤纸拭干。取0.2 g肝组织于组织匀浆管中,加600 μL生理盐水,3 000 r/min离心15 min,取上清。按相应试剂盒说明书方法操作,以硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定MDA含量,黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性。

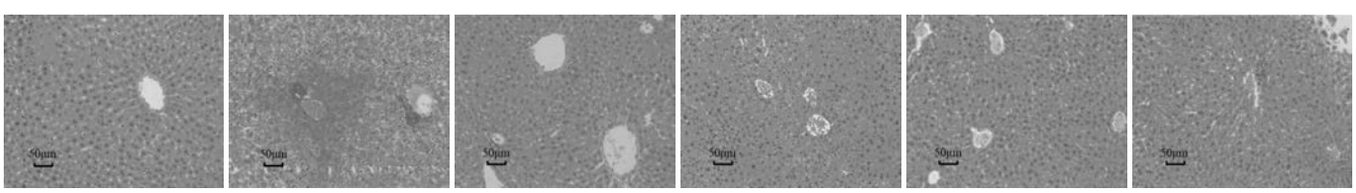
1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0统计学软件分析。计量资料以$\overline{X}\pm s$表示,多组间差异行单因素方差分析,组内差异行SNK－q检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织形态学

空白对照组小鼠肝细胞形态正常,核大而圆,居中,肝索呈规范的放射状排列,肝小叶结构完整;模型组小鼠肝细胞呈明显点灶状坏死,坏死灶处伴炎性细胞浸润,且肝窦有大量的红细胞堆积,肝索排列不规则,肝小叶形态不清晰。与模型组比较,破壁组、富硒破壁组、孢子油组小鼠肝细胞坏死程度均明显减轻,肝索排列较规范,炎性程度减轻;未破壁组小鼠肝细胞坏死程度虽减轻,但坏死处仍有炎性细胞浸润。详见图1。



A　B　C　D　E　F

A. 空白对照组　B. 模型组　C. 破壁组　D. 富硒破壁组　E. 孢子油组　F. 未破壁组

图1 肝组织形态学(HE,×200)

A. Blank control group　B. Model group　C. Wall－broken group　D. Selenium－enriched wall－broken group　E. GLS oil group　F. Wall－unbroken group

Fig. 1 Histomorphology of liver tissue (HE,×200)

2.2 血清生化指标

与空白对照组比较,模型组小鼠血清中AST,ALT,TNF－α,IFN－γ水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,破壁组、富硒破壁组、孢子油组、未破壁组小鼠血清中AST,ALT,TNF－α,IFN－γ水平均显著降低($P<0.05$);后4组间4个指标差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表1。

2.3 肝组织氧化应激指标

与空白对照组比较,模型组小鼠肝组织中SOD水平显著降低,MDA水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,破壁组、富硒破壁组、孢子油组、未破壁组小鼠肝组织中SOD水平均显著升高,MDA水平均显著降低($P<0.05$);后4组间2个指标差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表2。

表1 各组小鼠血清生化指标比较($\overline{X}\pm s$,$n=7$)

Tab. 1 Comparison of serum biochemical indexes of mice in each group ($\overline{X}\pm s$,$n=7$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)	TNF－α(pg/mL)	IFN－γ(pg/mL)
空白对照组	7.799±2.326	7.001±0.804	558.175±17.056	198.874±4.857
模型组	31.802±3.606*	11.407±2.368*	685.182±15.031*	241.577±5.485*
破壁组	11.156±2.885#	9.146±1.186#	551.474±17.586#	183.739±8.646#
富硒破壁组	12.099±3.568#	9.228±1.734#	552.129±17.712#	203.207±7.252#
孢子油组	21.086±3.66#	9.394±1.644#	558.834±16.268#	202.988±10.595#
未破壁组	23.365±2.036	9.122±1.572	594.983±18.755	214.553±8.975

注:与空白对照组比较,*$P<0.05$;与模型组比较,#$P<0.05$。表2同。

Note: Compared with those in the blank control group, *$P<0.05$; Compared with those in the model group, #$P<0.05$ (for Tab. 1－2).

表2 各组小鼠肝组织中SOD及MDA水平比较($\bar{X} \pm s$, $n = 7$)

Tab. 2 Comparison of SOD and MDA levels in liver tissues of mice in each group ($\bar{X} \pm s$, $n = 7$)

组别	SOD(U / mL)	MDA(nmol / mL)
空白对照组	40.703 ± 1.315	4.595 ± 0.508
模型组	30.959 ± 1.074*	8.003 ± 0.739*
破壁组	36.226 ± 1.628#	6.265 ± 0.516#
富硒破壁组	35.387 ± 1.982#	6.260 ± 0.527#
孢子油组	37.086 ± 1.096#	6.282 ± 0.489#
未破壁组	33.579 ± 1.215#	6.781 ± 0.581#

3 讨论

有研究表明，ConA与肝窦内皮细胞和特殊肝巨噬细胞（Kupffer细胞）上富含甘露糖的糖蛋白结合，同时交联T淋巴细胞受体而激活T淋巴细胞，而后分泌细胞因子TNF－α及IFN－γ等，从而诱导肝窦内皮细胞和肝细胞的凋亡[8]，该发病机制与人急性肝炎有一定相似[9]。以ConA建模可确定剂量，过程更易标准化，故目前临床常用其复制急性免疫介导性肝炎模型[10]。

