

利用秀丽隐杆线虫建立灵芝生物学功效的评价方法

VU THI CUONG¹ 陈伟东¹ 杨平^{2*} 费俭^{1,2*}

(¹同济大学生命科学与技术学院, 上海 200092; ²上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 中药的质量评价是中药应用的关键。目前, 大部分中药的活性物质尚不清楚且其成分较为复杂, 使得以化学检测为手段的中药质量标准的建立存在很大的盲目性。建立生物学功效的检测方法, 可以为中药的质量评价提供一条新的路径。该文利用秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)评价了五种不同产地灵芝水提取物对提高野生型线虫和FOXO(forkhead box O)转录因子突变体抗氧化应激能力的效果。结果表明, 不同产地灵芝均能够提高线虫抗氧化应激的能力, 但功效差异显著。同时, 不同产地灵芝提高线虫氧化应激能力的机制也存在差异, 这提示了灵芝中存在不同的起效活性物质。该文的研究结果证明了利用模式生物秀丽隐杆线虫可以有效地区分不同产地灵芝的生物活性, 并可以将其作为探索评价灵芝生物活性的一个研究方向。

关键词 灵芝; 中药; 质量评价; 氧化应激; 秀丽隐杆线虫

Establishment of Quality Evaluation Indicator System for *Ganoderma lucidum* by Enhancing the Antioxidant Capacity of *Caenorhabditis elegans*

VU THI CUONG¹, Chen Weidong¹, Yang Ping^{2*}, Fei Jian^{1,2*}

(¹School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China;

²Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract Quality evaluation of TCM (traditional Chinese medicine) is the key to its application. Currently, the chemical method such as Mass Spectrometry is the main method to quantify the traditional Chinese medicine. But the TCM has a complicated composition, and the functional components of most TCM remains unclear, which makes it sightless to establish the quality standard of traditional Chinese medicine by chemical methods. So, using living organism may provide a new approach to evaluate TCM's quality. In this work, we treat both wild type and FOXO (forkhead box O) transcription factor mutant *Caenorhabditis elegans* with water extracts of five *Ganoderma lucidum* from different area. The

收稿日期: 2016-03-02 接受日期: 2016-04-05

上海市科委项目(批准号: 13DZ2280600)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-65982429, E-mail: 405p_yang@tongji.edu.cn; jfei@tongji.edu.cn

Received: March 2, 2016 Accepted: April 5, 2016

This work was supported by the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Grant No.13DZ2280600)

*Corresponding authors. Tel: +86-021-65982429, E-mail: 405p_yang@tongji.edu.cn; jfei@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2016-06-03 11:07:51 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160603.1107.004.html>

results show that all of the extracts can enhance the antioxidant capacity, but the work concentration of these five extracts differs greatly from each other. Moreover, after treating with the extracts from different area or the same extract of different concentration, the mechanism is different, indicating that the water extracts of *Ganoderma lucidum* have various bioactive components. Our work proved that we could use *Caenorhabditis elegans* to efficiently detect the biological activity of *Ganoderma lucidum*, and it also provided a new method to evaluate the bioactivity of *Ganoderma lucidum* from different areas.

Keywords *Ganoderma lucidum*; traditional Chinese medicine; quality evaluation; oxidative stress; *Caenorhabditis elegans*

利用化学检测方法对中药的成分进行分析和定量,是目前中药质量评价的主要研究方向。但是,中药的成分较为复杂,大多数中药的活性物质至今尚不清楚,这样就给化学定量为基础的中药质量评价带来了困难。同时,中医开具的中药多是复方,其在生物体内的药理作用被认为是多组分协同作用的效果,用单一或少数几个成分的比较来定量中药的质量可能过于片面。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)是一味常用的中药材。关于灵芝的作用《本草纲目》有记载,“灵芝性平,味苦,无毒,主胸中结,益心气,补中,增智慧,不忘,久服轻身不老,延年神仙”。近年的研究也表明,灵芝及其提取物对肝炎、高胆固醇血症、关节炎、支气管炎、糖尿病、肿瘤等疾病均能起到治疗作用^[1-4]。对肝炎模型小鼠生化指标进行检测表明,灵芝提取物能够提高小鼠谷胱甘肽的表达水平,进而起到保护肝脏的作用^[1]。灵芝还具有羟基和超氧自由基的清除活性,能够抑制脂质的过氧化^[2-4]。

目前对灵芝质量的评价主要基于灵芝本身含有的活性成分的比较,即依赖于化学方法如苯酚-硫酸法、色谱技术和指纹图谱技术如高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)等对灵芝提取物的各种成分进行分离和定量^[5-7]。已有研究表明,灵芝中含有的活性成分包括多糖、三萜、蛋白质、多酚等,其中主要是多糖和三萜^[8-9]。不同灵芝及不同的提取方法得到的多糖种类也不尽相同,目前已分离的灵芝多糖有200多种^[10],从赤芝中分离得到的三萜类化合物多于

135种^[11],其他种类的成分还没有计算在内。如此多的成分,对化学方法定量灵芝品质也可谓一种考验。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是低等的无脊椎动物,体型很小,成虫只有1 mm左右。其后代多,一条野生型雌雄同体成虫一生能够产卵300多个,并且方便在实验室培养。早在70年代,线虫就已经作为模式生物被用于细胞凋亡、个体发育等方面的研究。近些年的研究表明,人类细胞中与氧化应激相关的信号通路如线粒体呼吸链、胰岛素信号通路、磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)信号通路、叉头转录因子(forkhead box O, FOXO)、靶向雷帕霉素信号等在线虫中都非常保守^[12-14]。如促衰变因子-16(decay acceleration factor-16, *daf-16*)就是人类叉头转录因子在线虫中的同源基因,该基因在线虫抗氧化、抗衰老能力上有非常重要的作用。当机体受到外界压力如高温、食物匮乏、氧化等恶劣环境时,DAF-16去磷酸化,进入细胞核中,结合到靶基因上,增强线虫的抗逆性。根据生物信息学分析,DAF-16下游有100多个靶基因,包括超氧化物歧化酶、谷胱甘肽-S-转移酶、小热休克蛋白基因等,DAF-16入核后促进这些抗逆基因表达上调,从而提高线虫的抗氧化能力,并延缓衰老^[15-17]。

