

不同制备工艺灵芝孢子粉抗血栓、改善心脏功能作用研究

王汉波¹, 洪祝平², 李振宇¹, 张国亮², 赵建霞², 史月姣², 徐靖^{1,3}, 李振皓^{1,2,3*} (1.浙江寿仙谷医药股份有限公司, 浙江 武义 321200; 2.浙江寿仙谷植物药研究院有限公司, 杭州 310012; 3.浙江寿仙谷珍稀植物药研究院, 浙江 武义 321200)

摘要: 目的 采用斑马鱼模型, 比较研究破壁灵芝孢子粉(wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder, BGLSP)和去壁灵芝孢子粉(wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder, RGLSP)对血栓形成预防作用及心脏功能改善作用。方法 首先采用紫外可见分光光度法分别测定 BGLSP、RGLSP 中总多糖和总三萜的含量。其次, 在野生型 AB 品系斑马鱼中进行药物毒性试验, 确定灵芝孢子粉的最大耐受浓度。然后, 分别用苯肼、花生四烯酸以及普纳替尼诱发斑马鱼血栓模型, 并用 BGLSP、RGLSP 及阳性药干预。建模完成后, 用邻联茴香胺进行染色, 并用 NIS-Elements DTM 图像处理软件进行图像分析, 计算斑马鱼心脏红细胞染色强度及预防血栓作用。此外, 用维拉帕米诱发斑马鱼心衰模型, 测定斑马鱼心脏扩大面积、静脉淤血面积、心输出量以及血流速度, 定量评价灵芝孢子粉对维拉帕米诱发的斑马鱼心衰的心脏功能改善作用。结果 RGLSP 所含多糖和三萜类化合物的含量显著高于 BGLSP($P<0.001$), 分别提高了 11 倍和 5 倍。苯肼、花生四烯酸和普纳替尼诱导后, 斑马鱼心脏红细胞染色强度显著增高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。与模型对照组相比, BGLSP 高剂量组显著抑制苯肼和普纳替尼诱发的斑马鱼血栓形成($P<0.05$), 并且能够显著提高心衰斑马鱼心脏扩大改善率和心输出量增加率($P<0.05$ 或 $P<0.01$); RGLSP 低、中剂量组对苯肼、花生四烯酸和普纳替尼诱发斑马鱼血栓形成, 及对维拉帕米诱发斑马鱼心衰均具有显著保护作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 并且保护作用强于 BGLSP。结论 BGLSP 和 RGLSP 均具有显著的抗血栓及抗心衰作用, 而 RGLSP 的药效作用更明显, 可能与其较高的有效成分含量有关。

关键词: 血栓; 心衰; 斑马鱼; 灵芝孢子粉

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)19-2367-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.19.005

引用本文: 王汉波, 洪祝平, 李振宇, 等. 不同制备工艺灵芝孢子粉抗血栓、改善心脏功能作用研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(19): 2367-2373.

Study on the Antithrombotic and Cardiac Function Improvement Effects of *Ganoderma Lucidum* Spore Powder with Different Manufacturing Techniques

WANG Hanbo¹, HONG Zhuping², LI Zhenyu¹, ZHANG Guoliang², ZHAO Jianxia², SHI Yuejiao², XU Jing^{1,3}, LI Zhenhao^{1,2,3*} (1.Zhejiang Shouxiangu Pharmaceutical Co., Ltd., Wuyi 321200, China; 2.Zhejiang Shouxiangu Botanical Drug Institute Co., Ltd., Hangzhou 310012, China; 3.Zhejiang Shouxiangu Institute of Rare Plant Medicine, Wuyi 321200, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the antithrombotic and cardiac function improvement effects of wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder (BGLSP) and wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder (RGLSP) by zebrafish model. **METHODS** Firstly, the ultraviolet and visible spectrophotometry method was employed to determine the contents of total polysaccharide and triterpenoids in BGLSP and RGLSP. Secondly, the drug toxicity test was conducted in wild-type AB strains of zebrafish to determine the maximum tolerable concentration of BGLSP and RGLSP. Then, zebrafish thrombosis models were induced with phenylhydrazine, arachidonic acid, and ponatinib, respectively, and treated with various concentrations of BGLSP, RGLSP or positive drugs. After modeling, *O*-anisidine was used for staining, and NIS-Elements DTM image processing software was used for image analysis to calculate the staining intensity of zebrafish heart red blood cells and effect on preventing thrombosis. Moreover, the verapamil was used to establish a zebrafish heart failure model. The zebrafish heart enlargement area, venous congestion area, cardiac output, and blood flow velocity were measured to quantitatively evaluate the cardiac function improvement of verapamil-induced zebrafish heart failure. **RESULTS** The contents of polysaccharides and triterpenoids of RGLSP were significantly higher than those of BGLSP($P<0.001$), with fold change of 11 and 5, respectively. The staining intensities of erythrocytes in the heart were significantly increased after induction by phenyl hydrazine, arachidonic acid, ponatinib or verapamil($P<0.01$ or $P<0.001$), respectively. Compared with the model control group, high dose group of BGLSP could significantly inhibit phenylhydrazine and ponatinib-induced zebrafish thrombosis($P<0.05$), and could improve the heart

