DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20250306

·论　　著·

灵芝整合起效研究：抗胰岛素抵抗效应分析

彭云丽[1]，张娇娇[1]，刘云云[1]，徐远城[1]，陈治宇[2]，程永现[1]*

［1.深圳大学医学部药学院，中医药守正创新研究院，广东省中药有效成分与肠道微生物组学重点实验室，广东 深圳 518060；
2.中芝源健康食品（大姚）有限公司，云南 楚雄 675400］

【摘要】目的 揭示灵芝抗糖尿病胰岛素抵抗的物质基础，并阐明其多成分/组分整合起效模式。**方法** 采用水提、50%乙醇、95%乙醇及复合工艺提取获得赤芝不同组分，通过蛋白质免疫印迹法检测Akt磷酸化评估活性，并利用组合实验分析其协同效应。**结果** 多糖、三萜及杂萜均可显著缓解胰岛素抵抗；组合实验表明，特定浓度下三萜与杂萜有协同作用，多糖分别与三萜或杂萜组合可显著增强胰岛素敏感性。**结论** 灵芝抗胰岛素抵抗作用是多成分协同起效的结果，复合提取法（先醇提后水提）可全面高效获取活性成分；异物同靶（多成分协同作用于同一信号通路）是其典型药效模式；优化提取工艺有利于以灵芝为代表的中药的高值转化。

【关键词】灵芝；整合模式；胰岛素抵抗；异物同靶；高值转化

中图分类号：R93　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**2096-8965（2025）03-0039-09

Integrated efficacy of *Ganoderma lucidum*: Evaluation of its anti-insulin resistance activity

Peng Yunli[1], Zhang Jiaojiao[1], Liu Yunyun[1], Xu Yuancheng[1], Chen Zhiyu[2], Cheng Yongxian[1]*

(1. Guangdong Key Laboratory of Chinese Medicine Ingredients and Gut Microbiomics, Institute for Inheritance-Based Innovation of Chinese Medicine, School of Pharmacy, Shenzhen University Medical School, Shenzhen 518060, Guangdong, China;
2. Zhongzhiyuan Health Food (Dayao) Co., Ltd., Chuxiong 675400, Yunnan, China)

【Abstract】Objective To identify bioactive components underlying *Ganoderma lucidum*'s anti-insulin resistance effects in diabetes and elucidate the integrated efficacy pattern of multiple components. **Methods** Different extraction techniques (water, 50%, and 95% ethanol, and combined methods) were applied to extract the different fractions of *G. lucidum*. Bioactivity was assessed by Akt phosphorylation (Western blotting), and synergy was evaluated through combination tests. **Results** Polysaccharides, triterpenes, and meroterpenes all significantly alleviated insulin resistance. Synergistic effects occurred between triterpenes and meroterpenes at specific concentrations, and combinations of polysaccharides with either triterpenes or meroterpenes were observed to significantly enhance insulin sensitivity. **Conclusion** *G. lucidum*'s anti-insulin resistance effects are a consequence of synergy of multiple components. A combined extraction approach (ethanol followed by water) is advantageous

收稿日期：2025-01-23；**修回日期：**2025-06-18

基金项目：国家自然科学基金项目（82030115）；NSFC-云南联合基金项目（U1702287）；深圳市基础研究重点项目（JCYJ20200109113803838）

通信作者：程永现（1972-），男，河南鹤壁人，博士研究生导师，主要从事中药科学原理与新药转化研究，E-mail：yxcheng@szu.edu.cn

for yielding diverse active constituents. The "Many Compounds, One Target" model exemplifies the herb's integrative therapeutic mechanism. Optimizing extraction can enhance the high-value utilization of traditional medicines exemplified by *G. lucidum*.

【**Keywords**】*Ganoderma lucidum*; Integrative pattern; Insulin resistance; Many compounds one target; High-value utilization

0 引言

从作用强度而言，中药通常难以媲美化学药物，但中药在临床上却很少出现耐药性和较强的毒副作用，这也许是几千年来中药一直被中国中医临床广泛应用的原因。尽管如此，中药的应用推广甚至国际化，仍需多方证据。中药的特殊性在于多组分协同作用模式，但具体到某一味中药，其成分究竟如何起效则需要一一解析，形成具体证据。