本文研究了不同产地灵芝的水提取物对提高线虫抗氧化能力的作用及差异,从而探讨建立一个以生物学效用为基础的灵芝质量评价体系,丰富中药质量评价的方法,并对现有的化学评价给

予补充。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

百草枯(36541)、重铬酸钾(P2588)、5-氟脱氧尿苷(5-fluoro-2'-deoxy- β -uridine, FUDR, F0503)均购自Sigma公司。五种灵芝分别命名为I至V。I是桔泉牌瓶装灵芝,产地为湖南,振兴中药饮片实业有限公司出品;II是恒修堂瓶装,产地为山西,亳州市永刚饮片厂有限公司出品;III是同仁堂瓶装,产地为福建浦城;IV是同仁堂散装,产地为海南;V的产地为越南。生化培养箱(MIR254)购自日本SANYO公司,体视显微镜(SZ61)购自日本OLYMPUS公司,PCR仪(Eppendorf Mastercycler pro)购自德国Eppendorf公司。

1.2 模式动物

野生型秀丽隐杆线虫Bristol(N2)、DAF-16突变系线虫CF1038、大肠杆菌株系线虫OP50均由美国明尼苏达大学线虫遗传中心提供。

1.3 实验方法

1.3.1 灵芝水提物制备方法 五种灵芝各称取30 g,用小型食品粉碎机将灵芝粉碎成小块,并用纱布包裹,加入420 mL的ddH₂O(14倍)煮沸2 h,收集液体,再加入360 mL的ddH₂O(12倍)煮沸2 h,将2次得到的液体合并,用旋转蒸发仪将液体浓缩至100 mL。最后得到的药液浓度按生药计算为300 mg/mL。实验中所有浓度标注均以该浓度为依据。

1.3.2 线虫同步化及培养 用M9缓冲液将成虫洗至无菌EP管中,1 000 r/min离心1 min后,去上清。加适量裂解液(0.5%次氯酸钠,0.5 mol/L氢氧化钠)裂解线虫,得到卵后用M9缓冲液冲洗3次,离心弃上清后,加入适量S-complete培养过夜,次日加入线虫食物大肠杆菌OP50。线虫发育到L4末期后,加入5-氟去氧尿苷FUDR(5-Fluoro-2'-deoxyuridine)120 μ mol/L。发育到成虫后,加入不同浓度灵芝水提物,培养5 d后,用于接下来的毒理分析,百草枯及重金属Cr⁶⁺应激实验。

1.3.3 百草枯应激实验 将在灵芝提取液中处理5 d的线虫用M9缓冲液冲洗到EP管中,用

M9缓冲液洗3遍,除去灵芝提取液成分、大肠杆菌OP50后,将线虫分配在48孔板的孔中,空白对照组(Ctrl)及每种浓度药物处理组线虫均设置3个孔,每个孔不少于30条线虫,百草枯终浓度为50 mmol/L。每隔5 h统计一次存活率。死亡的标准,是以震动、强光照射后,线虫身体不动为准^[18]。空白对照组(Ctrl)为不加灵芝提取液组,即为0 mg/mL。

1.3.4 重金属Cr⁶⁺应激实验 培养线虫及分配线虫方法同百草枯应激实验,K₂Cr₂O₇终浓度10 mmol/L。每隔5 h统计一次存活率,空白对照组(Ctrl)为不加灵芝提取液组,即为0 mg/mL。死亡的标准同上^[19]。

1.3.5 灵芝基因型鉴定 五种灵芝各取500 mg加入液氮充分碾磨,用植物基因组DNA提取试剂盒(DP305, TIANGEN BIOTECH CO., LTD)提取五种灵芝的基因组DNA。PCR扩增内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)区域所用为真菌通用引物。上游引物为ITS1F(5'-CTT GGT CAT TTT AGA GGA AGT AA-3'),下游引物为ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')^[20],引物是由苏州金唯智生物科技有限公司合成的。

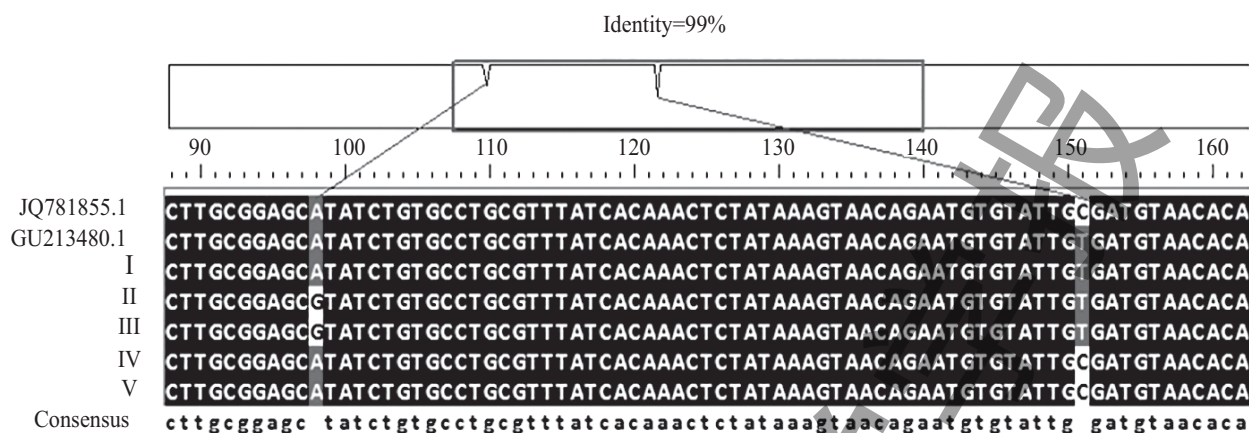
1.4 数据处理及统计学分析

实验至少重复2次,实验数据均采用的是mean $\pm$ S.D.表示。实验采用GraphPad Prism5.0软件进行数据统计分析和作图,生存曲线之间的差异分析采用Log-rank(Mantel-Cox) Test,半数致死时间差异比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异显著。 $P < 0.001$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 灵芝样品的基因型鉴定