基金项目: 浙江省重点研发计划(2017C02011, 2019C02100)

作者简介: 王汉波, 男 Tel: (0579)87622568 E-mail: 10191811@qq.com *通信作者: 李振皓, 男, 博士, 副研究员 Tel: (0579)87622568 E-mail: zhenhao6@126.com

enlargement improvement rate, cardiac output increase rate of zebrafish with heart failure($P<0.05$ or $P<0.01$); low and middle dose group of RGLSP showed protective effect on phenylhydrazine, arachidonic acid and prnatinib-induced zebrafish thrombosis, and verapamil-induced zebrafish heart failure($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$), and the antithrombotic and anti-heart failure effect of RGLSP was better than that of the same dosage of BGLSP. **CONCLUSION** BGLSP and RGLSP have markedly protective effect on thrombosis and heart failure, the effect of RGLSP were better than BGLSP, which may be related to its higher content of active components.

KEYWORDS: thrombus; heart failure; zebrafish; *Ganoderma lucidum* spore powder

心血管疾病是全球第一大死亡病因, 每年导致 1 700 多万人死亡, 约占总死亡人数的 31%^[1]。除了高致死率, 心血管病的高发病率和致残率给社会、家庭和患者个人带来沉重的经济负担和心理负担。因此, 心血管疾病的预防和治疗已成为公共卫生领域的重大问题。

灵芝是中国传统珍贵药材, 具有很高的药用价值^[2-3]。灵芝孢子是灵芝发育后期弹射出来的生殖细胞, 含有丰富的灵芝多糖、三萜、甾醇、氨基酸、核苷等成分^[4]。然而, 灵芝孢子含有主要由几丁质构成的双层孢壁, 占比可 $>60\%$, 且耐酸碱, 在人体内也难以降解, 阻碍了有效成分在体内的吸收利用^[5]。因此为了提高灵芝孢子粉的效果, 近年来发展了各种破壁技术, 包括物理法、化学法、生物酶解法等。研究表明, 破壁孢子粉的药效通常优于未破壁孢子粉, 表现出较好的抗肿瘤、增强免疫等活性^[4]。但是, 破壁后壁壳仍然与有效成分混杂在一起, 有效成分的绝对含量依然很低, 而且壁壳由于不能被人体消化吸收, 长期蓄积可能导致消化不良、便秘等不良反应。前期研究中, 笔者所在课题组综合运用水洗浮选去瘪、超音速气流破壁、多级固液分离萃取等技术, 开发了灵芝孢子粉去壁工艺, 显著提高了有效成分多糖、三萜的含量^[6]。药效研究也表明, 与破壁灵芝孢子粉 (wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder, BGLSP) 相比, 去壁灵芝孢子粉 (wall-removed *Ganoderma lucidum* spore powder, RGLSP) 具有更强的增强免疫作用^[7]。

现代药理学研究证实, 灵芝具有抗炎、抗脂质过氧化及保护血管内皮细胞等作用^[8-10], 这可能是其防治心血管疾病的基础。同时, 灵芝也可通过调控不同的信号通路保护心血管疾病。Lee 等^[11]用灵芝水提取物治疗麻醉家兔和大鼠, 发现灵芝水提取物有明显的剂量依赖性降压作用, 其抗高血压机制可能与其抑制交感神经活动有关。Rubel 等^[12]研究了灵芝对诱导型一氧化氮合酶(induced

nitrogen monoxide synthase, iNOS)介导的巨噬细胞 NO 生成的影响, 通过体内外试验发现, 灵芝提取物可通过改善巨噬细胞内 iNOS 介导的 NO 过多生成而发挥抗动脉粥样硬化的作用。另有研究证实, 灵芝热水提取物对急性和高剂量乙醇所致的小鼠心脏毒性具有保护作用, 研究发现灵芝水提取物通过抑制脂质过氧化和降低丙二醛生成发挥保护作用^[13]。但是, 目前灵芝孢子粉在心血管疾病中的应用较少, 尤其在抗血栓及抗心衰等方面。