作为中国传统草药中的高等真菌类，灵芝被誉为“中华仙草”，已有数千年的使用历史，其功效包括清肝解毒[1]、降肝火[1]、增强新陈代谢[2]、降压[3]、加强心脏收缩力[4]、祛痰、抗菌[5]、提高免疫[6]等功效。大量研究表明，灵芝的有效成分（多糖类、三萜类）具有治疗多种疾病的潜力，如肿瘤[7]、肾纤维化[8-9]、心脏病[10]和糖尿病[11]等，其中三萜及多糖的研究最为深入，例如，赤芝多糖被发现具有治疗2型糖尿病的作用[12]，从赤芝分离出的蛋白多糖通过抑制蛋白酪氨酸激酶1B阻断糖尿病的发生和发展[13]。此外，从赤芝中提取的三萜显示出显著的抗肿瘤活性，包括抑制肿瘤细胞增殖和迁移[14]。传统上，灵芝子实体服用前的制备方式主要包括水煎煮法、酒浸法和打粉法。这些方法包含的成分各不一样，对于某一疾病而言，哪种方法最为有效和科学，成为大众关切，却很难回答的问题。灵芝还具有一定的名贵性，以其为例，回答何种方法能充分释放灵芝中的有效成分、不同方法释放的活性成分存在何种差异、单一处理方式产生的灵芝残渣是否仍具有利用价值，以及灵芝中的微量成分如杂萜是否具有显著功效或为整体药效所不可或缺等科学问题，就更显得必要，借此也可发现中药发挥疗效的常见模式，从而启发工艺优化以实现中药的高值利用。

糖尿病是一种以长期血糖异常升高为特征的慢性代谢性疾病，主要由胰岛素分泌不足或胰岛素作用受损引起[15]。根据病因和临床特点，糖尿病可分为1型糖尿病、2型糖尿病[16]、妊娠期糖尿病[17]及其他特殊类型。其典型症状包括多饮、多尿、多食及体重下降。若长期未能有效控制，可导致心血管、肾脏、神经及眼部等多系统的严重并发症。胰岛素抵抗指靶组织（如肝脏、肌肉和脂肪组织）对胰岛素的生理作用反应减弱，即使胰岛素分泌量正常或增加，靶组织的敏感性下降会导致血糖调节功能紊乱[18]。在胰岛素信号通路中，胰岛素受体/胰岛素受体底物蛋白，磷脂酰肌醇3激酶和蛋白激酶B（Protein Kinase B，Akt）是3个关键节点蛋白。其中，Akt磷酸化水平的抑制被认为是引起胰岛素抵抗的主要原因之一[18]。因此，促进Akt磷酸化可有效逆转胰岛素抵抗，筛选有效治疗糖尿病的活性分子。本研究涉及的灵芝，系中国云南省大姚县栽培的赤芝，当地俗称白灵芝，由于种质和环境因素多重影响，其成分可能发生了某些改变，比如传统的赤芝味苦，而大姚县栽培的赤芝却没有苦味或苦味不明显，由此形成了其独特的地理标志性，以至于成为当地乡村振兴的重要支点之一。民间经验常常成为研究方向的重要指引，云南当地民间有将灵芝用于糖尿病患者的实践[19]，且效果显著，因此，在灵芝多样的适应证中，选择以灵芝抗糖尿病胰岛素抵抗为切入点，具体以Akt磷酸化为观察指标，既能充分借鉴传统经验回答大众对灵芝用法（怎么提取）的关切，又能进一步促进其科学、高值利用，还能以点带面助力人们对中药作用模式的认识。

前期研究从赤芝中分离获得了8个具有改善胰岛素抵抗（Insulin Resistance，IR）作用的杂萜–三萜杂聚体，为灵芝抗糖尿病使用提供了科学依据[19]。为进一步探究灵芝活性成分的复杂性及传统加工工艺对其活性成分利用效率的影响，本研究采用多种提取工艺系统提取灵芝的不同成分，同时，深入分析同类或异类成分之间的协同作用机制，以期为灵芝在糖尿病临床应用中的科学依据提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

小鼠成肌细胞（C2C12，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国），棕榈酸钠（S838428，上海麦克林生化科技股份有限公司，中国），二甲双胍（317240，Sigma，美国），DMEM高糖培养基购（C3113-0500，Vivacell，中国），胎牛血清（10099-141，Gibco，美国），马血清（abs989，Absin，

中国），青霉素（A8180，索莱宝，中国），链霉素（SB290，索莱宝，中国），磷酸盐缓冲液（PB180327A，武汉普诺赛生命科技有限公司，中国），胰蛋白酶（25200072，Gibco，美国），胰岛素（19278-5ML，Sigma，美国），二甲基亚砜（D2650，Sigma，美国），RIPA裂解液（强型）（P0013B，碧云天生物技术有限公司，中国），苯甲磺酰氟（ST506，碧云天生物技术有限公司，中国），蛋白酶抑制剂（DB612A，MIKX，中国），磷酸酶抑制剂（MB12707，Meilunbio，中国），聚偏二氟乙烯膜（Polyvinylidene Fluoride，PVDF）（IPVH00010，Millopore，美国），p-Akt兔多克隆抗体（#9271，CST，美国），Akt兔多克隆抗体（#9272，CST，美国），GAPDH兔多克隆抗体（2118S，CST，美国），HRP标记山羊抗兔IgG二抗（ab6721，Abcam，英国），增强型ECL化学发光检测试剂盒（MK-S700，MIKX，中国），葡萄糖氧化酶法试剂盒（BC0695，索莱宝，中国），CCK8（MA0218，Meilunbio，中国），乙醇（E111991，Aladdin，中国），乙酸乙酯（E809174，上海麦克林生化科技股份有限公司，中国），超声仪（F-030S，小美超声仪器有限公司，中国），二氧化碳培养箱（311，Thermo Fisher，美国），离心机（5810R，Eppendorf，德国），超纯水机（RD0P050UV，RephiLe，中国），酶标仪（ELX800，Bio-Tek，美国），蛋白凝胶电泳装置（1658033，BIO-RAD，美国），蛋白成像系统（BIO-RAD，chemiDoc MP，美国），1.5 mm，15孔电泳梳（1653366，BIO-RAD，美国）。