真菌rDNA序列内转录间隔区被广泛用于真菌的种内和种间的系统学研究,利用灵芝的ITS序列可对其进行种属分类^[20]。我们利用针对ITS序列的特异性引物对五种灵芝DNA样品进行PCR扩增及测序鉴定。并将测序结果提交到NCBI(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)上进行序列比对后,发现与基因库中灵芝DNA序列的符合率



JQ781855.1和GU213480.1代表NCBI已报道灵芝品系。

JQ781855.1 and GU213480.1 represent published *G. lucidum* on NCBI.

图1 五种灵芝I、II、III、IV、V与已知灵芝ITS序列比对结果

Fig.1 The blast result of five *G. lucidum* I, II, III, IV, V and known *G. lucidum* ITS sequence

达到99%(Sequence ID: gb|JQ781855.1和Sequence ID: gb|GU213480.1), 五种灵芝样品相互之间的同源性高达到99%(图1), 其中, IV和V序列一致, II和III序列一致。

2.2 灵芝对线虫的毒理检测

将五种灵芝水提取物分别稀释成3.75、7.5、15、30、60、120 mg/mL, 处理线虫5 d后, 存活率统计如下图2所示。浓度为120 mg/mL时, 无论哪种灵芝处理, 线虫均死亡; 浓度为60 mg/mL时, 只有I号灵芝处理的线虫存活率达30%左右, 其他灵芝水提取物培养的线虫的存活率均低于10%; 浓度为30 mg/mL时, I和IV表现最好, 线虫存活率达到100%, II、III、V号灵芝处理的线虫存活率都在80%以下; 浓度小于15 mg/mL(包括15 mg/mL)时, 不同种灵芝对线虫存活率的影响没有差异, 都为100%。按照灵芝浓度从高到低的线虫存活率的表现, 毒性从低到高的顺序为: I<IV<II<V<III。我们后续实验的使用浓度采用15 mg/mL及以下。

2.3 灵芝抗氧化能力比较

利用百草枯应激模型, 对不同浓度灵芝提取物处理后的野生型线虫的抗氧化能力进行比较。五种灵芝在3.75、7.5、15 mg/mL浓度下均能增强

线虫对百草枯的耐受(图3)。表1是百草枯处理后不同浓度的灵芝对线虫生存时间的影响, 为评价不同来源灵芝的生物学总体效应, 我们定义“药物累积总效应”(effect of total drug concentration, E_T)为药物浓度-效应图中的线下面积。 E_T 的计算公式如下所示:

$$E_T = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(e_i + e_{i+1})(c_{i+1} - c_i)}{2}$$

其中, 式中 e 代表平均生存时间长短(h); c 代表浓度值(mg/mL)。

每种灵芝 E_T 计算结果如表2所示。由数据可知, 在促进线虫抗氧化能力方面, 五种灵芝从强到弱顺序依次是: IV>V>II>I>III。

2.4 灵芝抗重金属胁迫能力比较

利用重金属 Cr^{6+} 应激模型, 对不同浓度灵芝处理的野生型线虫的抗重金属胁迫能力进行比较。结果表明, 不同产地的灵芝均可以显著增强线虫对重金属的耐受能力(图4)。表3是10 mmol/L重铬酸钾处理后, 不同浓度的灵芝水提取物对线虫生存时间的影响。按药物累积总效应(E_T)的计算结果(表4)进行比较, 结果显示, 在提高线虫抗重金属能力方面, 五种灵芝从强到弱顺序依次是:

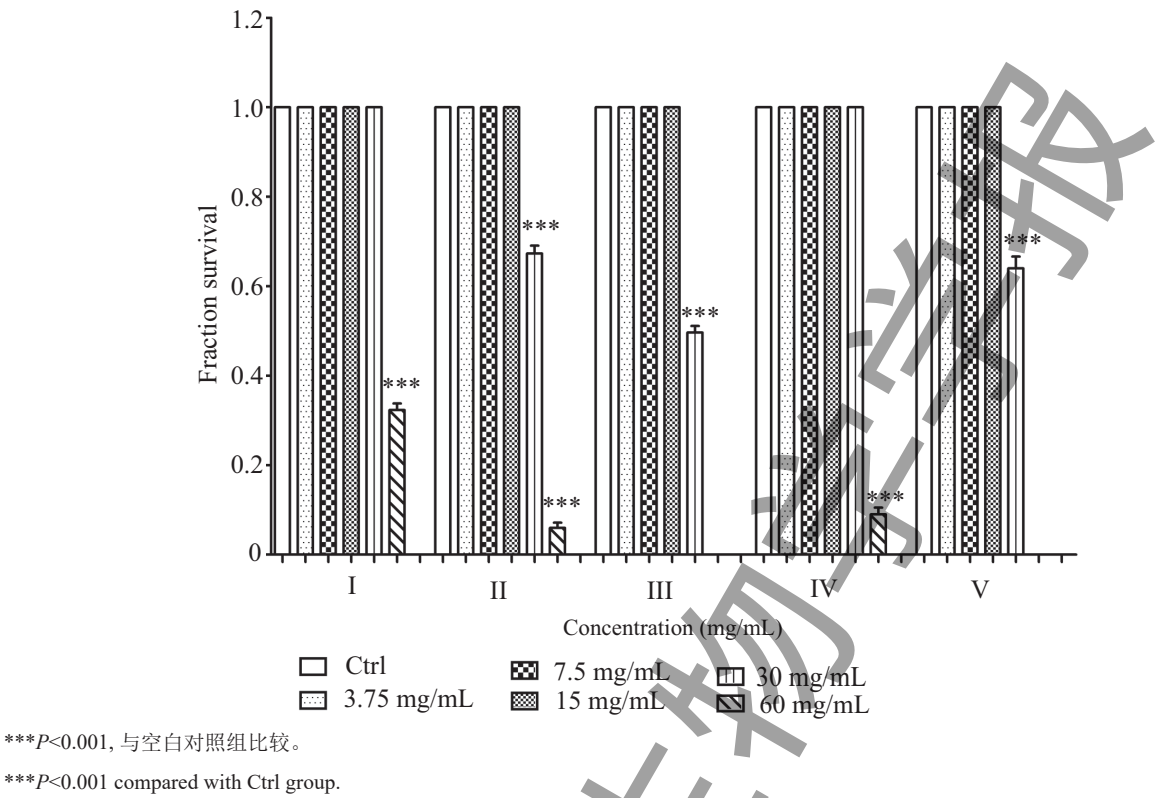


图2 五种灵芝在不同浓度下处理线虫5 d后的存活率统计结果

Fig.2 Worms' survival condition after being treated with different concentration of five *G. lucidum* for 5 days

表1 灵芝增强百草枯处理线虫存活时间

Table 1 *C. elegans* treated with *G. lucidum* show increased resistance to paraquat

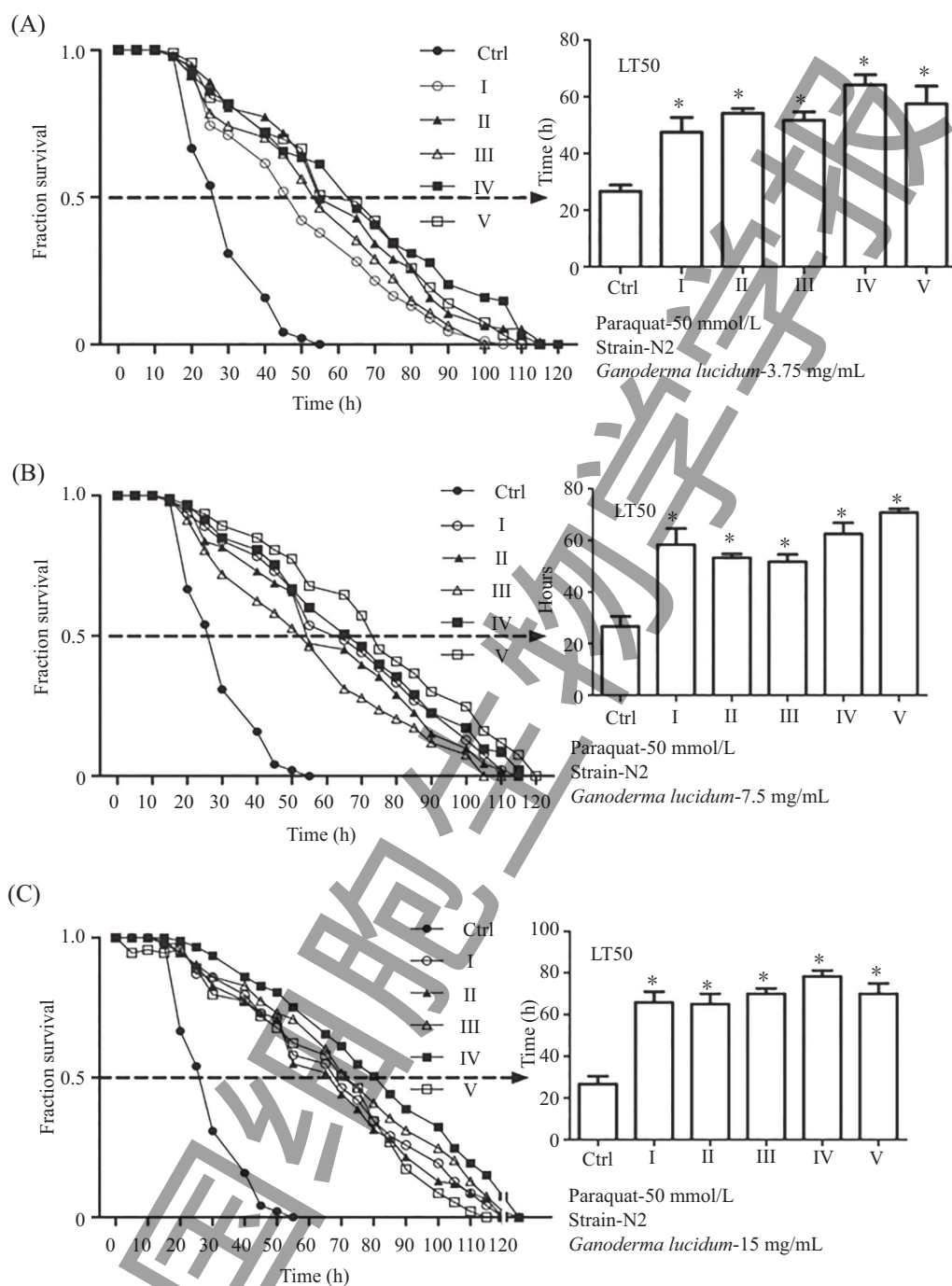
浓度(mg/mL) Concentrations (mg/mL)	存活时间(h) Survival time (h)				
	I	II	III	IV	V
0	28.92 ^a	28.92 ^a	28.92 ^a	28.92 ^a	28.92 ^a
3.75	51.72 ^b	62.20 ^b	54.46 ^b	65.91 ^b	62.90 ^b
7.5	66.72 ^c	63.17 ^b	56.61 ^b	69.19 ^b	75.37 ^c
15	69.51 ^d	67.36 ^b	73.68 ^c	81.77 ^c	72.47 ^c

同列数据上标不含有相同字母表示差异显著(*P<0.05)。
The value in the same column with different superscripts represented a significant difference (*P<0.05).