本研究首先采用紫外可见分光光度(ultraviolet and visible spectrophotometry, UV-VIS)法测定破壁、RGLSP 多糖及三萜的含量。同时通过构建斑马鱼血栓及心衰模型, 系统评价并比较了 BGLSP、RGLSP 抗血栓及改善心脏功能的作用, 为后续作用机制研究及产品开发奠定了基础, 也为灵芝孢子粉的应用提供了科学依据。

1 材料

1.1 动物

野生型 AB 系斑马鱼, 以自然成对交配繁殖方式进行, 周龄为受精后 2~5 d。黑色素等位基因突变型 Albino 系斑马鱼, 以自然成对交配繁殖方式进行, 周龄为受精后 3 d。以上斑马鱼均饲养于 28 °C 的养鱼用水中(水质: 每 1 L 反渗透水中加入 200 mg 速溶海盐, 电导率为 480~510 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; pH 为 6.9~7.2; 硬度为 53.7~71.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCO_3), 由杭州环特生物科技股份有限公司养鱼中心繁殖提供, 实验动物使用许可证号: SYXK(浙)2012-0171。饲养管理符合国际 AAALAC 认证的要求。

1.2 药物与试剂

RGLSP(批号: 18072501)、BGLSP(批号: 17053101)均由浙江寿仙谷医药股份有限公司提供; D-无水葡萄糖(批号: 110833-201908; 纯度 99.8%)、齐墩果酸(批号: 110709-201808; 纯度 91.1%)购自中国食品药品检验研究院; 普纳替尼(MedChemExpress, 批号: 13771); 花生四烯酸(批号: F1418031)、阿司匹林(批号: 059K0199)、氯

吡格雷(批号: R-4411-3G)、盐酸维拉帕米(批号: L1303078)、地高辛(批号: K1417048)、苯肼(批号: P108563)均购自上海晶纯实业有限公司。

1.3 仪器

UV2600 紫外可见分光光度计(日本岛津); SZX7 型解剖显微镜(Olympus); Zebralab3.3 (PB2084C)心跳血流分析系统(ViewPoint Life Sciences); CP214 精密电子天平(Ohaus)。

2 方法

2.1 总多糖和总三萜含量测定

根据中国药典2015年版灵芝项下【含量测定】, 采用UV-VIS测定BGLSP、RGLSP中总多糖和总三萜的含量^[4]; 以无水葡萄糖为对照品, 采用蒽酮比色法测定灵芝孢子粉多糖含量; 以齐墩果酸为对照品, 采用香兰素冰醋酸比色法测定三萜类化合物的含量。

2.2 最大可耐受浓度(maximum tolerable concentration, MTC)测定

随机选取野生型AB品系斑马鱼于6孔板中, 每孔30尾, 分别给予100, 250, 500, 1 000, 1 250, 1 500和2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 灵芝孢子粉(水溶), 每孔3 mL药液, 同时设置正常对照组。药物处理斑马鱼4 h后, 观察记录斑马鱼的毒性反应, 确定BGLSP、RGLSP的MTC^[7]。

2.3 对药物诱导血栓形成的预防作用评价

随机选取野生型AB系斑马鱼或黑色素等位基因突变型Albino系斑马鱼于6孔板中, 每孔30尾, 分别水溶给予100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (低剂量)、333 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (中剂量)和1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (高剂量)浓度的BGLSP、RGLSP, 每孔3 mL溶液, 同时设置阳性对照组(7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氯吡格雷、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿司匹林或45 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿司匹林)、正常对照组(不做任何处理)和模型对照组(不给药)。采用3种诱导剂分别建立斑马鱼血栓模型。给药6 h后, 用苯肼处理野生AB系斑马鱼24 h, 建立苯肼诱发斑马鱼血栓模型^[15]。给药3 h后, 用花生四烯酸处理黑色素等位基因突变型Albino系斑马鱼1.5 h, 建立花生四烯酸诱发斑马鱼血栓模型^[16]。灵芝孢子粉和普纳替尼共同处理野生型AB系斑马鱼18 h, 建立普纳替尼诱发斑马鱼活体血栓模型^[17]。随后各组用邻联茴香胺进行染色, 染色后每个实验组随机选取10尾斑马

鱼在解剖显微镜下拍照并采集数据, 用NIS-Elements DTM图像处理软件进行图像分析, 计算斑马鱼心脏红细胞染色强度(S), 样品预防血栓的作用计算公式如下:

$$\text{预防血栓作用(\%)} = \frac{S(\text{样品组}) - S(\text{模型对照组})}{S(\text{正常对照组}) - S(\text{模型对照组})} \times 100\%$$

