

灵芝多糖的超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性分析

张郡月^{1,2}, 张瑞¹, 柴秋泉³, 韩忠明¹, 张楠^{1,2}, 闫梅霞^{1,2*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118) (2. 中国农业科学院特产研究所, 吉林长春 130112)

(3. 吉林省园艺特产管理站, 吉林长春 130021)

摘要: 为实现灵芝多糖 (*Ganoderma lucidum* Polysaccharides, GLP) 的高效利用, 该研究采用单因素及响应面法对灵芝子实体多糖超声辅助提取工艺进行优化, 测定 GLP 的体外抗氧化能力, 在此基础上建立 H₂O₂ 诱导的 HepG2 细胞氧化损伤模型, 研究其对细胞氧化应激的保护作用。结果表明, GLP 最优提取工艺为: 温度 88 ℃, 水提时间 2.5 h, 液料比 41:1 (mL·g⁻¹), 超声时间 40 min, 多糖得率为 3.05%; 1 mg·mL⁻¹ 质量浓度下的 GLP 对羟基 (Oxhydryl, ·OH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-Trinitrophenylhydrazine, DPPH)、2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸) (2,2'-Azidobis (3-Ethylbenzo Dihydrothiazoline-6-Sulfonic), ABTS) 分别可达 79.49%、70.55%、79.61%; 细胞试验结果表明, 质量浓度为 8 μg/mL 的 GLP 可使细胞存活率恢复到将近 100%, 与模型组相比, GLP 各剂量组的超氧化物歧化酶 (SOD) 提高 28.44%~61.61%, 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 提高 58.61%~101.75%, 丙二醛 (MDA) 降低 14.28%~32.89%, 减少活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 累积, 显著下调 *Nrf2*, *HO-1*、上调 *Keap1* 基因表达 ($P<0.01$), 通过激活 *keap1/Nrf2* 信号通路, 缓解细胞氧化应激损伤。该研究可为 GLP 提取及抗氧化功能产品的开发利用提供参考依据。

关键词: 灵芝多糖; 工艺优化; HepG2 细胞; 氧化应激; *keap1-Nrf2* 信号通路

文章编号: 1673-9078(2026)04-184-194

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.4.0057

Optimization of Ultrasound-assisted Extraction Process and Antioxidant Activity of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides

ZHANG Junyue^{1,2}, ZHANG Rui¹, CHAI Qiuquan³, HAN Zhongming¹, ZHANG Nan^{1,2}, YAN Meixia^{1,2*}

(1. College of Traditional Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(2. Institute of Special Animal and Plant Sciences of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China) (3. Jilin Province Horticultural Specialty Management Station, Changchun 130021, China)

Abstract: To achieve efficient utilization of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLP), the extraction process of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies was optimized through single-factor and response surface methodology. Subsequently, the *in vitro* antioxidant capacity of GLP was determined. Based on these findings, an oxidative damage model was established using H₂O₂-induced HepG2 cells to investigate the protective effects of GLP against cellular oxidative stress. The results demonstrated that the optimal extraction conditions were as follows: extraction temperature of 88 ℃, water extraction time of 2.5 h,

引文格式:

张郡月,张瑞,柴秋泉,等.灵芝多糖的超声辅助提取工艺优化及抗氧化活性分析[J].现代食品科技,2026,42(4):184-194.

ZHANG Junyue, ZHANG Rui, CHAI Qiuquan, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction process and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(4): 184-194.

收稿日期: 2025-01-13; 修回日期: 2025-03-02; 接受日期: 2025-03-04

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20240401053YY)

作者简介: 张郡月 (2000-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理学, E-mail: zjy1053421136@163.com

通讯作者: 闫梅霞 (1982-), 女, 研究员, 研究方向: 食药菌种质创新与开发利用, E-mail: yanmeixia@caas.cn

liquid-to-solid ratio of 41:1 (mL·g), and ultrasonic treatment duration of 40 min. Under these conditions, the polysaccharide yield rate was 3.05%. At a concentration of 1 mg·mL⁻¹, GLP exhibited remarkable scavenging activities against oxhydryl, 1,1-diphenyl-2-dinitrophenylhydrazine, and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), with scavenging rates reaching 79.49%, 70.55%, and 79.61%, respectively. Cellular experiments revealed that 8 µg·mL⁻¹ GLP was able to restore cell viability to nearly 100%. Compared with the model group, all GLP treatment groups showed increases of 28.44%~61.61% in superoxide dismutase (SOD) and 58.61~101.75% in glutathione peroxidase (GSH-Px), as well as reductions of 14.28%~32.89% in malondialdehyde (MDA) levels. Furthermore, GLP treatment effectively reduced reactive oxygen species accumulation and significantly downregulated the expression of *Nrf2* and *HO-1* genes, while upregulating *Keap1* gene expression ($P<0.01$). The protective effects against oxidative stress were mediated through activation of the *Keap1/Nrf2* signaling pathway. This study provides a valuable reference for the development of GLP extraction methods and antioxidant functional products.

Key words: *Ganoderma lucidum* polysaccharides; process optimization; HepG2 cells; oxidation stress; *Keap1/Nrf2* signaling pathway

灵芝 (*Ganoderma lucidum*) 是一种传统药用真菌, 在我国已有两千多年的历史, 药用部位为子实体, 最早记载于《神农本草经》, 具有补气安神, 止咳平喘的功效^[1,2]。灵芝含有多糖、三萜、甾醇等多种活性成分^[3,4], 其中灵芝多糖 (*Ganoderma lucidum* Polysaccharides, GLP) 功能特性较为明显, 具有较高的药用价值^[5]。灵芝子实体木质化程度较高, 多糖提取得率较低, 在灵芝多糖提取中, 提取工艺中各因素均会对其得率及功效产生影响, 其中超声辅助提取利用超声波产生的空化效应破坏植物细胞壁, 从而加速多糖的溶出。多糖的提取工艺与功效活性相关, 超声辅助提取得到的多糖体外清除自由基能力优于热水浸提的多糖^[6]。但目前灵芝多糖特定提取工艺结合生物活性评价方面的研究鲜少报道, 以及灵芝多糖在后续功能性产品开发方面缺少有效的数据参考。

当外界条件刺激机体时, 产生的过量活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 会破坏机体氧化还原平衡, 即氧化应激状态^[7]。氧化应激及其持续伴随的炎症在许多急慢性疾病的发病机制中起着关键作用^[8,9]。人工合成的抗氧化剂和药物如 N-乙酰半胱氨酸, 普罗布考以及硫辛酸等对修复机体氧化损伤效果显著, 但容易导致皮疹, 头晕以及肝肾功能下降等副作用^[10]。近年来, 天然、无毒副作用的药食同源类抗氧化功能性物质逐年增加, 灵芝也因其被纳入药食同源目录为其产业的发展带来了新的机遇, 已知灵芝多糖的药理作用有调节免疫力, 抗炎和抗氧化等, 但关于灵芝多糖的抗氧化应激作用机制却鲜有研究^[11,12]。

本研究通过单因素实验及响应面法对超声辅助提取 GLP 工艺进行优化并测定羟基 (Oxhydryl, OH)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-Diphenyl-2-

Trinitrophenylhydrazine, DPPH)、2,2'-连氮基-双-(3-乙基苯并二氢噻唑啉-6-磺酸)(2,2'-Azidobis(3-Ethylbenzo Dihydrothiazoline-6-Sulfonic), ABTS) 自由基的清除效果, 以期得到高得率、高活性的 GLP; 在此基础上建立 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞氧化应激模型, 测定细胞活力、抗氧化酶活性、ROS 水平及氧化应激相关基因表达量, 探究 GLP 对细胞在 *Keap1/Nrf2* 信号通路中的抗氧化应激作用机制, 全面的评估 GLP 提取工艺及其体外抗氧化能力。为灵芝深加工和抗氧化功能性食品的研究与开发提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