表2 五种灵芝在百草枯模型中的药物累积总效应

Table 2 Effect of total drug concentration (E_T) of *G. lucidum* in paraquat model

指标 Index	不同灵芝的药物累积总效应(mg·h/mL) Effect of total drug concentration (E _T) (mg·h/mL)				
	I	II	III	IV	V
E _T	884.14	872.91	853.18	997.22	985.82

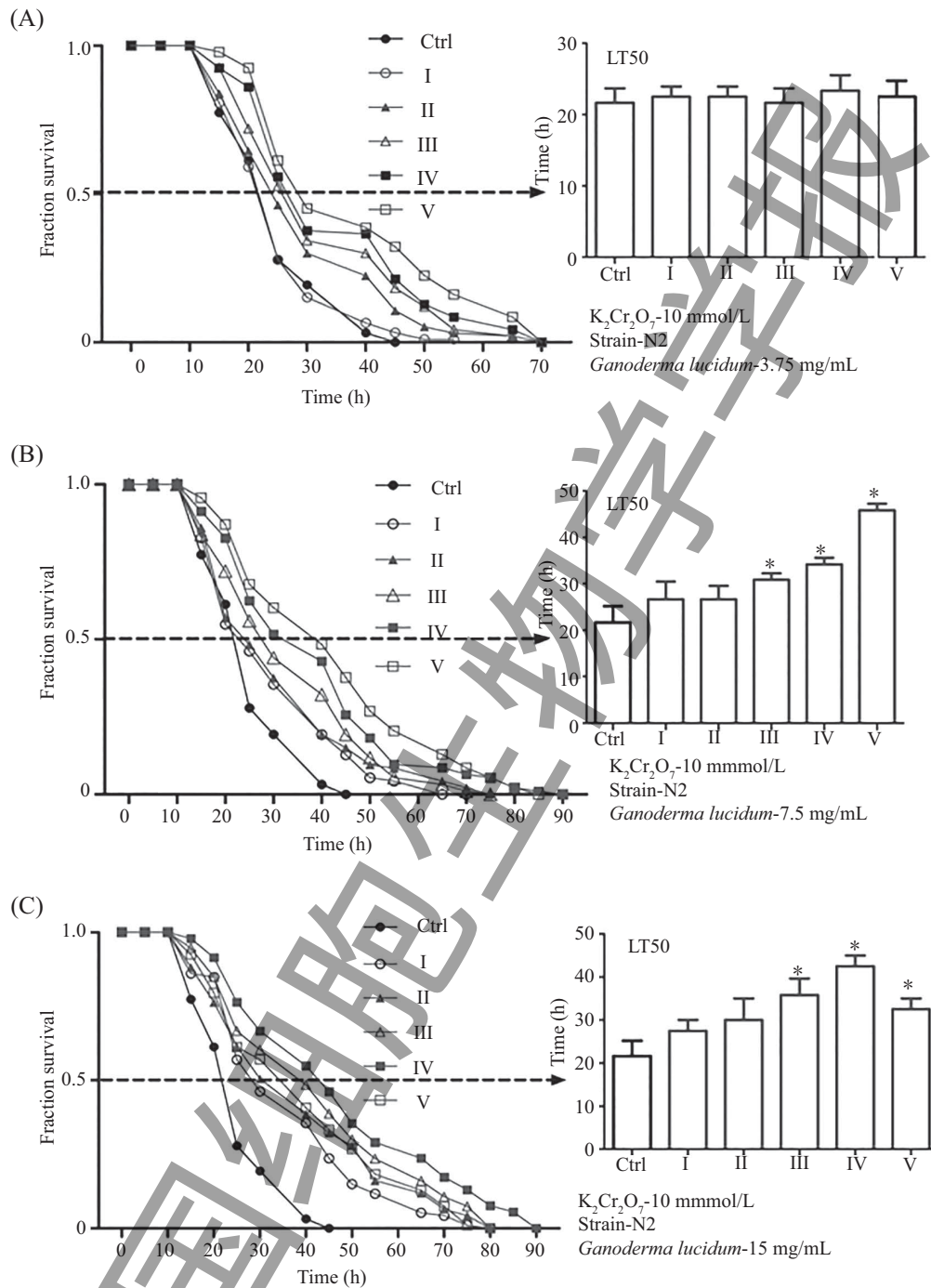


A: 3.75 mg/mL of I, II, III, IV, V strains of *G. lucidum* increased resistance to paraquat. B: 7.5 mg/mL of I, II, III, IV, V strains of *G. lucidum* increased resistance to paraquat. C: 15 mg/mL of I, II, III, IV, V strains of *G. lucidum* increased resistance to paraquat. * $P < 0.05$, compared with Ctrl. The number of worms used > 90 each group.

A: worms (N2) treated with 3.75 mg/mL *G. lucidum* I, II, III, IV, V show increased resistance to paraquat. B: worms (N2) treated with 7.5 mg/mL *G. lucidum* I, II, III, IV, V show increased resistance to paraquat. C: worms (N2) treated with 15 mg/mL *G. lucidum* I, II, III, IV, V show increased resistance to paraquat. * $P < 0.05$ compared with Ctrl. The number of worms used > 90 each group.