1.2 真菌材料

云南大姚县产的赤芝干燥子实体（30.0 kg）于2018年4月在云南省大姚县购买。该真菌材料经中国科学院昆明植物研究所杨祝良研究员鉴定，凭证标本编号为CHYX-615，标本现保存在深圳大学医学部药学院。

1.3 提取与分离

称取云南大姚产赤芝100 g，加入10倍体积的超纯水，煎煮2次，每次煮沸后维持20 min，得到总提取物。一部分提取物浓缩备用，剩余部分调整至70%乙醇浓度沉淀，分离得到沉淀部分和上清部分。取出一部分上清液浓缩备用，剩余上清液用乙酸乙酯萃取，分离得到水层部分和乙酸乙酯部分。将乙酸乙酯部分通过柱层析分离，依据薄层色谱和HPLC-MS检测，得到总三萜和总杂萜。另取大姚赤芝250 g，加入10倍体积的95%乙醇，超声提取2次，每次30 min，得到总提取物。一部分提取物浓缩备用，剩余部分用乙酸乙酯与水按体积比1∶1比例萃取，分离得到乙酸乙酯部分和水部分。乙酸乙酯部分浓缩备用，剩余部分通过柱层析分离，得到总三萜和总杂萜。50%乙醇提取大姚赤芝的方法与95%乙醇提取的方法一致。所得各组结果见表1~5。

表1 大姚产赤芝95%乙醇提取

Table 1 95% ethanol extract of *G. lucidum* and derived fractions

样品编号	对应部位
95-1	总提物
95-2	乙酸乙酯萃取后的剩余水部分
95-3	乙酸乙酯萃取部分
95-4	总三萜
95-5	总杂萜

表2 大姚产赤芝50%乙醇提取

Table 2 50% ethanol extract of *G. lucidum* and derived fractions

样品编号	对应部位
50-1	总提取物
50-2	水萃取部分
50-3	乙酸乙酯萃取物
50-4	总三萜
50-5	总杂萜

表3 大姚产赤芝超纯水提取

Table 3 Water extract of *G. lucidum* and derived fractions

样品编号	对应部位
ST-1	总提取物
ST-2	脂溶性成分
ST-3	总多糖
ST-4	除去多糖，总三萜和总杂萜后剩余物质
ST-5	总三萜
ST-6	总杂萜

表4 大姚产赤芝95%乙醇叠加水提取

Table 4 Combined 95% ethanol and water extraction of *G. lucidum* and derived fractions

样品编号	对应部位
DY95X-1	95%乙醇总提物
DYSTh-1	残渣水煎总提物
DYSTh-2	脂溶性成分
DYSTh-3	总多糖
DYSTh-4	乙酸乙酯萃取部分
DYSTh-5	乙酸乙酯萃取后水部位

表5 大姚产赤芝50%乙醇叠加水提取

Table 5 Combined 50% ethanol and water extraction of *G. lucidum* and derived fractions

样品编号	对应部位
50X-1	50%乙醇总提物
50ST-1	残渣水煎总提物
50ST-2	脂溶性成分
50ST-3	总多糖
50ST-4	乙酸乙酯萃取部分
50ST-5	乙酸乙酯萃取后水部位

1.4 组分中的结构类型UPLC-UV/DAD-MS表征

仪器型号SCIEX X500R Q-TO。检测方法为离子源ESI Positive；色谱柱：Phenomenex Synergi™ 4 μm Fusion-RP 80 Å，2×50 mm；流速0.3 mL/min。检测条件：流动相为梯度洗脱程序如下：乙腈（0.1%乙酸）和水（0.1%乙酸）。0.0~16.0 min，乙腈为10%~100%；16.0~20.0 min，保持100%乙腈，20.0~25.0 min，恢复到10%乙腈。

1.5 胰岛素抵抗活性检测

1.5.1 细胞培养

C2C12细胞培养在高糖DMEM培养基（含10%胎牛血清、1.68×10⁻⁴ mol/L青霉素和1.72×10⁻⁴ mol/L链霉素），37℃、5%二氧化碳环境中维持生长。为诱导分化，将细胞置于含2%马血清、1.68×10⁻⁴ mol/L青霉素和1.72×10⁻⁴ mol/L链霉素的DMEM中孵育4 d。待细胞分化为细长肌管后，将其暴露于3.5×10⁻⁴ mol/L棕榈酸钠18 h[19]，以建立IR模型。