材料: 赤芝子实体洗净烘干粉碎样品, 人肝癌细胞株 HepG2 (简称 HepG2), 由中国农业科学院特产研究所鉴定与提供。

无水乙醇, H₂O₂ 溶液 (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司; Cell Counting Kit-8 (CCK8)、ROS、BSA 蛋白浓度测定试剂盒, 上海雅酶生物医药科技有限公司; DPPH、ABTS 自由基清除率、总 SOD、GSH-Px、MDA 检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所有限公司; TRNzol Universal RNA 提取试剂盒, 上海碧云天生物技术公司; PBS 缓冲液、DMEM-F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶溶液、青链霉素, 武汉赛维尔生物科技有限公司; 2* Rapid Taq Master Mix, ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix, 诺唯赞生物科技有限公司。

324-1CN 型电子天平, 赛多利斯科学仪器有限公司; UV2550 紫外-可见分光光度计, 日本岛津株式会社; Moticam 倒置数码显微镜、AMG EVOS FL 倒置荧

光显微镜, 麦克奥迪集团; KQ5200V 型超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 灵芝多糖的提取工艺优化

1.2.1.1 灵芝多糖的提取

过 40 目筛的灵芝子实体样品用无水乙醇浸泡 2 次, 每次 24 h, 脱去脂类、酚类及其他小分子物质, 4 200 r·min⁻¹ 离心 10 min, 60 ℃ 烘干粉碎。称取样品粉末 2 g, 按料液比比例加入蒸馏水, 放入圆底烧瓶, 超声辅助浸提 30 min, 80 ℃ 热水浴提取 2 次, 浓缩滤液, 4 ℃ 条件下醇沉 12 h, 4 200 r·min⁻¹ 离心 10 min, 至此, 多糖以沉淀形式从水溶性糖溶液中分离出来, 沉淀烘干即为灵芝粗多糖 (cGLP)。多糖含量测定采用硫酸-蒽酮法^[13]。以葡萄糖为标准品建立标准曲线, 得到标准方程 $Y=20.316x-0.009\ 5$ ($R^2=0.999\ 3$), 根据方程计算公式中的 C 值, cGLP 得率计算公式如下:

$$Y=\frac{C\cdot V\cdot n}{M_1}\times 100\%$$

(1)

式中:

Y—cGLP 得率, %;

C—cGLP 质量浓度, mg·mL⁻¹;

V—cGLP 溶液总体积, mL;

n—稀释倍数;

M₁—样品质量, g。

1.2.1.2 单因素实验

(1) 提取温度: 在水提时间 2 h, 液料比 20:1 (mL/g), 超声时间 30 min 条件下, 提取温度分别选取 60、70、80、90、100 ℃。

(2) 水提时间: 在提取温度 80 ℃, 液料比 20:1 (mL/g), 超声时间 30 min 条件下, 水提时间分别选取 1、1.5、2、2.5、3 h。

(3) 液料比: 在提取温度 80 ℃, 水提时间 2 h, 超声时间 30 min 条件下, 液料比分别选取 10:1、20:1、30:1、40:1、50:1 (mL/g)。

(4) 超声时间: 在提取温度 80 ℃, 水提时间 2 h, 液料比 20:1 (mL/g) 条件下, 超声时间分别选取 10、20、30、40、50 min。

1.2.1.3 响应面优化试验

基于单因素实验结果, 采用 Design-Expert 8.0.6.1 软件, 选取 Box-Behnken 设计方案进行中心组合试验, 并以提取温度 (A)、水提时间 (B)、液料比 (C) 以及超声时间 (D) 为影响因素, cGLP 得率为响应值, 平行试验三次, 具体条件见表 1。

表 1 响应面分析因素及水平表
Table 1 Response surface analysis factors and level table

水平	因素			
	A/℃	B/h	C/(mL/g)	D/min
-1	80	2	30:1	30
0	90	2.5	40:1	40
1	100	3	50:1	50

1.2.1.4 灵芝多糖的纯化及含量测定

采用“1.2.1.3”的最佳提取工艺提取得到的 cGLP, 烘干后用水充分溶解, 7 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液, 采用 Sevage (正丁醇: 三氯甲烷 = 1:4) 法除蛋白, 重复多次。除蛋白后的粗多糖溶液转入截流量为 3 500 Da 的透析袋, 蒸馏水透析 48 h 除去多糖中的小分子杂质, 透析后将多糖溶液冷冻干燥, 得到灵芝多糖含量为 73.83% 的精制灵芝多糖 (GLP), 用于后续实验。灵芝多糖含量测定方法同“1.2.1.1”, 公式如下:

$$Y=\frac{C\cdot V\cdot n}{M_2}\times 100\%$$

(2)

式中:

Y—GLP 含量, %;

C—GLP 质量浓度, mg·mL⁻¹;

V—GLP 溶液总体积, mL;

n—稀释倍数;

M₂—提取得到的 GLP 质量, g。

1.2.2 灵芝多糖体外抗氧化能力测定

1.2.2.1 供试品溶液的配制

称取 GLP 0.05 g, 加入 1 mL 提取液, 40 ℃ 水浴浸提 30 min, 10 000 r·min⁻¹ 室温离心 10 min, 取上清 4 ℃ 保存。随后制备出质量浓度为 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg·mL⁻¹ 的 GLP 溶液备用。再将 10 mg Vc 加入 1 mL 提取液配置成 10 mg·mL⁻¹ 的 Vc 溶液备用。

1.2.2.2 OH 自由基清除率的测定

按参考文献方法^[14,15], 羟自由基清除率计算公式如下:

$$I=\frac{A_0-A_i+A_j}{A_0}\times 100\%$$

(3)

式中:

I—·OH 自由基清除率, %;

A_i—初始上清液吸光度;

A_j—水杨酸无水乙醇溶液替换为无水乙醇吸光度;

A₀—GLP 溶液替换为蒸馏水吸光度。

1.2.2.3 DPPH 自由基清除率的测定

严格按照试剂盒说明书进行操作, DPPH 自由基

清除率计算公式如下：

$$D_1 = \frac{A_0 - A_3}{A_0} \times 100\%$$

(4)

$$D_2 = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\%$$

(5)

式中：

D_1 ——Vc·DPPH 清除率，%；

D_2 ——GLP·DPPH 清除率，%；

A_0 ——空白孔吸光度；

A_1 ——GLP 测定孔吸光度；

A_2 ——GLP 对照孔吸光度；

A_3 ——Vc 对照孔吸光度。

1.2.2.4 ABTS阳离子自由基清除率的测定

严格按照试剂盒说明书进行操作，ABTS 阳离子自由基清除率计算公式如下：

$$D_1 = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \times 100\%$$

(6)

$$D_2 = \frac{A_1 - (A_3 - A_4)}{A_1} \times 100\%$$

(7)