图3 灵芝提取物增强野生型线虫(N2)对百草枯的耐受

Fig.3 Worms (N2) treated with *G. lucidum* show increased resistance to paraquat



A: 3.75 mg/mL的II、III、IV、V号灵芝增强了野生型线虫对 Cr^{6+} 胁迫的耐受。五种灵芝培养的野生型线虫的半数生存时间与空白对照组相比没有差异。B: 7.5 mg/mL的I、II、III、IV、V号灵芝增强了野生型线虫对 Cr^{6+} 胁迫的耐受。* $P < 0.05$, 与空白对照组比较。C: 15 mg/mL的I、II、III、IV、V号灵芝增强了野生型线虫对 Cr^{6+} 胁迫的耐受。* $P < 0.05$, 与空白对照组比较。每组线虫数均>90条。

A: worms (N2) treated with 3.75 mg/mL *G. lucidum* I, II, III, IV, V show increased resistance to Cr^{6+} , the median lethal time shows no difference between worms treated with five different *G. lucidum* and Ctrl. B: worms (N2) treated with 7.5 mg/mL *G. lucidum* I, II, III, IV, V show increased resistance to Cr^{6+} . * $P < 0.05$ compared with Ctrl. C: worms (N2) treated with 15 mg/mL *G. lucidum* I, II, III, IV, V show increased resistance to Cr^{6+} . * $P < 0.05$ compared with Ctrl. The number of worms used > 90 each group.

图4 较高浓度的灵芝提取物增强野生型线虫(N2)对 Cr^{6+} 胁迫的耐受

Fig.4 Worms (N2) treated with high concentration of *G. lucidum* show increased resistance to Cr^{6+}

表3 灵芝增强Cr⁶⁺处理线虫存活时间Table 3 *C.elegans* treated with *G. lucidum* show increased resistance to Cr⁶⁺

浓度 (mg/mL) Concentrations (mg/mL)	存活时间(h) Survival time (h)				
	I	II	III	IV	V
0	23.87 ^a	23.87 ^a	23.87 ^a	23.87 ^a	23.87 ^a
3.75	25.53 ^b	30.10 ^b	32.84 ^b	35.10 ^b	38.80 ^b
7.5	29.35 ^c	31.18 ^b	33.29 ^b	33.76 ^b	37.30 ^b
15	32.09 ^d	36.88 ^c	38.97 ^c	42.63 ^c	36.90 ^b

同列数据上标不含有相同字母表示差异显著(**P*<0.05)。

The value in the same column with different superscripts represented a significant difference (**P*<0.05).

表4 五种灵芝在Cr⁶⁺枯模型中的药物累积总效应Table 4 Effect of total drug concentration (E_T) of *G. lucidum* in Cr⁶⁺ model

指标 Index	不同灵芝的药物累积总效应(mg·h/mL) Effect of total drug concentration (E _T) (mg·h/mL)				
	I	II	III	IV	V
E _T	425.93	471.32	501.30	526.14	538.44