1.5.2 蛋白免疫印迹实验

用不同灵芝提取物处理IR模型细胞18 h后[19]，向培养板孔中加入含有PMSF、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的RIPA强裂解液以提取总蛋白。使用8%的SDS-PAGE分离蛋白样品，然后将其转移到PVDF膜上。用5%的脱脂奶粉在室温下封闭膜1 h，随后，在4℃条件下孵育一抗过夜。之后，在室温下孵育辣根过氧化物酶标记的二抗。使用增强型化学发光显影液进行显影，并使用蛋白成像系统进行曝光和拍照。

1.5.3 细胞活力实验

将C2C12细胞（5×10⁵个细胞/mL）接种到96孔板中，过夜培养，用化合物或DMSO处理细胞24 h。然后向每个孔中加入CCK8溶液，在37°C下孵育1 h。最后，测定每个孔的吸光度（450 nm）。

1.5.4 葡萄糖摄取实验

C2C12细胞在低糖DMEM中孵育2 h后，转移至高糖DMEM中，加入0.1 μmol/L胰岛素和化合物，继续培养18 h。随后，再加入1 μmol/L胰岛素，孵育1 h。最后，使用葡萄糖氧化酶法试剂盒测定培养上清液中的葡萄糖含量。

1.5.5 统计学分析

实验数据结果以平均数±标准差表示。统计分析采用GraphPad Prism 10软件和单因素方差分析或Kruskal-Wallis检验，并采用Benjamini–Hochberg方法进行假发现率（False Discovery Rate，FDR）校正。显著性水平分别定义为：*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001，****P<0.000 1。

2 结果

2.1 固定制备工艺条件下各组分成分特征

中药的特点是成分复杂，但相同结构类型的成分可通过聚类制备。根据既往对灵芝的研究，从专业角度可知灵芝中的中低极性小分子结构类型主要为三萜和杂萜，且二者在分子量和紫外吸收光谱方面有着明显的差异和特征，根据此原理采用UPLC-UV/DAD-MS方法对组分进行表征。95-2部位中的成分保留时间较短，结合提取工艺，可知其主要为大极性成分，而95-3部位中的成分保留时间较长，结合萃取溶剂性质，可知为低极性成分，分子量在262~656 Da，结合DAD吸收，可知其主要为三萜和杂萜。95-4分子量较95-3更多地集中于400~500 Da，结合文献和UV/DAD吸收，表明其成分主要以三萜为主；而95-5也含有一些三萜，但分子量多在300~400 Da，或600 Da以上，结合文献和UV/DAD吸收，可知其主要为杂萜和杂萜二聚体[20]。而50-1和95-1部位相比，提取物的保留时间变短，结合其制备工艺，表明化合物极性较大，且两者也均以三萜为主要成分。

2.2 不同浓度乙醇提取工艺的灵芝提取物活性组分活性不同

为了解不同提取方式对灵芝组分活性的影响，首先采用95%乙醇、50%乙醇和0%乙醇（水提）对灵芝进行提取（见图1A、1C、1E），并根据提取流程对各组分进行分离编号（见图1A、1C、1E；表1~3）。通过检测Akt的磷酸化水平，评估灵芝提取物各组分对胰岛素抵抗的缓解作用。

2.2.1 95%乙醇提取

在棕榈酸和胰岛素刺激模型中，95%乙醇提取的总提物（95-1）、乙酸乙酯萃取部分（95-3）、总三萜（95-4）和总杂萜（95-5）均能有效促进Akt

的磷酸化。活性强弱依次为：总杂萜（95-5）>总三萜（95-4）=乙酸乙酯萃取部分（95-3）>总提取物（95-1）>乙酸乙酯萃取后的剩余水部分（95-2）（见图1B）。这些结果表明，95%乙醇提取工艺可以有效萃取灵芝中具有活性的脂溶性成分、总三萜和总杂萜，而乙酸乙酯萃取后的剩余水部分（95-2）无效。

2.2.2 50%乙醇提取

50%乙醇提取的总提取物（50-1）、水萃取部分（50-2）、乙酸乙酯萃取物（50-3）、总三萜（50-4）和总杂萜（50-5）均能有效促进Akt的磷酸化。活性强弱依次为：总三萜（50-4）>总杂萜（50-5）=总提取物（50-1）>乙酸乙酯萃取物（50-3）>水萃取部分（50-2）（见图1D）。这些结果表明，50%乙醇提取工艺可以有效萃取灵芝中有活性的脂溶性成分、总三萜、总杂萜及水溶性成分，虽然水萃取部分（50-2）的活性不及其他部位，但也含有效成分。