式中：

D_1 ——Vc ABTS⁺· 清除率，%；

D_2 ——GLP ABTS⁺· 清除率，%；

A_1 ——空白孔吸光度；

A_2 ——Vc 对照孔吸光度；

A_3 ——GLP 测定孔吸光度；

A_4 ——GLP 对照孔吸光度。

1.2.3 灵芝多糖对HepG2细胞氧化应激水平的检测

1.2.3.1 细胞的培养

HepG2 细胞在 37 ℃、5% CO₂ 环境中贴壁培养，待密度到达 80% 左右进行传代与铺板。

1.2.3.2 CCK-8法测定GLP和H₂O₂对细胞活性的影响

表2 试验组别

Table 2 Test group

组别	GLP/ (μg/mL)	培养时间/ h	H ₂ O ₂ / (μmol/L)	培养时间/ h
空白对照组	/	24	/	24
模型组	/	24	800	24
低剂量组	2	24	800	24
中剂量组	4	24	800	24
高剂量组	8	24	800	24

取对数生长期 HepG2 细胞，稀释至所需密度，每孔 100 μL 接种于 96 孔板，分别给予 0、2、4、8 μg·mL⁻¹ GLP 溶液干预 24 h，CCK8 法检测细胞存活率，筛选出作用于细胞的 GLP 最佳安全质量浓度，分别给予 0、100、200、300、400、500、600、700、800 μmol·L⁻¹

H₂O₂ 溶液干预 24 h，筛选出用于建立 HepG2 细胞氧化应激细胞模型的最适 H₂O₂ 浓度。然后将 HepG2 细胞按表 2 进行分组，CCK8 法测定细胞存活率。

细胞存活率计算公式如下：

$$S = \frac{A_1 - A_3}{A_2 - A_3} \times 100\%$$

(8)

式中：

S ——细胞存活率，%；

A_1 ——给药组吸光度；

A_2 ——空白对照组吸光度；

A_3 ——空白组吸光度。

1.2.3.3 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化损伤中形态学的影响

1.2.3.2 项结束后，使用倒置显微镜拍照观察细胞形态。

1.2.3.4 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化损伤中SOD、GSH-Px、MDA的影响

1.2.3.3 项结束后，收集各组细胞培养液，按照各试剂盒说明书进行检测和计算。

1.2.3.5 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化损伤中产生ROS的影响

1.2.3.4 项结束后，每孔加入 10 μmol·L⁻¹ 的 DCFH-DA，孵育 20 min，弃上清，PBS 洗涤，倒置荧光显微镜下观察。

1.2.3.6 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化应激相关基因mRNA表达水平的影响

表 3 基因引物序列

Table 3 Gene primer sequences

基因	上下游	引物序列 (5' to 3')
<i>β-actin</i>	上游	GGTCATCACTATTGGCAACG
	下游	ACGGATGTCAACGTCACACT
<i>Nrf2</i>	上游	CGAGATATACGCAGGAGAGGTAAGA
	下游	GCTCGACAATGTTCTCCAGCTT
<i>Keap-1</i>	上游	ATGAGGCATAGTGTGGAGCG
	下游	ACTACGGTGATAGCCTCCGA
<i>HO-1</i>	上游	TGCAGGTGATGCTGACAGAGG
	下游	GGGATGAGCTAGTGCTGATCTGG

采用 Trizol 试剂盒提取细胞中总 RNA，合成 cDNA，于 -80 ℃ 中保存。在生物工程公司对本实验的 *β-actin*、*Nrf2*、*Keap1* 和 *HO-1* 基因引物进行合成，基因引物序列见表 3。荧光定量 PCR 采用 TB Green 染料法，在表 4 的反应程序下进行实验，待 qRT-PCR 反应结束，以 *β-actin* 作为管家基因，采用 2-ΔΔCt 方法计算目的基因 mRNA 的相对表达量。

表 4 反应程序			
Table 4 Reaction procedure			
步骤	重复次数	反应温度/℃	反应时间
预变性	1	95	3 min
循环反应	40	95	3 s
		60	32 s
		95	15 s
熔解曲线	1	60	60 s
		95	15 s

1.3 数据统计与分析

响应面试验相关数据，利用 Esign-Expert 8.0.6.1 软件进行分析；测定实验使用 GraphPad Prism 8 对数据进行统计分析，使用单因素方差分析（ANOVA）进行统计学评估， $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 灵芝多糖的提取工艺优化结果

2.1.1 单因素试验结果

如图 1 所示，多糖得率均呈先升高后降低趋势，当提取温度为 90 ℃ 时，达到最大值 1.94%，因此选取 80、90、100 ℃ 进行考察；当水提时间为 2.5 h 时，达到最大值 1.43%，因此选择 2、2.5、3 h 进行考察；当液料比为 40:1 (mL/g) 时，达到最大值 1.22%，因此选择 30:1、40:1、50:1 进行考察；当超声时间为 40 min 时，多糖得率达到最大值 1.49%，因此选择 30、40、50 min 进行考察。

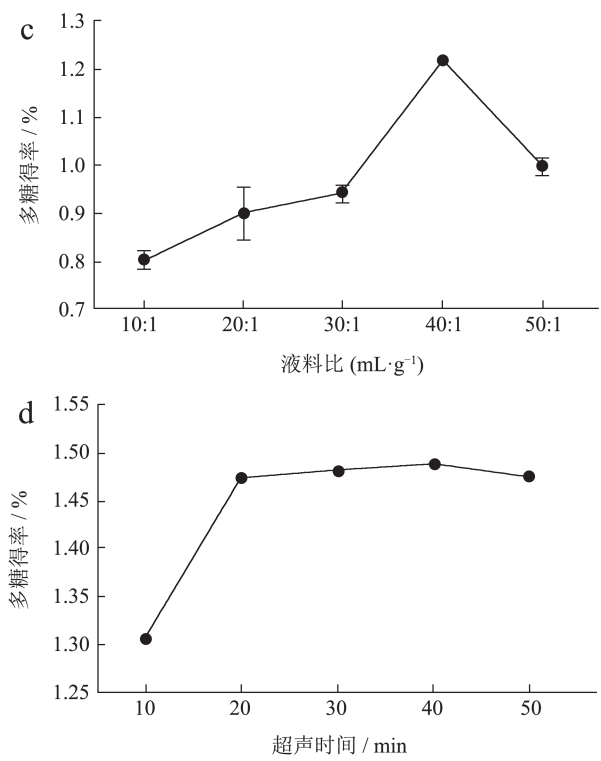
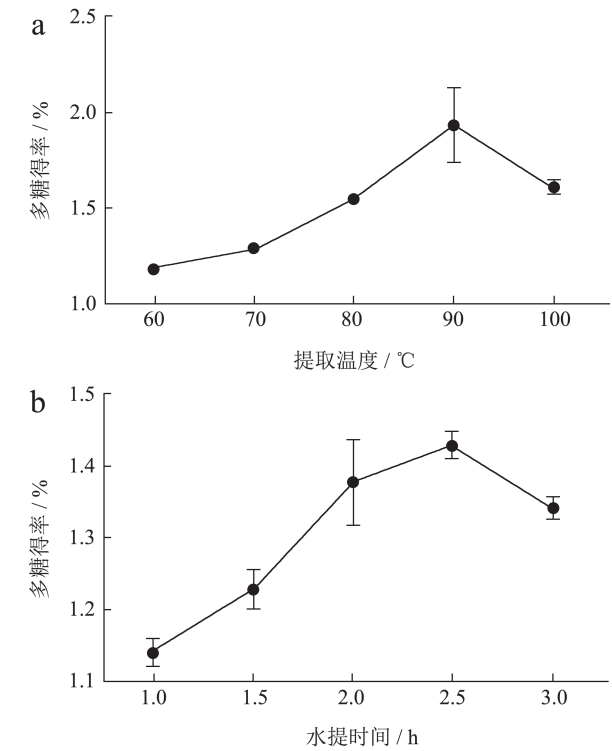