2.4 对维拉帕米诱导心衰的心脏功能改善作用评价

随机选取野生型AB系斑马鱼于6孔板中, 每孔30尾, 用维拉帕米诱导建立斑马鱼心衰模型^[18], 分别水溶给予100, 333和1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的BGLSP及RGLSP, 同时设置阳性对照组(0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 地高辛)、正常对照组(不做任何处理)和模型对照组(不给药)。药物处理结束后, 一方面每组随机挑选10尾斑马鱼置于解剖显微镜下拍照(放大倍数为56倍), 分析斑马鱼心脏扩大面积和静脉淤血面积; 另一方面每组随机挑选10尾斑马鱼置于心跳血流分析系统下录制斑马鱼血流视频, 分析斑马鱼心输出量和血流速度, 定量评价灵芝孢子粉对维拉帕米诱发的斑马鱼心衰的心脏功能改善作用。

对100, 333和1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的2种灵芝孢子粉给药组, 分别记录斑马鱼心脏面积、静脉淤血面积、心输出量和血流速度, 以及相应的相对于模型对照组的心脏扩大改善率、静脉淤血改善率、心输出量增加率、血流速度增加率。心脏扩散改善率计算如下所示, 其他改善率以类似的方式计算:

$$\text{心脏扩散改善率(\%)} = \frac{\text{模型对照组心脏面积} - \text{给药组心脏面积}}{\text{模型对照组心脏面积} - \text{正常对照组心脏面积}} \times 100\%$$

2.5 统计学处理

数据用Graphpad Prism 5.01统计软件处理, 用方差分析和Dunnett's-T检验进行统计学分析, 统计学处理结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 总多糖和总三萜含量测定

RGLSP总多糖及总三萜含量均显著高于BGLSP($P < 0.001$)。去壁后, 总多糖含量从1.67%提高至20.27%, 总三萜含量从0.92%提高至5.61%, 分别提高了11倍和5倍。结果见表1。

表 1 BGLSP、RGLSP 总多糖和总三萜含量($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab. 1 Contents of total polysaccharide and triterpenoids in BGLSP and RGLSP($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	总多糖含量	总三萜含量
BGLSP 组	1.67±0.05	0.92±0.03
RGLSP 组	20.27±0.35 ¹⁾	5.61±0.25 ¹⁾

注: 与 BGLSP 组比较, ¹⁾ $P<0.001$ 。
 Note: Compared with BGLSP group, ¹⁾ $P<0.001$.

3.2 MTC 检测结果

MTC 检测结果显示, BGLSP、RGLSP 组样本的 MTC 为 1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。因此, 选取 1/10 MTC (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、1/3 MTC (333 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和 MTC (1 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 作为样品实验浓度, 结果见表 2。

表 2 样品安全浓度摸索结果($n=30$)

Tab. 2 Results of sample safety concentration($n=30$)

浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	BGLSP 组斑马鱼状态	RGLSP 组斑马鱼状态
100	正常	正常
250	正常	正常
500	正常	正常
1 000	正常	正常
1 250	无死亡, 侧翻 8 条	无死亡, 侧翻 6 条
1 500	死亡 5 条, 其余侧翻	死亡 3 条, 其余侧翻
2 000	全部死亡	全部死亡

3.3 对苯肼诱导血栓的预防作用

斑马鱼心脏红细胞染色结果显示, 与模型对照组相比, RGLSP 低、中、高剂量组具有显著的预防血栓作用($P<0.01$ 或 $P<0.001$), 且 RGLSP 低、中剂量组显著高于相应剂量 BGLSP 组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 3。

表 3 BGLSP、RGLSP 对苯肼诱导血栓的保护作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 3 Protective effect of BGLSP and RGLSP on phenylhydrazine-induced thrombosis($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	心脏红细胞染色强度	预防血栓作用/%
正常对照组	—	3 151±145 ³⁾	—
模型对照组	—	1 431±109	—
氯吡格雷组	7.5	2 039±72 ²⁾	36±4 ²⁾
BGLSP 组	100	1 552±102	7±2
	333	1 765±98	19±3
	1 000	1 985±85 ¹⁾	32±4 ¹⁾
RGLSP 组	100	2 426±79 ³⁾⁵⁾	59±5 ³⁾⁵⁾
	333	2 792±148 ³⁾⁴⁾	80±9 ³⁾⁴⁾
	1 000	2 113±92 ²⁾	40±5 ²⁾

注: 与模型对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; 与 BGLSP 对应剂量组比较, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with BGLSP group with the same dosage, ⁴⁾ $P<0.05$, ⁵⁾ $P<0.01$.