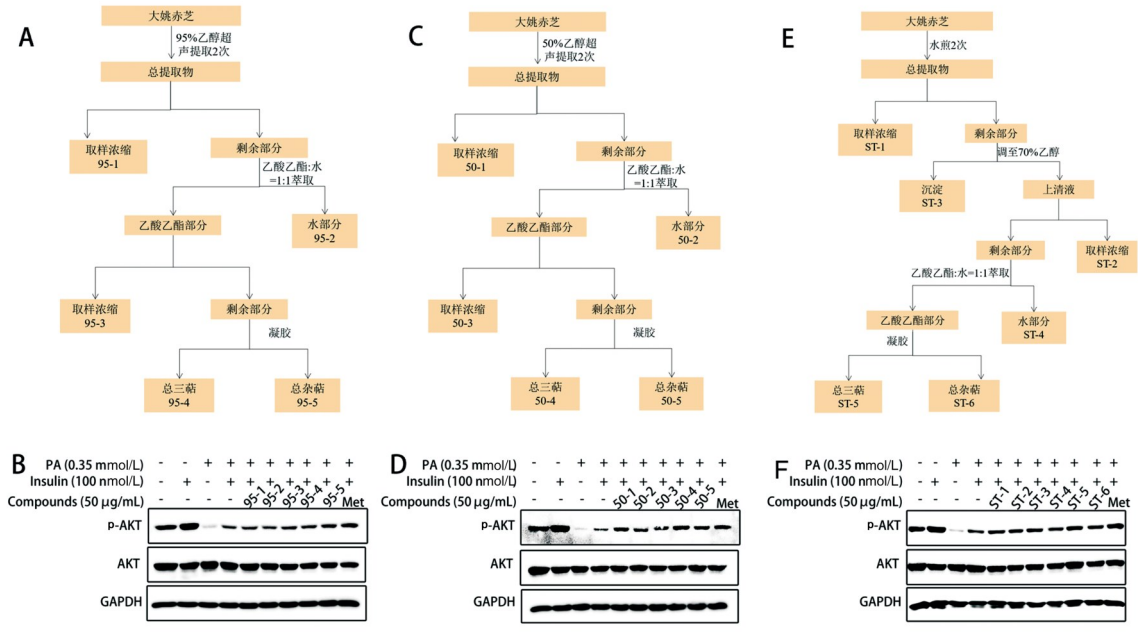
2.2.3 水提工艺

水提工艺得到的总提取物（ST-1）、脂溶性成分（ST-2）、总多糖（ST-3）、除去多糖、总三萜和总杂萜后剩余物质（ST-4）、总三萜（ST-5）和总杂萜（ST-6）均表现出一定的活性。活性强弱依次为：总三萜（ST-5）>总提取物（ST-1）>总多糖（ST-3）>总杂萜（ST-6）>脂溶性成分（ST-2）>除去多糖、总三萜和总杂萜后剩余物质（ST-4）（见图1F）。这些结果表明，水提工艺不仅可以得到有活性的水溶性成分（如总多糖），还可以得到有活性的脂溶性成分、总三萜和总杂萜。

综合比较3种工艺中总三萜和总杂萜的活性，发现50%乙醇提取和纯水提工艺提取的总三萜活性高于总杂萜，而95%乙醇提取工艺中总杂萜的活性强于总三萜。这些差异表明，乙醇浓度和提取工艺不同可能导致总三萜和总杂萜的组成成分发生变化（见图1B、1D、1F）。进一步比较3种工艺中水萃取组分的活性，发现95%乙醇提取工艺中的水萃取组分未表现出缓解胰岛素抵抗的活性，而50%乙醇提取工艺和水提工艺中的水萃取组分则具有显著活性，这种差异系由于灵芝多糖未被95%乙醇提取（见图1B、1D、1F）。

2.3 3种提取工艺获得的灵芝脂溶性成分与水溶性成分活性差异显著

为了比较3种提取工艺提取的灵芝脂溶性成分与水溶性成分的活性强弱，我们对其对Akt磷酸化的影响进行了分析，结果显示：3种提取工艺获得



A：95%乙醇提取工艺流程；B：蛋白免疫印迹检测95%乙醇提取灵芝各组分（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及Akt磷酸化（p-Akt）水平变化；C：50%乙醇提取工艺流程；D：蛋白免疫印迹检测50%乙醇提取灵芝各组分（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；E：水提取工艺流程；F：蛋白免疫印迹检测水提取工艺提取灵芝各组分（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化。Met：二甲双胍，Metformin；PA：棕榈酸钠，Sodium Palmitate；Insulin：胰岛素；Compounds：成分；Akt：蛋白激酶B；p-Akt：磷酸化Akt；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