图 1 提取温度、水提时间、液料比及超声时间对 cGLP 得率的影响

Fig.1 The effects of extraction temperature, water extraction time, liquid-solid ratio and ultrasonic time on the yield rate of cGLP were studied

2.1.2 响应面法优化实验结果

基于单因素实验结果，进一步运用 Box-Behnken 响应面法实验设计原理来对提取条件予以优化，实验设计与结果呈现于表 5 中。之后借助 Design-Expert 13 软件针对实验结果展开回归方差分析以及拟合度分析，获取到得率针对各因素的多元二次回归模型：

$$Y=-115.905\ 67+1.499\ 87A+10.833\ 33B+0.967\ 700C+0.964\ 533D+0.031\ 000AB-0.002\ 375AC-0.002\ 64D+0.028\ 000\ BC-0.018\ 5\ BD-0.000\ 300CD-0.007\ 794A^2-2.807\ 67B^2-0.009\ 944C^2-0.008\ 369D^2$$

式中：
Y——cGLP 得率，%；
A——提取温度，℃；
B——水提时间，h；
C——液料比，mL/g；
D——超声时间，h。

2.1.3 回归模型方差分析

表 6、7 所示为回归模型的方差分析和误差分析， $F=106.69$ ， $P<0.000\ 1$ ，说明模型具有显著意义，实验设计可靠。失拟项 P 值为 $0.244\ 4>0.05$ ，差异不显著，说明模型拟合良好，未知因素对实验结果影响较

小。将表 6 中 A、B、C、D 四个因素的 F 值进行排序，影响顺序为：提取温度（A）>液料比（C）>超声时间（D）>水提时间（B）。

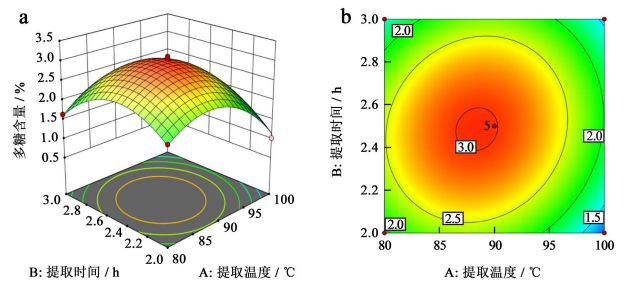
表 5 Box-Behnken响应面试验设计与结果					
Table 5 Box-Behnken response surface experimental design and results					
试验号	因素				得率/%
	A/℃	B/h	C/(mL/g)	D/min	
1	0	1	-1	0	0.98
2	-1	0	-1	0	1.05
3	0	-1	1	0	1.37
4	0	-1	-1	0	1.26
5	1	0	-1	0	1.11
6	1	1	0	0	1.02
7	0	0	1	-1	1.29
8	0	0	0	0	2.97
9	-1	1	0	0	1.64
10	0	0	0	0	3.01
11	0	1	1	0	1.65
12	0	0	1	1	1.19
13	1	0	1	0	1.02
14	1	1	0	0	1.31
15	0	0	-1	-1	1.02
16	0	0	0	0	3.03
17	0	0	0	0	3.11
18	-1	0	0	1	1.95
19	-1	0	1	0	1.91
20	1	0	0	1	1.01
21	0	0	-1	1	1.04
22	0	-1	0	-1	1.44
23	-1	-1	0	0	1.97
24	0	-1	0	1	1.66
25	-1	0	0	-1	1.26
26	0	1	0	1	1.39
27	0	0	0	0	2.92
28	1	0	0	-1	1.36
29	0	1	0	-1	1.54

表 6 回归模型方差分析						
Table 6 Regression model analysis of variance						
来源	平方	自由度	均方	F 值	P 值	显著水平
Model	13.49	14	0.963 6	106.69	<0.000 1	significant
A	0.725 2	1	0.725 2	80.29	<0.000 1	
B	0.003 7	1	0.003 7	0.406 9	0.533 8	
C	0.323 4	1	0.323 4	35.81	<0.000 1	
D	0.009 1	1	0.009 1	1.00	0.333 2	
AB	0.096 1	1	0.096 1	10.64	0.005 7	
AC	0.225 6	1	0.225 6	24.98	0.000 2	
AD	0.270 4	1	0.270 4	29.94	<0.000 1	
BC	0.078 4	1	0.078 4	8.68	0.010 6	
BD	0.034 2	1	0.034 2	3.79	0.071 9	
CD	0.003 6	1	0.003 6	0.398 6	0.538 0	
A ²	3.94	1	3.94	436.28	<0.000 1	
B ²	3.20	1	3.20	353.84	<0.000 1	
C ²	6.41	1	6.41	710.18	<0.000 1	
D ²	4.54	1	4.54	503.03	<0.000 1	
残差	0.126 4	14	0.009 0			
失拟项	0.106 4	10	0.010 6	2.12	0.244 4	not significant
纯误差	0.020 1	4	0.005 0			
总离差	13.62	28				
$R^2=0.990\ 7$				$R^2_{adj}=0.981\ 4$		

表 7 回归模型误差统计分析			
Table 7 Statistical analysis of regression model error			
统计项目	数值	统计项目	数值
标准差	0.095 0	拟合系数	0.990 7
平均数	1.64	校正拟合系数	0.981 4
变异系数/%	5.80	预测拟合系数	0.952 7
压力	0.644 0	信噪比	30.646 3

2.1.4 因素间交互作用分析

响应面曲面坡度越陡、等高线曲线越弯曲，交互作用越显著，表明该因素对结果的影响越大。由图 2 可知，多糖得率影响顺序为：AD > AC > AB > BC > BD > CD。



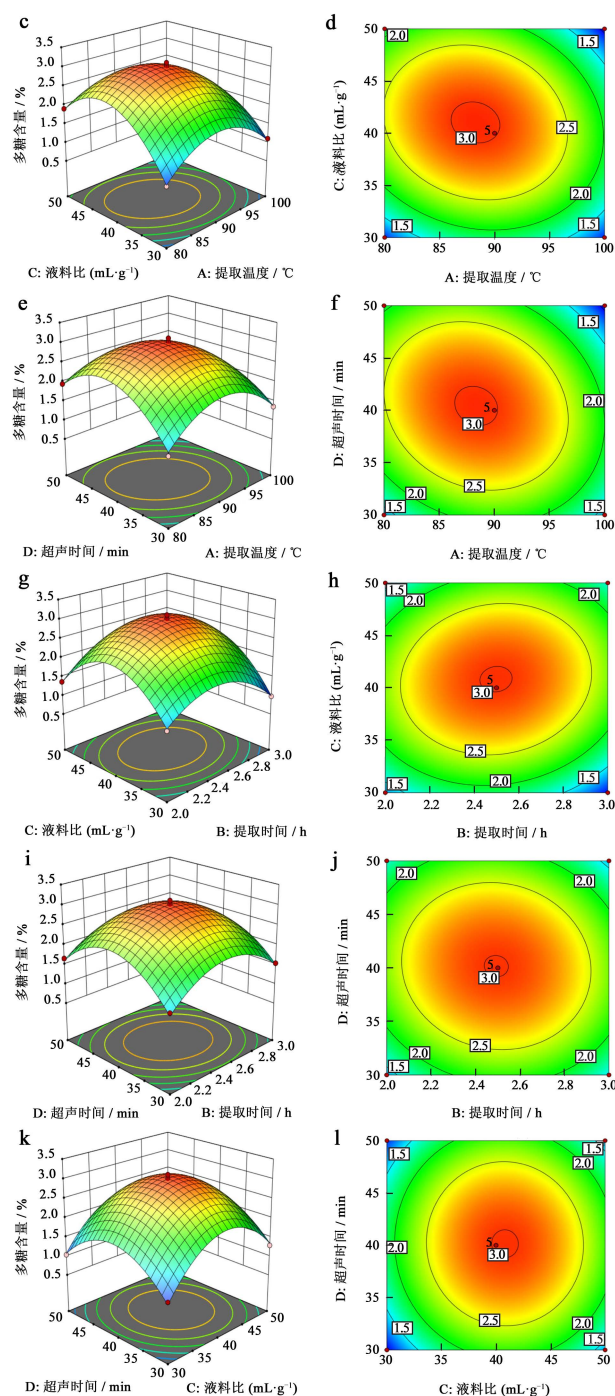


图2 各因素交互作用对多糖得率影响的响应面图和等高线图

Fig.2 Response surface diagram and contour map of the interaction of various factors on polysaccharide yield rate