V>IV>III>II>I。

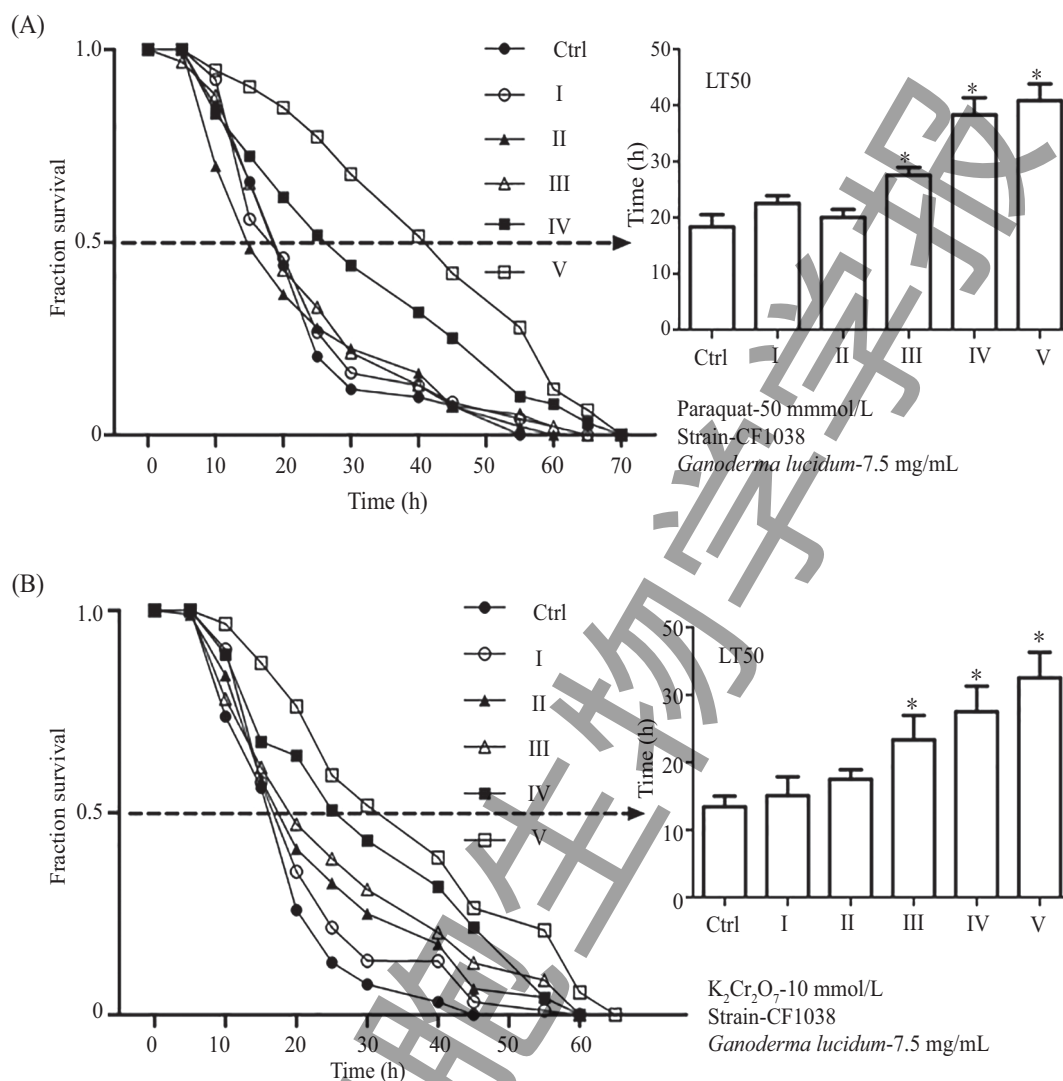
依赖于DAF-16(图5B)。

2.5 灵芝抗氧化机制研究

DAF-16是影响线虫抵抗环境压力的重要基因,胰岛素信号通路、PI3K信号通路所引起的抗氧化能力的改变都依赖于它的功能^[21]。我们对五种灵芝在不同应激模型中的生物学功能是否依赖于FOXO/DAF-16进行了分析。线虫株系CF1038是*daf-16*的突变体,用浓度为7.5 mg/mL的五种灵芝提取物处理该种株系的线虫,通过百草枯模型和重金属Cr⁶⁺模型进行抗压能力检测。结果发现,在百草枯模型中,V和IV灵芝处理的CF1038株系线虫,其抗氧化能力好于空白对照组,而I、II、III处理的线虫与空白对照组没有显著差异,该结果表明,V和IV含有的物质作用途径不依赖于(或部分不依赖于)DAF-16/FOXO信号通路,而I、II、III含有的物质作用途径则依赖于该信号通路(图5A)。在重金属Cr⁶⁺模型中,用7.5 mg/mL浓度的不同灵芝处理的CF1038株系线虫,除I号灵芝外,其他灵芝抗重金属能力均好于空白对照组,上述结果表明,其他灵芝对线虫抗重金属的作用均不依赖于或部分不

3 讨论

我们利用秀丽隐杆线虫作为灵芝生物学功效的测试动物,测定了不同产地灵芝增强线虫抗氧化能力和抗重金属能力的作用效果,并研究了相关的分子机制,提出了基于生物学功效的灵芝质量评价方法的概念。研究表明,在五种灵芝样本中,来自海南和越南的灵芝具有最强的提升线虫抗氧化和抗重金属能力的效果,而来自湖南样本的作用效果最弱。对五种灵芝的ITS序列比较也表明,尽管彼此的同源性极高,但仍然可以分为三组,其中,海南和越南的灵芝属于一组,山西和福建的灵芝属于一组,来自湖南的灵芝单独为一组。基因型的聚类 and 功效的相似性非常一致。对灵芝抗氧化作用的分子机制研究表明,灵芝水提取物中至少有两种物质在抗氧化过程中起作用,其中一种是依赖于DAF-16起效,另一种不依赖于DAF-16。从图5中可见,*daf-16*突变株系线虫在氧化压力的作用下,与I、II、III相比,来自海南(IV)和越南(V)的样本处理的线虫表现出更强的耐受性,



A: 7.5 mg/mL的IV和V号灵芝增强了CF1038株系线虫对百草枯的耐受; B: 7.5 mg/mL的II、III、IV、V号灵芝增强了CF1038株系线虫对Cr⁶⁺胁迫的耐受。* $P < 0.05$, 与空白对照组比较。

A: worms (CF1038) treated with 7.5 mg/mL *G. lucidum* IV and V show increased resistance to paraquat; B: worms (CF1038) treated with 7.5 mg/mL *G. lucidum* II, III, IV, V show increased resistance to Cr⁶⁺. * $P < 0.05$ compared with Ctrl.

图5 灵芝增强线虫对百草枯和Cr⁶⁺的耐受依赖于不同的机制

Fig.5 The enhanced resistance to paraquat and Cr⁶⁺ by different concentration of *G. lucidum* shows not dependent on FOXO signaling pathway for the most part

说明IV和V号灵芝中对DAF-16不依赖的起效物质含量更高, 而其余三种灵芝样本的起效物质是依赖DAF-16的。灵芝提高线虫抗重金属损伤的物质主要不依赖于DAF-16, 并且来自海南和越南的两个样本显示出更好的效果。

利用不同浓度灵芝处理后的存活率高低, 我们对五种灵芝的毒性大小也进行了比较, 毒性从小到

大的顺序依次是I<IV<II<V<III。虽然在线虫上的毒性对于人体的意义还不清楚, 但从结果来看, 毒性的物质基础和起功效的活性物质至少是不重叠的。

Chuang等^[22]利用线虫对灵芝多糖延长寿命的机制进行了研究, 结果显示, 多糖组分3通过Toll/白细胞介素-1受体(Toll-interleukin-1 receptor, TIR-1)和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein

kinase, MAPK)激活DAF-16的表达,从而延长线虫寿命,说明多糖组分3延长线虫寿命是依赖DAF-16功能的。由于我们的实验中所用灵芝是水提物,成分比较复杂。另外,衰老和抗氧化的机制也有所不同^[18],目前已知的与抗氧化和衰老相关的信号通路如靶向雷帕霉素信号^[23]、与线粒体呼吸链相关的信号、饮食限制信号等都是独立于FOXO/DAF-16信号通路^[24-25],这些信号通路将是进一步揭示灵芝提高抗氧化抗胁迫机制的研究方向。