3.4 对花生四烯酸诱导血栓的预防作用

斑马鱼心脏红细胞染色结果显示, 与模型对照组比较, RGLSP 低、中剂量组具有显著的预防血栓作用($P<0.001$), 且 RGLSP 低、中剂量组显著高于相应剂量 BGLSP 组($P<0.01$)。BGLSP 在 3 个浓度下均未见显著作用。该结果说明 RGLSP 在低剂量和中剂量条件下对花生四烯酸诱导的斑马鱼血栓形成有明显的预防作用。结果见表 4。

表 4 BGLSP、RGLSP 对花生四烯酸诱导血栓的保护作用($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 4 Protective effect of BGLSP and RGLSP on arachidonic acid-induced thrombosis($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	心脏红细胞染色强度	预防血栓作用/%
正常对照组	—	2 930±104 ¹⁾	—
模型对照组	—	1 733±117	—
阿司匹林组	20	2 494±132 ¹⁾	70±12 ¹⁾
BGLSP 组	100	1 659±123	-3±3
	333	1 723±85	1±4
	1 000	1 752±102	2±6
	1 000	1 752±102	2±6
RGLSP 组	100	1 962±58 ¹⁾²⁾	21±5 ¹⁾²⁾
	333	2 252±61 ¹⁾²⁾	48±6 ¹⁾²⁾
	1 000	1 764±75	3±6

注: 与模型对照组比较, ¹⁾ $P<0.001$; 与 BGLSP 对应剂量组比较, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with BGLSP group with the same dosage, ²⁾ $P<0.01$.

3.5 对普纳替尼诱导血栓的预防作用

斑马鱼心脏红细胞染色结果显示, 与模型对照组比较, BGLSP 低、中剂量组和 RGLSP 3 个剂量组均有显著预防血栓作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 并且 RGLSP 3 个剂量组显著高于 BGLSP 组($P<0.01$), 说明在本实验浓度条件下 RGLSP 对普纳替尼诱导的斑马鱼血栓形成有预防作用, 预防效果强于 BGLSP。结果见表 5。

3.6 对维拉帕米诱导心衰的改善作用

本研究采用维拉帕米诱导斑马鱼心衰模型, 用于评估 BGLSP 和 RGLSP 抗心衰作用研究, 结果显示, 与模型对照组相比, RGLSP 低、中、高剂量组均能显著改善斑马鱼心脏面积及静脉淤血面积($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 并且 RGLSP 低、中剂量组显著高于 BGLSP 组($P<0.01$)。与模型对照组相比, RGLSP 中、低剂量组均能显著提高心输出量和提高血流速度($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$), 且 RGLSP 低剂量组显著高于 BGLSP 对应剂量组($P<0.05$)。结果见表 6~9。

表 5 BGLSP、RGLSP 对普纳替尼诱导血栓的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 5 Protective effect of BGLSP and RGLSP on ponatinib-induced thrombosis ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	心脏红细胞 染色强度	预防血栓 作用/%
正常对照组	—	4 518±83 ³⁾	—
模型对照组	—	2 267±131	—
阿司匹林组	45	4 315±99 ³⁾	95±4 ³⁾
BGLSP 组	100	2 610±121	15±6
	333	2 812±98 ¹⁾	241±4 ¹⁾
	1 000	3 041±105 ²⁾	34±6 ²⁾
RGLSP 组	100	3 418±94 ³⁾	53±4 ³⁾
	333	3 913±63 ³⁾	77±3 ³⁾
	1 000	4 273±117 ³⁾	93±5 ³⁾

注：与模型对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ ；与 BGLSP 对应剂量组比较，⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with BGLSP group with the same dosage, ⁴⁾ $P<0.01$.

结果表明，低剂量和中剂量浓度的 RGLSP 对维拉帕米诱导斑马鱼心衰的心脏功能有显著的治疗作用，治疗效果强于 BGLSP。

表 6 BGLSP、RGLSP 对心衰斑马鱼心脏扩大的改善作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 6 Protective effect of BGLSP and RGLSP on heart enlargement of zebrafish with heart failure ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	心脏面积	心脏扩大 改善率/%
正常对照组	—	6 781±251 ³⁾	—
模型对照组	—	10 708±505	—
地高辛	0.1	7 529±212 ³⁾	81±5 ³⁾
BGLSP 组	100	9 523±268	30±9
	333	9 156±156 ¹⁾	40±8 ¹⁾
	1 000	8 235±198 ²⁾	63±4 ²⁾
RGLSP 组	100	7 227±214 ³⁾	88±6 ³⁾
	333	7 656±104 ³⁾	77±3 ³⁾
	1 000	9 007±350 ²⁾	43±9 ²⁾

注：与模型对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ ；与 BGLSP 对应剂量组比较，⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with BGLSP group with the same dosage, ⁴⁾ $P<0.01$.