2.1.5 验证工艺

根据实际条件,最佳工艺为提取温度 88 ℃,水提时间 2.5 h,液料比 40:1 (mL/g),超声时间 40 min,在此条件下提取三次,实际多糖得率为 3.05%,与预测值 3.04% 相近。因此,多糖得率回归方程可行。

灵芝多糖的提取方法包括热水浸提法、超声提取法、微波提取法等^[16,17]。热水浸提法最常用,其易操作、成本低,但耗时久、得率低^[18]。刘养山等^[19]在液料比

30:1 (mL/g)、97 ℃ 条件下利用热水浸提法提取 2.5 h,灵芝中多糖得率为 1.45%,张书山等^[20]在提取时间 3 h、液料比 50:1 (mL/g) 条件下利用热水浸提法提取 5 次,灵芝中多糖得率为 1.28%。与上述实验相比,本实验采取的超声辅助热水浸提法可以在缩短提取时间的同时显著提高多糖得率。

2.2 灵芝多糖体外抗氧化活性分析

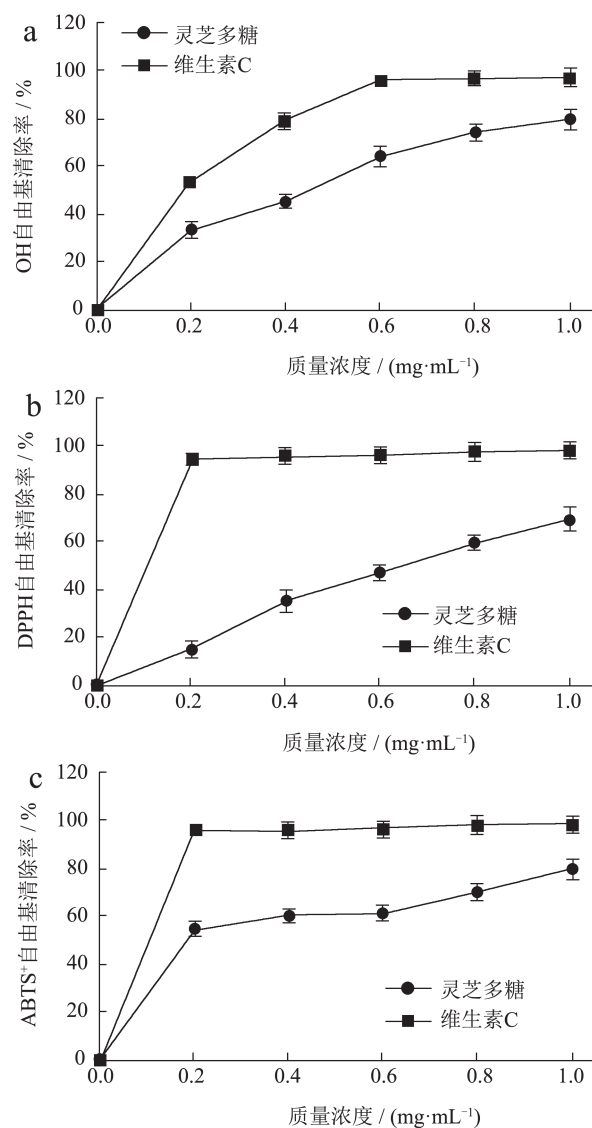


图3 GLP 对自由基清除率的影响

Fig.3 The effect of GLP on free radical scavenging rate

过多自由基的产生会导致机体氧化应激,从而患上多种慢性疾病^[21,22]。近年来,人们越来越重视天然活性物质对机体的保护和修复作用^[23]。由图 3 可见,在质量浓度为 0~1 mg·mL⁻¹ 时,GLP 对各自由基的清除率与质量浓度均呈正向关系。GLP 质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 时,OH·、DPPH·、ABTS⁺ 自由基清除率达到最高,分别为: 79.49%、70.55%、79.61%,经线性拟合,GLP 对 ·OH、DPPH·、ABTS⁺ 的 IC₅₀ 值分别为 0.39、0.61、

0.17 mg·mL⁻¹。略低于同质量浓度 Vc 的清除效果。周天天等^[24]研究表明黑木耳多糖质量浓度为 1 mg·mL⁻¹时对 DPPH 自由基的清除率清除率为 48%。颜瑞辰等^[25]研究表明,通过热水浸提法得到的灵芝多糖对在质量浓度为 1 mg·mL⁻¹时·OH 的清除能力为 61.21%,本研究提取工艺下的 GLP 对·OH、DPPH·清除率均高于以上研究,具有较强的体外抗氧化活性。

2.3 灵芝多糖对HepG2细胞氧化应激水平的影响

2.3.1 不同浓度灵芝多糖及H₂O₂对HepG2细胞存活率的影响

如图 4 所示, GLP 各组细胞存活率均高于 90%, 表明 GLP 在此范围内无明显细胞毒性作用。H₂O₂ 处理的细胞存活率与 H₂O₂ 浓度呈反比, IC₅₀ 值处于 800 μmol·L⁻¹ 处, 因此使用 800 μmol·L⁻¹ 作为造模浓度构建氧化损伤模型。

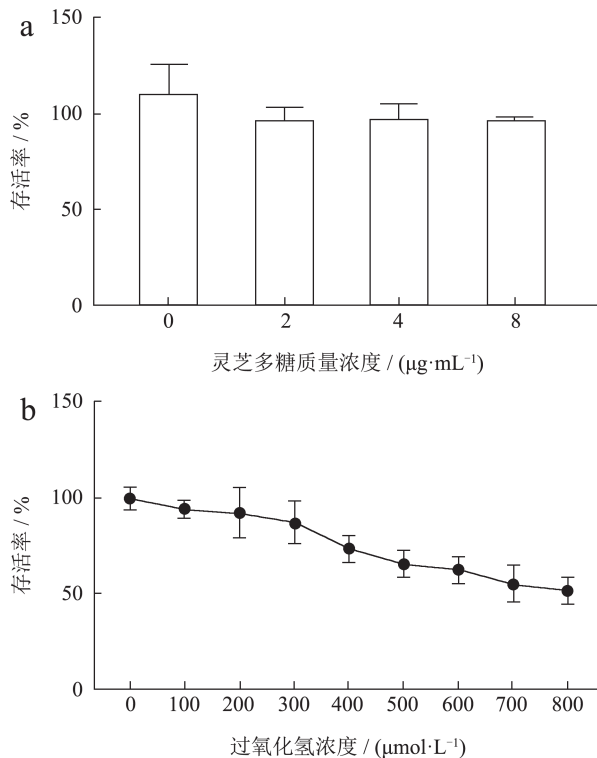


图 4 GLP 及 H₂O₂ 对 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.4 The effect of GLP and H₂O₂ on the survival rate of HepG2 cells