图1 灵芝各组分均可缓解胰岛素抵抗

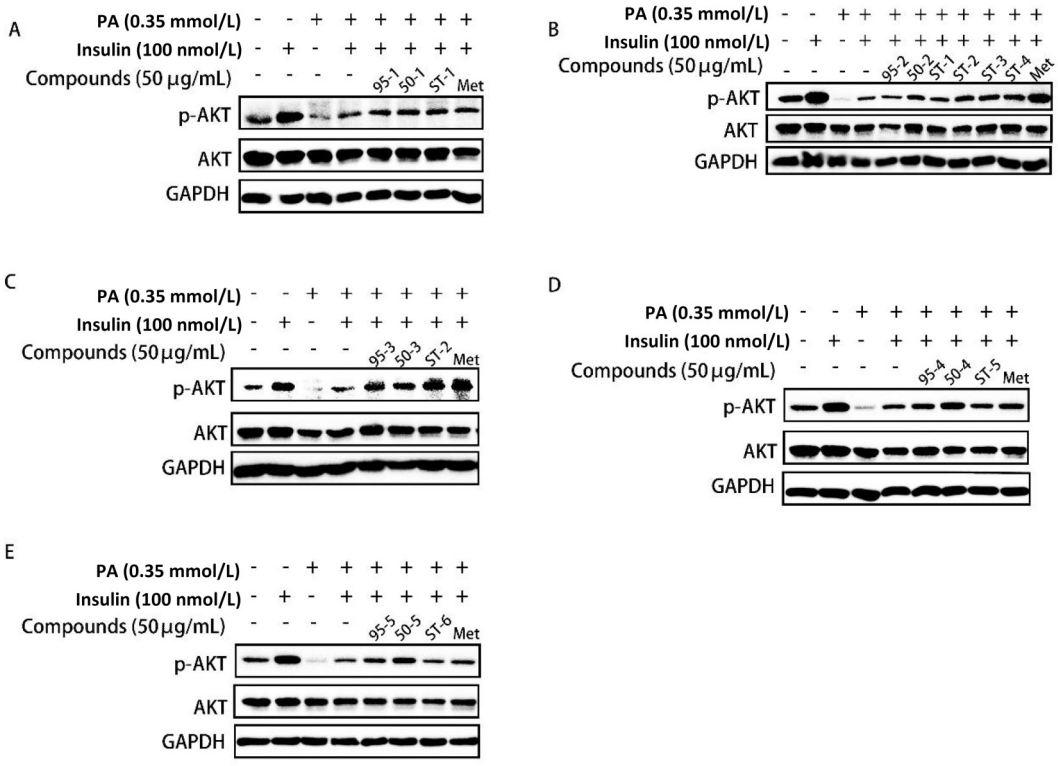
Figure 1 Extracts and fractions of *G. lucidum* alleviate insulin resistance

的总提取物对Akt磷酸化的促进效果相同（见图2A）；50%乙醇提取和水提工艺获得的水部分活性相同且显著，而95%乙醇提取的水部分无活性，表明大极性的水溶性成分在95%乙醇提取中未能有效提取（见图2B）；3种提取工艺获得的脂溶性部分均表现出较强活性（见图2C）；3种提取工艺获得的总三萜均具有显著活性，但50%乙醇提取的总三萜活性最强，95%乙醇提取的总三萜活性适中，水提工艺中总三萜的活性最弱（见图2D）；3种提取工艺获得的总杂萜均具有活性，50%乙醇提取的总杂萜活性最强，95%乙醇提取的总杂萜活性适中，水提工艺中总杂萜的活性最弱（见图2E）。

综合来看，灵芝的脂溶性成分、水溶性成分和多糖均可以有效缓解胰岛素抵抗，其中水溶性的多糖成分用水提工艺提取活性更高，50%乙醇提取的总三萜和总杂萜活性更好，对于除多糖、总三萜和总杂萜以外的其他水溶性成分，水提工艺提取效果最佳，而其他脂溶性成分则可以通过3种提取工艺均有效获得。

2.4 灵芝组分配伍加强单组分对胰岛素抵抗的缓解作用

通过3种提取工艺的研究，我们发现灵芝的总多糖、总三萜和总杂萜等各组分均具有缓解胰岛素抵抗的活性，且不同提取工艺获得的各组分在活性上存在显著差异。因此，探索灵芝组分的配伍是否能够实现活性叠加，以充分利用灵芝并提高治疗效果，值得进一步研究。为验证这一假设，我们对总三萜和总杂萜配伍、总多糖和总三萜配伍、总多糖和总杂萜配伍3种组合方式对胰岛素抵抗的影响进行了检测。结果显示，总三萜和总杂萜配伍后，不同浓度组合的活性均低于单独使用总三萜或总杂萜的活性（见图3A、3B）；总多糖和总三萜配伍的活性强于总多糖单独使用（见图3C、3D）；总多糖和总杂萜配伍的活性同样强于总多糖单独使用（见图3C、3D）。然而，总多糖与总三萜配伍及总多糖与总杂萜配伍的活性均未超过总三萜或总杂萜单独使用时的活性（见图3C、3D）。进一步通过葡萄糖摄取实验验证了3种配伍方式的活性，结果表明，



A：蛋白免疫印迹检测95%乙醇、50%乙醇、0%乙醇（水）总提取物（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；B：蛋白免疫印迹检测3种提取工艺中水溶性组分（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；C：蛋白免疫印迹检测3种提取工艺中脂溶性组分（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；D：蛋白免疫印迹检测3种提取工艺中总三萜（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；E：蛋白免疫印迹检测3种提取工艺中总杂萜（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化。Met：二甲双胍（Metformin）；PA：棕榈酸钠（Sodium Palmitate）；Insulin：胰岛素；Compounds：成分；Akt：蛋白激酶B（Protein Kinase B）；p-Akt：磷酸化Akt（Phospho-Akt Peptide）；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢（Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）。