4 讨论

随着社会老龄化的发展进程以及不健康的生活习惯，心血管疾病已成为全球发病率和致死率最高的疾病^[19-20]，其中以血栓形成成为病理基础的心血管疾病为甚，心衰则是心血管疾病发展的终末阶段。因此抗血栓与抗心衰治疗已成为降低心血管疾病发生率的关键治疗措施。现阶段，应用

表 7 BGLSP、RGLSP 对心衰斑马鱼静脉淤血的改善作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 7 Protective effect of BGLSP and RGLSP on venous congestion in zebrafish with heart failure ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	静脉瘀血面积	静脉瘀血 改善率/%
正常对照组	—	1 129±43 ³⁾	—
模型对照组	—	3 657±235	—
地高辛	0.1	1 900±131 ³⁾	72±5 ³⁾
BGLSP 组	100	3 526±201	5±9
	333	3 125±142	21±8
	1 000	3 456±168	8±12
RGLSP 组	100	2 516±121 ²⁾	47±6 ²⁾
	333	2 234±249 ²⁾	58±10 ²⁾
	1 000	3 217±103 ¹⁾	18±4 ¹⁾

注：与模型对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ ；与 BGLSP 对应剂量组比较，⁴⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with BGLSP group with the same dosage, ⁴⁾ $P<0.01$.

表 8 BGLSP、RGLSP 对心衰斑马鱼心输出量的改善作用 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab. 8 Protective effect of BGLSP and RGLSP on cardiac output of zebrafish with heart failure ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	心输出量/ $\mu\text{L} \cdot \text{s}^{-1}$	心输出量 增加率/%
正常对照组	—	0.26±0.02 ³⁾	—
模型对照组	—	0.14±0.01	—
地高辛	0.1	0.20±0.01 ³⁾	70±5 ³⁾
BGLSP 组	100	0.14±0.02	1±3
	333	0.14±0.01	4±5
	1 000	0.17±0.01 ¹⁾	20±4 ¹⁾
RGLSP 组	100	0.21±0.02 ²⁾	67±15 ²⁾
	333	0.18±0.01 ¹⁾	41±9 ¹⁾
	1 000	0.16±0.01	20±7

注：与模型对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ ，³⁾ $P<0.001$ ；与 BGLSP 对应剂量组比较，⁴⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$; compared with BGLSP group with the same dosage, ⁴⁾ $P<0.05$.

于动物上血栓及心衰模型方法有很多，其中化学类药物诱导造模较为常用^[21-22]。此外，在筛选中药抗血栓及抗心衰活性成分时，整体动物模型所需要的动物、药品数量比较大，操作周期繁琐，实验步骤复杂，而单纯采用体外细胞试验不能真正全面反映中药的药理作用，使得中药抗血栓抗心衰活性筛选成为难题。斑马鱼作为一种相对新颖的模式脊椎动物，其心血管系统在解剖结构和生理功能上与哺乳动物相似，并且具有制作简便、实验周期短、样品用量少等优势，近年来已成为国际公认的热点整体模式动物^[23-24]。因此

表 9 BGLSP、RGLSP 对心衰斑马鱼血流速度的保护作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 9 Protective effect of BGLSP and RGLSP on blood flow velocity of zebrafish with heart failure($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	血流速度/ $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$	血流速度 增加率/%
正常对照组	—	762±38 ²⁾	—
模型对照组	—	563±21	—
地高辛	0.1	662±36 ¹⁾	48±17 ¹⁾
BGLSP 组	100	574±41	6±13
	333	602±22	20±9
	1 000	584±19	11±19
RGLSP 组	100	691±37 ²⁾³⁾	62±4 ²⁾³⁾
	333	638±16 ¹⁾	36±8 ¹⁾
	1 000	553±28	-2±12

注：与模型对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.001$ ；与 BGLSP 对应剂量组比较，³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the model control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.001$; compared with BGLSP group with the same dosage, ³⁾ $P<0.05$.