2.3.2 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化损伤的保护作用

H₂O₂ 能氧化细胞膜上的脂类物质和蛋白质, 穿透细胞膜生成多种自由基, 导致细胞凋亡损伤, 常用其构建细胞氧化应激模型^[26]。如图 5 所示, 模型组细胞存活率较空白对照组显著降低 ($P < 0.01$), 表明造模成功。GLP 质量浓度为 4~8 μg·mL⁻¹ 时, 细胞存活率与

模型组相比显著升高 ($P < 0.01$)。当 GLP 为 8 μg·mL⁻¹ 时, 细胞存活率接近空白对照组的水平, 存活率接近 100%。由此可知, GLP 对 H₂O₂ 诱导损伤的 HepG2 细胞具有良好的保护作用, 能有效缓解细胞的氧化损伤

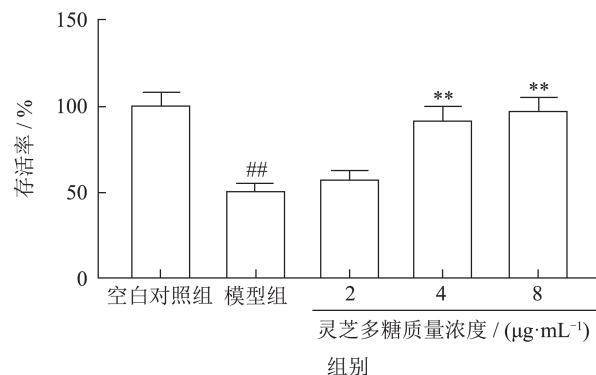


图 5 GLP 对 H₂O₂ 诱导 HepG2 细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of GLP on the viability of HepG2 cells induced by H₂O₂

注: 模型组与空白对照组相比 (## $P < 0.01$); 给药组与模型组相比 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。图 7、9 同。

2.3.3 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化损伤的形态学影响

由图 6 可知, HepG2 细胞暴露于 H₂O₂ 24 h 后, 空白对照组细胞状态良好, 连接紧密, 排列整齐; 模型组细胞较空白对照组间隙变宽、融合率降低、轮廓模糊、排列无序, 出现减少和死亡的情况; 与模型组相比, 随着灵芝多糖剂量的增大, 细胞形态逐渐趋于正常; 尤其在 GLP 质量浓度为 4~8 μg·mL⁻¹ 时, 细胞损伤较轻。结果表明, GLP 对 H₂O₂ 致 HepG2 细胞氧化损伤具有保护作用。

2.3.4 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化损伤中SOD、GSH-Px、MDA的影响

SOD、GSH-Px 能够调控机体内自由基代谢平衡, 保护细胞免受氧化损伤, MDA 作为机体脂质过氧化的重要产物, 可间接反映细胞受氧化损伤的程度^[27,28]。由图 7 可知, 模型组 SOD、GSH-Px 活力显著下降, MDA 活力显著升高 ($P < 0.01$); GLP 剂量组较模型组 SOD 活力升高 28.44%~61.61%, GSH-Px 活力升高 58.61%~101.75%, MDA 活力下降 14.28%~32.89% ($P < 0.01$)。裴忠仟等^[29]研究发现, 岩藻多糖能显著提升尿酸诱导的 HepG2 细胞中 GSH-Px 活力, 降低 MDA 活力, 以此缓解细胞氧化损伤。李微等^[30]研究发现, 酸枣仁能显著提高油酸诱导的 HepG2 细胞中 SOD、GSH-Px 活力, 降低 MDA 活力, 以此发挥对细胞的保护作用。本研究中 GLP 通过增强 HepG2 细胞中 SOD、GSH-Px 活力, 降低 MDA 活力, 抑制脂质过氧化来减轻细胞氧化损伤。