中药成分复杂、作用机制多样,观察到的药物生物学功效常常是不同物质的综合效果。同一药材因为种质差异、种植条件不同以及采摘时间有别,都会影响药材的化学组成,最后导致生物学功效出现不同。在我们的实验中,同种模型五种灵芝水提物在不同浓度条件下处理的线虫,其抗氧化排序结果不一致;不同模型相同浓度的灵芝,抗氧化的结果排序也有不一致。并且,是否依赖于FOXO/DAF-16信号通路也根据药物浓度和模型不同而产生差异。这些都暗示着不同浓度时,呈现的效果应该是多种成分综合结果的体现。不同的灵芝浓度下,促发了不同的作用机制,进而得到了不同的实验结果,以上这些结果也体现了对灵芝等中药进行质量评价的复杂性。

参考文献 (References)

- Ha do T, Oh J, Khoi NM, Dao TT, Dung le V, Do TN, *et al.* *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effect of ganodermanontriol against t-BHP-induced oxidative stress. *J Ethnopharmacol* 2013; 150(3): 875-85.
- Hasnat A, Pervin M, Lim BO. Acetylcholinesterase inhibition and *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of *Ganoderma lucidum* grown on germinated brown rice. *Molecules* 2013; 18(6): 6663-78.
- Pan D, Zhang D, Wu J, Chen C, Xu Z, Yang H, *et al.* A novel proteoglycan from *Ganoderma lucidum* fruiting bodies protects kidney function and ameliorates diabetic nephropathy via its antioxidant activity in C57BL/6 db/db mice. *Food Chem Toxicol* 2014; 63: 111-8.
- Chien YL, Ho CT, Chiang BH, Hwang LS. Effect of fermentation time on antioxidative activities of *Ganoderma lucidum* broth using leguminous plants as part of the liquid fermentation medium. *Food Chem* 2011; 126(4): 1586-92.
- Lin MS, Yu ZR, Wang BJ, Wang CHCH, Weng YM, KOO M. Bioactive constituent characterization and antioxidant activity of *Ganoderma lucidum* extract fractionated by supercritical carbon dioxide. *Sains Malaysiana* 2015; 44(12): 1685-91.
- Xie J, Zhao J, Hu DJ, Duan JA, Tang YP, Li SP. Comparison of polysaccharides from two species of *Ganoderma*. *Molecules* 2012; 17: 740-52.
- Su CH, Yang YZ, Ho HO, Hu CH, Shen MT. High-performance liquid chromatographic analysis for the characterization of triterpenoids from *Ganoderma*. *J Chromatogr Sci* 2001; 39(3): 93-100.
- Hsieh TC, Wu JM. Suppression of proliferation and oxidative stress by extracts of *Ganoderma lucidum* in the ovarian cancer cell line OVCAR-3. *Int J Mol Med* 2011; 28(6): 1065-9.
- Kohda H, Tokumoto W, Sakamoto K, Fujii M, Hirai Y, Yamasaki K, *et al.* The biologically active constituents of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Histamine release-inhibitory triterpenes. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1985; 33(4): 1367-74.
- 刘博, 高宁. 灵芝多糖药理学研究进展. 齐齐哈尔医学院学报 (Liu Bo, Gao Ning. Progress of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in pharmacology. *Journal of Qiqihar University of Medicine*) 2013; 34(11): 1672-4.
- Baby S, Johnson AJ, Govindan B. Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry* 2015; 114: 66-101.
- Kenyon C. The first long-lived mutants: Discovery of the insulin/IGF-1 pathway for ageing. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2011; 366(1561): 9-16.
- Chen D, Li PW, Goldstein BA, Cai W, Thomas EL, Chen F, *et al.* Germline signaling mediates the synergistically prolonged longevity produced by double mutations in daf-2 and rsk-1 in *C. elegans*. *Cell Rep* 2013; 5(6): 1600-10.
- Dancy BM, Sedensky MM, Morgan PG. Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in *C. elegans*. *Exp Gerontol* 2014; 56: 245-55.
- oh SW, Mukhopadhyay A, Dixit BL, Raha T, Green MR, Tissenbaum HA. Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat Genet* 2006; 38(2): 251-7.
- Baumeister RE, Schaffitzel, Hertweck M. Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *J Endocrinol* 2006; 190(2): 191-202.
- Brunet A. Aging and the control of the insulin-FOXO signaling pathway. *Med Sci (Paris)* 2012; 28(3): 316-20.
- Li J, Ebata A, Dong Y, Rizki G, Iwata T, Lee SS. *Caenorhabditis elegans* HCF-1 functions in longevity maintenance as a DAF-16 regulator. *PLoS Biol* 2008; 6(9): e233.
- Yang P, Sun R, Yao M, Chen W, Wang Z, Fei J. A C-terminal truncated mutation of spr-3 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2013; 45(7): 540-8.
- Gardes M, Bruns TD, Mol Ecol. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 1993; 2: 113-8.

- 21 Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang RA. *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 1993; 366(6454): 461-4.
- 22 Chuang MH, Chiou SH, Huang CH, Yang WB, Wong CH. The lifespan-promoting effect of acetic acid and *Reishi* polysaccharide. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(22): 7831-40.
- 23 Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature* 2010; 464(7288): 504-12.
- 24 Sedensky MM, Morgan PG. Mitochondrial respiration and reactive oxygen species in *C. elegans*. *Exp Gerontol* 2006; 41(10): 957-67.
- 25 Kayser EB, Sedensky MM, Morgan PG. The effects of complex I function and oxidative damage on lifespan and anesthetic sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 2004; 125(6): 455-64.