本研究分别以苯肼、花生四烯酸和普纳替尼诱发建立斑马鱼血栓模型，并以维拉帕米诱导建立斑马鱼心衰模型，评价灵芝孢子粉对斑马鱼血栓形成预防作用和心脏功能改善作用。

灵芝子实体及其药效物质在抗血栓及抗心衰等心血管病的作用已经被很多研究报道^[1,25]。Kumaran 等^[26]发现灵芝具有和传统药物相反的抗血栓作用，从灵芝中纯化的一种蛋白酶对二磷酸腺苷诱导的大鼠血小板聚集有浓度依赖性抑制作用，并具有纤溶活性，能显著改变大鼠血小板活化部分凝血活酶时间和凝血酶时间等凝血参数，最终得出灵芝的抗血栓活性可能与抗血小板活性而非抗凝活性有关的重要结论。Xie 等^[27]建立小鼠压力超负荷性心肌病模型，发现灵芝通过抑制小鼠心力衰竭相关的基因表达(包括一种新的环状 RNA circ-Foxo3)来发挥其心脏功能保护作用。灵芝多糖是灵芝的主要活性物质^[28]。汪效英等^[29]从灵芝菌丝体中分离纯化得到灵芝多糖 GLP2，通过动物模型，发现 GLP2 抗凝和抗栓作用是通过抑制血小板聚集和减弱部分凝血酶活性实现的。灵芝孢子是灵芝发育后期弹射出来的生殖细胞，含有和灵芝子实体相似的生物活性成分，包括灵芝多糖、三萜、蛋白质、氨基酸、核苷等成分。因此，本研究应用斑马鱼模型评价灵芝孢子粉的抗血栓及心脏功能改善活性。结果显示，BGLSP 和 RGLSP 均具有显著的抗血栓及抗心衰作用。进一步通过对比不同工艺灵芝孢子粉的抗血栓及抗心

衰功效，证实 RGLSP 的药效显著强于 BGLSP。此外本项目研究证实，去壁工艺显著提高其所含灵芝多糖、灵芝三萜等多种活性物质含量，提示灵芝孢子粉药效物质含量跟其药效呈正相关。

综上所述，本研究通过建立不同化学类药物诱导斑马鱼血栓及心衰模型，考察比较不同工艺灵芝孢子粉的药效功能。研究结果发现，BGLSP 和 RGLSP 均具有显著的抗血栓及抗心衰作用，而去壁工艺是提高灵芝孢子粉抗血栓及抗心衰作用的关键技术。本项目组在总结灵芝孢子粉能有效改善血栓形成及心脏功能改善作用的同时，仍需进一步进行更深入的作用机制及靶点研究，并进行其药效物质的研究，以期对日后的临床应用提供更有价值的实验依据。

REFERENCES

- [1] MENG J, YANG B X. Protective effect of *Ganoderma* (Lingzhi) on cardiovascular system[J]. Adv Exp Med Biol, 2019(1182): 181-199.
- [2] TANG C C, ZHAO R L, NI H M, et al. Molecule mechanisms of *Ganoderma lucidum* treated hepatocellular carcinoma based on the transcriptional profiles and miRNA-target network[J]. Biomed Pharmacother, 2020(125): 110028. Doi: 10.1016/j.biopha.2020.110028.
- [3] HU L J, ZHENG H X, WANG X T, et al. Textual research on origin and development of genuine medicinal herbs of *Ganoderma lucidum*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(6): 681-684.
- [4] XU J H, LI P. Researches and application of *Ganoderma* spores powder[J]. Adv Exp Med Biol, 2019(1181): 157-186.
- [5] ZHAO D, CHANG M W, LI J S, et al. Investigation of ice-assisted sonication on the microstructure and chemical quality of *Ganoderma lucidum* spores[J]. J Food Sci, 2014, 79(11): E2253-E2265.
- [6] XU J, LI Z H, LI M Y, et al. Refining process, comprehensive utilization method and application of *Ganoderma lucidum* spore powder: China, CN104013652B[P]. 2017-05-03.
- [7] LI Z H, SHI Y Q, ZHANG X H, et al. Screening immunoreactive compounds of *Ganoderma lucidum* spores by mass spectrometry molecular networking combined with *in vivo* zebrafish assays[J]. Front Pharmacol, 2020(11): 287.
- [8] DARIJA C, ŽELJKO K, MASA K H. Antitumor, antimicrobial, antioxidant and anticholinesterase effect of *Ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: A review[J]. Molecules, 2018, 23(3): 649. Doi: 10.3390/molecules23030649.
- [9] LIN Z B, DENG A Y. Antioxidative and Free Radical Scavenging Activity of *Ganoderma* (Lingzhi)[J]. Adv Exp Med Biol, 2019(1182): 271-297.
- [10] CHEN S D, YONG T Q, ZHANG Y F, et al. Anti-tumor and anti-angiogenic ergosterols from *Ganoderma lucidum*[J]. Front Chem, 2017(5): 85. Doi: 10.3389/fchem.2017.00085.