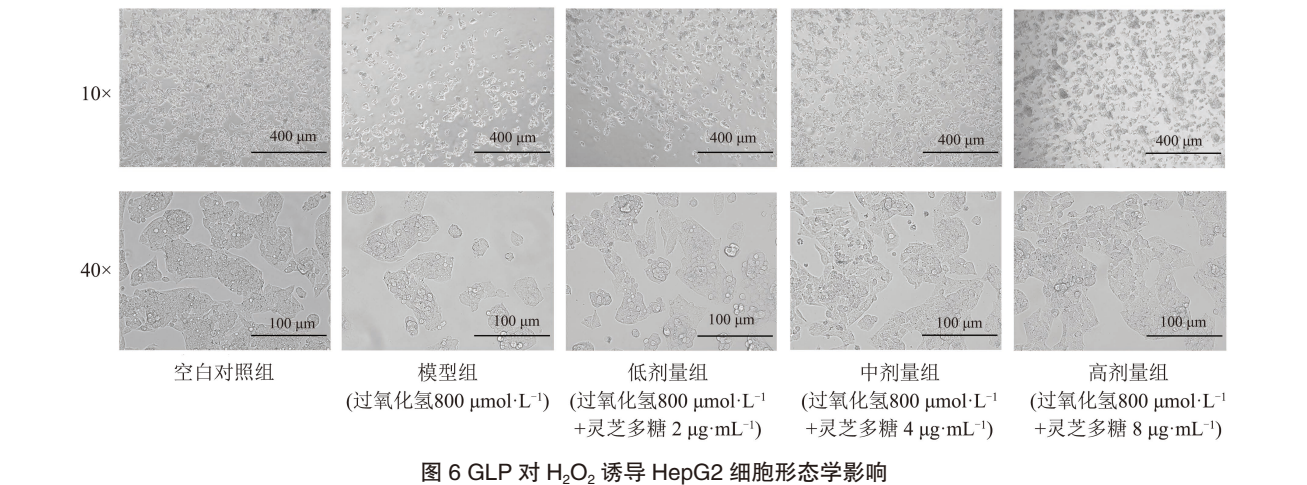


Fig.6 Effect of GLP on the morphology of HepG2 cells induced by H₂O₂

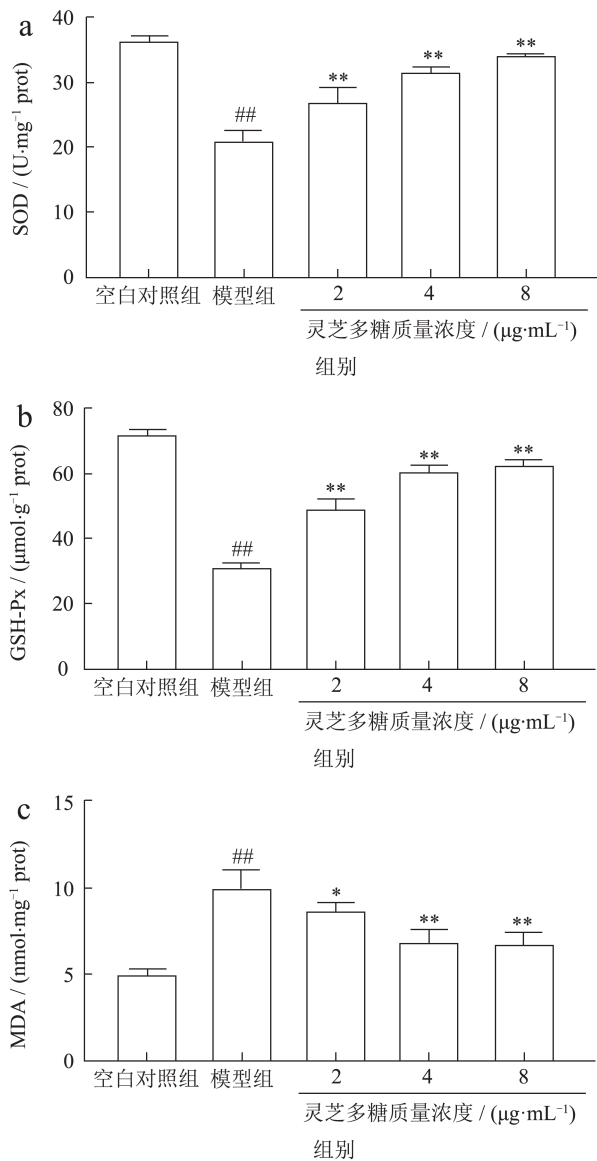


图 7 GLP 对细胞中 SOD、GSH-Px 及 MDA 活力的影响
Fig.7 Effects of GLP on the activities of SOD , GSH-Px and MDA in cells

2.3.5 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化损伤中产生ROS的影响

机体在氧化应激情况下会产生大量的 ROS，过量的 ROS 会攻击抗氧化防御系统，造成机体氧化损伤^[31]。如图 8 所示，经过 800 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 处理后的过氧化氢组细胞内绿色荧光物质累积较多，这说明细胞内累积了较多的 ROS。在经过 GLP 干预后，细胞内 ROS 累积量明显降低，且与 GLP 质量浓度呈现正相关，这表明 GLP 能有效改善氧化损伤细胞内 ROS 的累积。

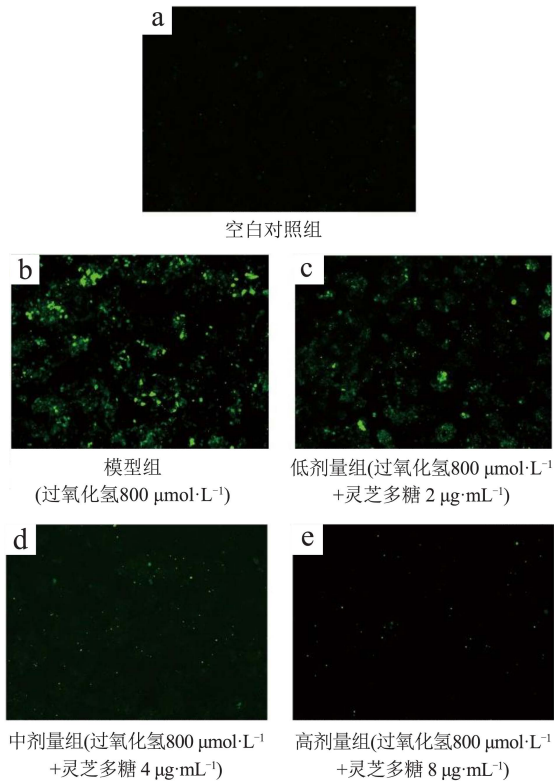


图 8 GLP 对氧化损伤 HepG2 细胞 ROS 积累的影响
Fig. 8 Effects of GLP on ROS accumulation in oxidatively damaged HepG2 cells

2.3.6 灵芝多糖对H₂O₂致HepG2细胞氧化应激相关基因表达量的影响

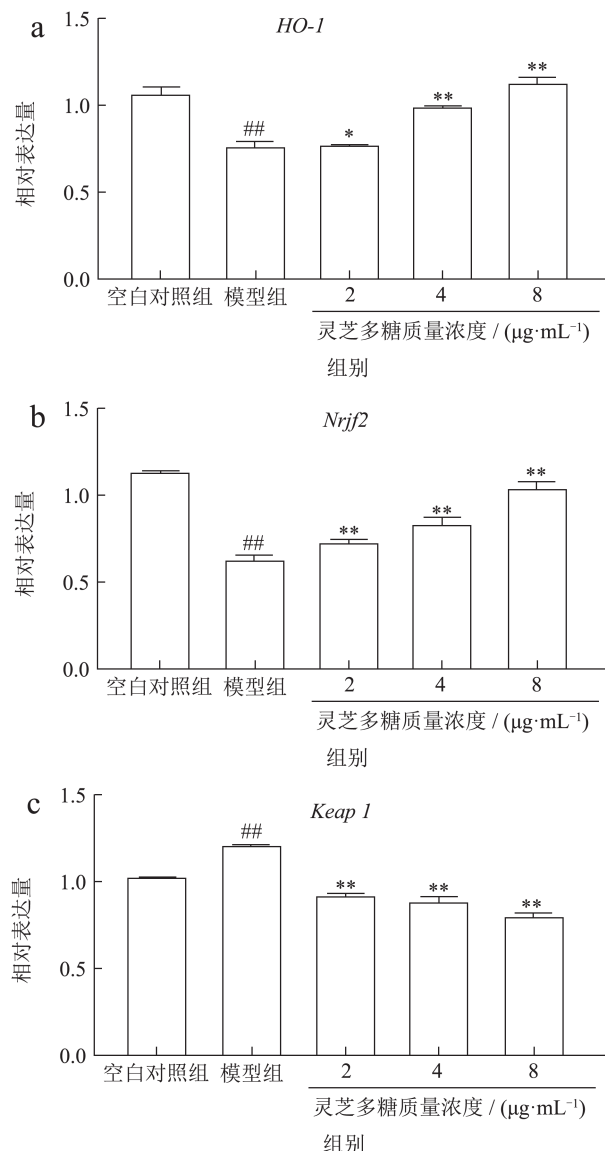


图9 GLP对细胞氧化应激基因表达水平的影响

Fig.9 Effect of GLP on the expression of oxidative stress genes in cells

Keap1/Nrf2 信号转导途径在调控 *Nrf2* 及细胞内抗氧化应激防御系统中起着重要作用^[32]。为了进一步确定 GLP 抗氧化作用机制, 试验进一步考察了 GLP 对 *Keap1/Nrf2* 信号通路相关基因表达量的影响。如图 9 可见, 与空白对照组相比, 2~8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度的 GLP 作用后, *HO-1*、*Nrf2* 基因 mRNA 的表达量显著下调 ($P<0.01$), *Keap1* 基因 mRNA 的表达量显著上调 ($P<0.01$), GLP 质量浓度为 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 作用效果最为显著 ($P<0.01$)。与模型组相比, GLP 上调了细胞内 *Nrf2* 和 *HO-1* 的表达, 下调细胞内 *Keap1* mRNA 表达, 以此激活 *Keap1/Nrf2* 信号通路并发挥抗

氧化应激作用。Yu 等^[33]研究发现可以通过激活 *Keap1/Nrf2* 通路维持氧化还原平衡, 缓解细胞氧化应激。本研究阐明了 *Keap1/Nrf2* 信号通路在 H₂O₂ 致 HepG2 细胞氧化应激过程中发挥着重要作用。