ConA对肝细胞造成损伤时，肝细胞膜通透性增大，导致肝细胞内的AST及ALT进入血液，增加血液中的含量，故可认为当血液中AST，ALT水平异常升高时，肝脏组织已发生了急性损伤[11]。肝脏发生急性损伤时，肝小叶出现大量炎性细胞浸润，肝脏门管附近主要被CD_4^+T淋巴细胞浸润[12]，随后Th1型细胞因子[如TNF－α，IFN－γ和白细胞介素（IL）－2]被大量释放[13]。其中，IFN－γ和TNF－α是诱导T淋巴细胞依赖性肝损伤中肝细胞凋亡和肝纤维化的关键细胞因子[14]。李小刚等[15]研究发现，抗TNF－α单抗可以阻断ConA性肝损伤的发生。FENG等[14]用IL－37持续性抑制IFN－γ和TNF－α的产生，达到抑制自身免疫性肝炎等T淋巴细胞依赖性肝损伤的发展。此外，肝脏细胞损伤，出现氧化应激，产生的超氧离子需消耗大量的SOD，以减少对机体的损害，此过程会表现为机体SOD水平的降低；产生的MDA会加重细胞的肿胀破损，反映组织的过氧化程度加重[16]。本研究中，与模型组比较，用药组小鼠血清中AST，ALT，TNF－α，IFN－γ水平及肝组织中MDA水平均显著降低，肝组织中SOD水平均显著升高。

综上所述，4种灵芝孢子类产品对模型小鼠肝损伤均有一定改善作用，其作用机制可能与修复损伤肝细胞、促进肝细胞生长、抗氧化和免疫调节有关。但未破壁孢子粉的疗效要次于其他3种产品，可能因为由纤维素、木质素等高分子有机物和硅、钙等无机元素构成的坚硬双壁结构妨碍了有效成分的吸收。

参考文献

[1] 李卫东，林志彬. 灵芝的扶正固本及对亚健康者的保健作用[J]. 食药用菌，2016，24(1)：29－32.

[2] ZHAO RL, CHEN QL, HE YM. The effect of *Ganoderma lucidum* extract on immunological function and identify its anti－tumor immunostimulatory activity based on the biological network[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 12680.

[3] FENG X, WANG Y. Anti－inflammatory, anti－nociceptive and sedative－hypnotic activities of lucidone D extracted from *Ganoderma lucidum*[J]. Cell Mol Bio (Noisy－le－grand), 2019, 65(4): 37－42.

[4] CHEN SD, YONG TQ, ZHANG YF, et al. Inhibitory Effect of Five Ganoderma Species (Agaricomycetes) against Key Digestive Enzymes Related to Type 2 Diabetes Mellitus[J]. Int J Med Mushrooms, 2019, 21(7): 703－711.

[5] 乔 进，窦志华，吴 锋，等. 灵芝多糖联合二甲双胍对2型糖尿病大鼠心肌结构及血流动力学的影响[J]. 中国药理学通报，2016，32(7)：1012－1016.

[6] CHEN HY, CHEN RY, DONG CH, et al. Researches and Application of Ganoderma Spores Powder[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2019, 1181: 157－186

[7] 肖 鑫，吴 岩，谢 音，等. 灵芝孢子破壁的研究[J]. 食品科技，2015，40(10)：61－65.

[8] HEYMANN F, HAMESCH K, WEISKIRCHEN R, et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice[J]. Lab Anim, 2015, 49(1 Suppl): 12－20.

[9] IBRAHIM SRM, SIRWI A, EID BG, et al. Summary of Natural Products Ameliorate Concanavalin A－Induced Liver Injury: Structures, Sources, Pharmacological Effects, and Mechanisms of Action[J]. Plants (Basel), 2021, 10(2): 228.

[10] KANEKO Y, HARADA M, KAWANO T. Augmentation of Valpha14 NKT cell－mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A－induced hepatitis[J]. Journal of Experimental Medicine, 2000, 191(1): 105－114.

[11] 池肇春. 药物性肝损伤研究现状与进展[J]. 世界华人消化杂志，2021，29(16)：915－925.

[12] 刘录录，孙 朋，李秋田，等. 刀豆蛋白A诱导的小鼠自身免疫性肝炎T细胞亚群特点分析[J]. 潍坊医学院学报，2020，42(3)：234－236.

[13] 卫博文，蒋杨雨，曹 丹，等. 雷公藤甲素对Con A诱导小鼠急性肝损伤的保护作用及机制[J]. 现代生物医学进展，2021，21(14)：2607－2611.

[14] FENG XX, CHI G, WANG H, et al. IL－37 suppresses the sustained hepatic IFN－γ / TNF－α production and T cell－dependent liver injury[J]. International Immunopharmacology, 2019, 69: 184－193.

[15] 李小刚，王天才，李绍白，等. 抗TNF－α单抗对刀豆蛋白A诱导急性肝损伤的保护作用[J]. 同济医科大学学报，2000，29(6)：513－514.

[16] 邬国栋，董佳妮，谢华祎，等. 苦豆子总碱对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. 包头医学院学报，2021，37(7)：38－41.

（收稿日期：2021－12－18；修回日期：2022－03－09）