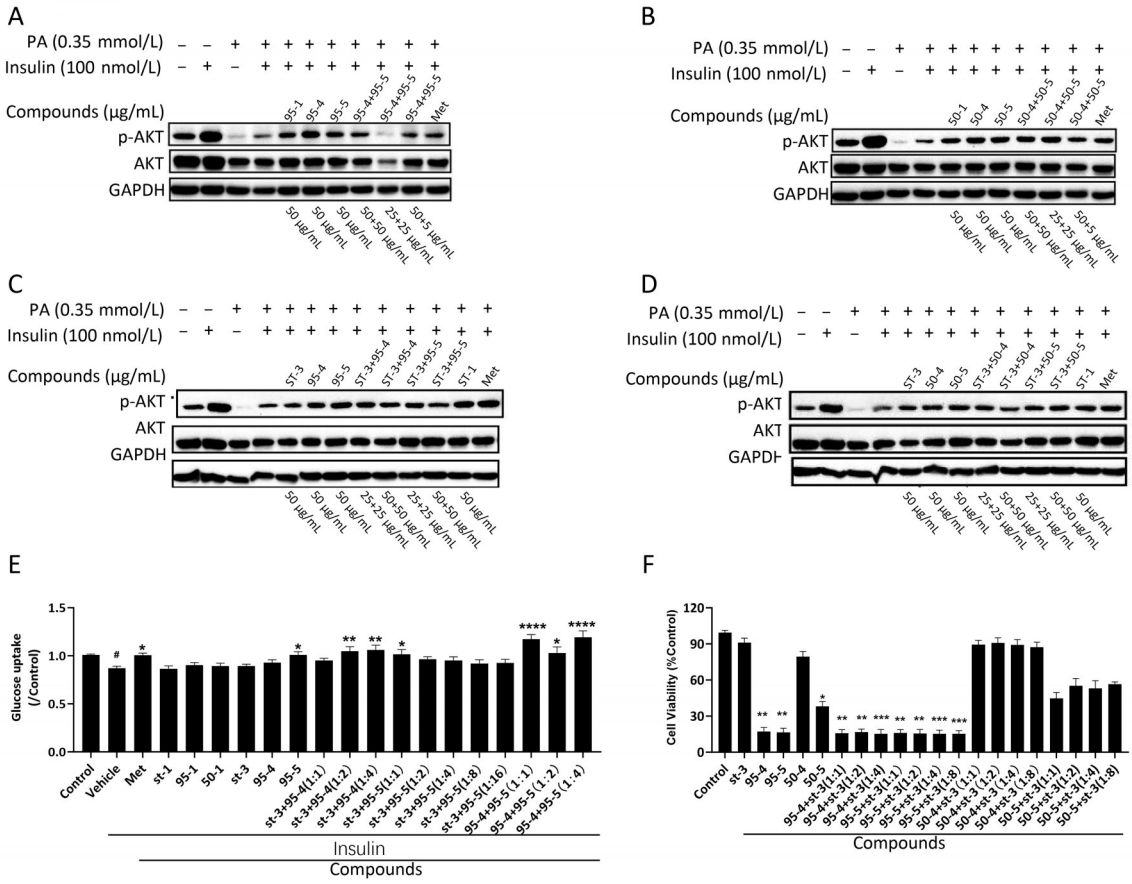
图2 3种提取工艺提取的灵芝各组分缓解胰岛素抵抗比对分析

Figure 2 Comparative analysis of *G. lucidum* fractions prepared by three extraction methods in alleviating insulin resistance

总多糖和总三萜配伍可以显著增强总三萜对细胞摄取葡萄糖的能力；总杂萜与总三萜配伍也能增强细胞对葡萄糖的摄取能力；而总多糖与总杂萜配伍未表现出协同作用（见图3E）。此外，灵芝组分的配伍对细胞活力未产生显著影响（见图3F）。综上所述，灵芝组分配伍呈现出复杂的活性表现，可以在某些情况下加强单组分的活性，也可能降低单组分的活性，这可能与配伍组分的浓度和比例相关，也可能与不同的提取方式获得的组分的成分不同有关，值得进一步深入研究。