3 结论

本研究以超声辅助灵芝多糖提取工艺优化为起点, 测定其最优条件下体外抗氧化能力, 最终深入到其对细胞内抗氧化应激的机制研究, 从而全面评估了灵芝多糖的抗氧化应激能力。结果表明: 最优提取工艺有效提高了灵芝多糖得率; 在此条件下提取得到的 GLP 对 $\cdot\text{OH}$ 等自由基均有较强的清除能力; 胞内抗氧化实验发现 GLP 提高了 H₂O₂ 致 HepG2 细胞氧化损伤后细胞内抗氧化物酶系中 SOD、GSH-Px 活力, 降低了 MDA 活力和 ROS 累积量, 通过调控 *Keap1/Nrf2* 氧化应激信号通路来增强细胞氧化应激的缓解能力。综上, 本研究证实所建立的提取工艺下得到的多糖具有得率高、生物活性好的优势, 为灵芝子实体深加工提取物的功效性研究提供了新思路, 为灵芝抗氧化功能产品的开发提供了数据参考及理论依据。

参考文献

- [1] LIU C, SONG X, LI Y, et al. A comprehensive review on the chemical composition, pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2023, 51(8): 1983-2040.
- [2] LAU M F, PHAN C W, SABARATNAM V, et al. Bibliometric, taxonomic, and medicinal perspectives of *Ganoderma neo-japonicum imazeki*: A mini review [J]. Mycology, 2024, 15(3): 360-373.
- [3] LIU C, CHEN F, FAN X, et al. Combined NMR and MS-based metabolomics and real-time PCR analyses reveal dynamic metabolic changes of *Ganoderma lucidum* during fruiting body growing [J]. Food Research International (Ottawa, Ont.), 2024, 180: 114056.
- [4] LUO H J, ZHANG Y K, WANG S Z, et al. Structural characterization and anti-oxidative activity for a glycopeptide from *Ganoderma lucidum* fruiting body [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 261(Pt 2): 129793.
- [5] ZHANG K, LIU Y, ZHAO X, et al. Anti-inflammatory properties of GLPss58, a sulfated polysaccharide from *Ganoderma lucidum* [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 107(Pt A): 486-493.
- [6] CHEN G T, YUAN B, WANG H X, et al. Characterization and antioxidant activity of polysaccharides obtained from ginger pomace using two different extraction processes [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 139: 801-809.
- [7] HU Y M, LU S Z, LI Y S, et al. Protective effect of antioxidant peptides from grass carp scale gelatin on the H₂O₂-mediated

- oxidative injured HepG2 cells [J]. Food Chemistry, 2022, 373(Pt B): 131539.
- [8] LATKOWSKA M, Cai C L, Mitrou M, et al. Gut microbiome and inflammation in response to increasing intermittent hypoxia in the neonatal rat [J]. Pediatric Research, 2024, 10: 10-38.
- [9] ALCARRANZA M, ALARCON C, RECIO J R, et al. Immunomodulatory effects and regulatory mechanisms of (R)-6-HITC, an isothiocyanate from Wasabi (*Eutrema japonicum*), in an *ex vivo* mouse model of LPS-induced inflammation [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(39): 21520-21532.
- [10] 赵丽云,刘爱莲,刘美玉,等. 硫辛酸和白藜芦醇在对乙酰氨基酚致HepG2细胞损伤中的抗氧化作用[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 153-158.
- [11] 李学龙,刘国丽,高英旭,等. 不同生长时期灵芝子实体主要代谢产物含量及抗氧化活性比较分析[J]. 中药材, 2024, 6: 1356-1360.
- [12] ZHONG Y, TAN P, LIN H, et al. A review of *Ganoderma lucidum* polysaccharide: preparations, structures, physicochemical properties and application [J]. Foods, 2024, 13(17): 2665.
- [13] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典-一部[M]. 中国医药科技出版社, 2020.
- [14] CUIN T A, SHABALA S. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in Arabidopsis roots [J]. Plant, Cell & Environment, 2007, 30(7): 875-885.
- [15] CHEN L, HUANG G. Extraction, characterization and antioxidant activities of pumpkin polysaccharide [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 118(Pt A): 770-774.
- [16] 刘养山,逢梦玉,张景,等. 水-酶联合法制备灵芝多糖及其抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(9): 292-302.
- [17] 张柳莲,黄清铧,王丽宁,等. 响应面优化超声波微波协同提取灵芝子实体多糖工艺[J]. 食品工业, 2023, 44(2): 45-48.
- [18] WANG C, LI J, CAO Y, et al. Extraction and characterization of pectic polysaccharides from choerospondias axillaris peels: comparison of hot water and ultrasound-assisted extraction methods [J]. Food Chemistry, 2023, 401: 134156.
- [19] 刘养山,张景,任洪飞,等. 冠县灵芝多糖的分离纯化、结构表征及抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技, 2023, 44(12): 81-89.
- [20] 张书山,唐颖,袁晓艳,等. 均匀设计法优化灵芝多糖提取工艺[J]. 广州化工, 2019, 47(21): 84-87.
- [21] 陈丽花,陈少华,荣玉芝,等. 具有抗氧化活性青稞酒糟蛋白酶解液对H₂O₂诱导HepG2细胞的保护作用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 28-38.
- [22] 葛亮,曹慧玲,张洁,等. 川芎嗪对大鼠脑缺血再灌注损伤后氧化应激、Ca²⁺-ATP酶活性及炎症因子的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(5): 517-520.
- [23] RATNANINGTYAS N I, HUSEN F, FITRIANTO N. Lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (agaricomycetes) nanogel in a complete freund's adjuvant-induced rheumatoid arthritis rat model: anti-arthritic, anti-inflammatory, and antioxidative activity [J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2024, 26(8): 27-40.
- [24] 周天天,姜威,徐银,等. 不同前处理对黑木耳多糖抗氧化活性的影响[J]. 中国食物与营养, 2024, 11(2): 1-4.
- [25] 颜瑞辰,洪允炬,李悦,等. 响应面法优化灵芝多糖提取工艺及其抗氧化活性[J]. 菌物研究, 2024, 22(4): 378-386.
- [26] 陈卉,谢安劼,游毅,等. 基于Nrf2通路探讨红花黄色素A对H₂O₂诱导PC12细胞株氧化应激损伤的保护作用[J]. 上海中医药大学学报, 2023, 37(6): 34-40.
- [27] JIN X, FU W, ZHOU J, et al. Oxymatrine attenuates oxidized low density lipoprotein induced HUVEC injury by inhibiting NLRP3 inflammasome mediated pyroptosis via the activation of the SIRT1/Nrf2 signaling pathway [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2021, 48(4): 187.
- [28] JIANG S, XU CM, YAO S, et al. Cdc42 upregulation under high glucose induces podocyte apoptosis and impairs β -cell insulin secretion [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13: 905703.
- [29] 裴忠仟,薛美兰,杨佳,等. 岩藻多糖对高尿酸诱导HepG2细胞凋亡影响及机制[J]. 青岛大学学报(医学版), 2023, 59(6): 867-873.
- [30] 李微,李敬达,张恒文,等. 酸枣仁有效成分斯皮诺素对油酸诱导的HepG2细胞的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(11): 2589-2591.
- [31] ZHAO H, ZHANG R, YAN X, et al. Superoxide dismutase nanozymes: an emerging star for anti-oxidation [J]. Journal of Materials Chemistry, 2021, 9(35): 6939-6957.
- [32] PENG S, LIAO L, DENG H, et al. Alleviating effect of lipid phytochemicals in seed oil (*Brassica napus* L.) on oxidative stress injury induced by H₂O₂ in HepG2 cells via Keap1/Nrf2/ARE signaling pathway [J]. Nutrients, 2024, 16(17): 2820.
- [33] YU C, XU Y, ZHAO M, et al. New insights into mechanism of ellagic acid alleviating arsenic-induced oxidative stress through MAPK/keap1-Nrf2 signaling pathway response, molecular docking and metabolomics analysis in HepG2 cells [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2024, 285: 117029.