- [11] 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 Bull (Tokyo), 1990, 38(5): 1359-1364.
- [12] RUBEL R, DALLA SANTA H S, FERNANDES L C, et al. Hypolipidemic and antioxidant properties of *Ganoderma lucidum* (Leyss: Fr) Karst used as a dietary supplement[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2011, 27(5): 1083-1089.
- [13] WONG K L, CHAO H H, CHAN P, et al. Antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* in acute ethanol-induced heart toxicity[J]. Phytother Res, 2004, 18(12): 1024-1026.
- [14] 中国药典. 一部[S]. 2015: 182-183.
- [15] YIN S J, LUO Y Q, ZHAO C P, et al. Antithrombotic effect and action mechanism of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng* herbal pair on the zebrafish[J]. Chin Med, 2020(15): 35. Doi:10.1186/s13020-020-00316-y.
- [16] SHI Y P, ZHANG Y G, LI H N, et al. Discovery and identification of antithrombotic chemical markers in *Gardenia Fructus* by herbal metabolomics and zebrafish model[J]. J Ethnopharmacol, 2020(253): 112679. Doi: 10.1016/j.jep.2020.112679.
- [17] ZHU X Y, XIA B, YE T, et al. Ponatinib-induced ischemic stroke in larval zebrafish for drug screening[J]. Eur J Pharmacol, 2020(889): 173292.
- [18] ZHENG C, SHAN L, TONG P, et al. Cardiotoxicity and cardioprotection by artesunate in larval zebrafish[J]. Dose Response, 2020, 18(1): 1559325819897180. Doi: 10.1177/1559325819897180.
- [19] FARES M A. Introduction: Challenges and advances in cardiovascular disease[J]. Cleve Clin J Med, 2017, 84(12 Suppl 3): 11. Doi: 10.3949/ccjm.84.s3.01.
- [20] COLL P P, ROCHE V, OLSEN J S, et al. The prevention of cardiovascular disease in older adults[J]. J Am Geriatr Soc, 2020, 68(5): 1098-1106.
- [21] WANG M L, PAN Y M, JIN M, et al. Establishment of a zebrafish model of thrombosis and the intervention effect of Guanxinning tablet[J]. Acta Lab Animalis Sci Sin(中国实验动物学报), 2016, 24(4): 432-438.
- [22] ZHU X Y, LIU H C, GUO S Y, et al. A zebrafish thrombosis model for assessing antithrombotic drugs[J]. Zebrafish, 2016, 13(4): 335-344.
- [23] ZHANG J, LI X M, MIAO M S, et al. Analysis of animal models of heart failure based on characteristics of clinical symptoms of traditional Chinese and Western medicine[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2021, 46(4): 786-791.
- [24] GORE A V, PILLAY L M, VENERO GALANTERNIK M, et al. The zebrafish: A fantastic model for hematopoietic development and disease[J]. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2018, 7(3): e312.
- [25] SARGOWO D, OVIANTI N, SUSILOWATI E, et al. The role of polysaccharide peptide of *Ganoderma lucidum* as a potent antioxidant against atherosclerosis in high risk and stable angina patients[J]. Indian Heart J, 2018, 70(5): 608-614.
- [26] KUMARAN S, PALANI P, NISHANTHI R, et al. Studies on screening, isolation and purification of a fibrinolytic protease from an isolate (VK12) of *Ganoderma lucidum* and evaluation of its antithrombotic activity[J]. Med Mycol J, 2011, 52(2): 153-162.
- [27] XIE Y Z, YANG F H, TAN W J, et al. The anti-cancer components of *Ganoderma lucidum* possesses cardiovascular protective effect by regulating circular RNA expression[J]. Oncoscience, 2016, 3(7/8): 203-207.
- [28] SHEN S F, ZHU L F, WU Z, et al. Production of triterpenoid compounds from *Ganoderma lucidum* spore powder using ultrasound-assisted extraction[J]. Prep Biochem Biotechnol, 2020, 50(3): 302-315.
- [29] WANG X Y, LIU G F, CHEN C H, et al. Extraction and purification of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and anticoagulation and antithrombosis action of GLP₂[J]. J Fujian Med Univ(福建医科大学学报), 2002, 36(2): 189-192.

收稿日期: 2020-11-13

(本文责编: 曹粤锋)