2.5 复合提取工艺充分提取灵芝有效活性成分

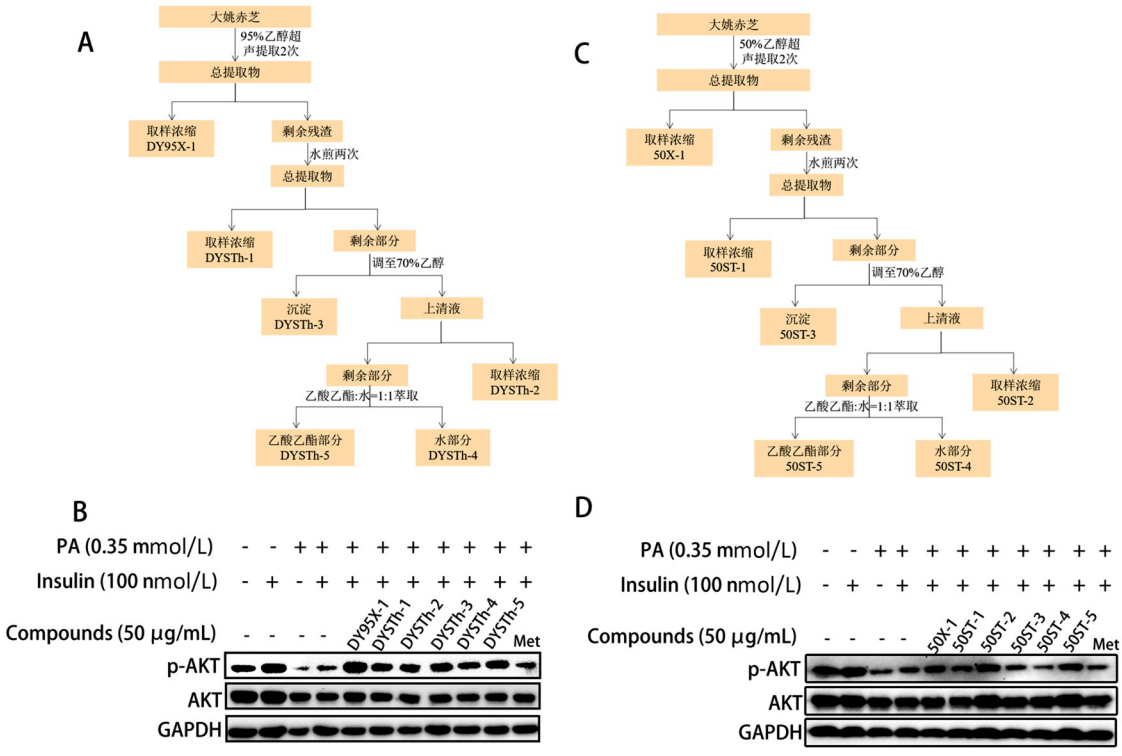
由于灵芝组分配伍所表现出的复杂性，以及不同提取工艺对总杂萜活性的影响，为了充分利用灵芝的活性成分，采用复合工艺以最大程度提取灵芝的有效活性成分显得尤为重要。我们通过先醇提后水提的方式对灵芝各组分进行充分提取，并检测其对Akt磷酸化的影响（见图4A、4C）。研究结果显示，大姚产灵芝经95%乙醇提取后获得的总提取物（DY95X-1），以及残渣经水提后进一步获得的总提取物（DYSTh-1）、脂溶性成分（DYSTh-2）、总多糖（DYSTh-3）、乙酸乙酯萃取的水部分（DYSTh-4）和乙酸乙酯部分（DYSTh-5）均能有效促进Akt的磷酸化（图4A、4B）。相比之下，在50%乙醇提取与水提工艺结合中，仅上清液（50ST-2）和乙酸乙酯部分（50ST-5）表现出显著的促进Akt磷酸化的能力（见图4C、4D）。这些结果表明，结合95%乙醇提取和水提工艺，可以充分提取灵芝中的多种活性成分，包括脂溶性成分（如总三萜、总杂萜）和水溶性成分（如多糖），从而显著提高灵芝的利用效率。



A：蛋白免疫印迹检测95%乙醇提取灵芝总杂萜和总三萜配伍处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；B：蛋白免疫印迹检测50%乙醇提取灵芝总杂萜和总三萜配伍处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；C：蛋白免疫印迹检测水提总多糖与95%乙醇提取灵芝总杂萜和总三萜配伍处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；D：蛋白免疫印迹检测水提总多糖与50%乙醇提取灵芝总杂萜和总三萜配伍处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；E：灵芝各组分配伍的葡萄糖摄取分析；n=3，与Control组比较，$^{\#}P$<0.05；与IR比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{****}P$<0.0001。F：灵芝各组分配伍的细胞毒性分析；n=3，与Control组比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01，$^{***}P$<0.001。其中，E和F各组分单独使用时浓度都用50 μg/mL，配伍使用时总浓度保持50 μg/mL。Met：二甲双胍，Metformin；PA：棕榈酸钠，Sodium Palmitate；Control：对照组；Vehicle：溶媒；Insulin：胰岛素；Compounds：成分；Akt：蛋白激酶B，Protein Kinase B；p-Akt：磷酸化Akt，Phospho-Akt Peptide；GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶，Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase；Cell viability：细胞活力。

图3 灵芝组分配伍分析灵芝发挥作用的协同性

Figure 3 Combination analysis of *G. lucidum* fractions demonstrating synergistic effects



A：95%乙醇叠加水提取工艺流程；B：蛋白免疫印迹检测95%乙醇叠加水提取灵芝各组分（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化；C：50%乙醇叠加水提取工艺流程；D：蛋白免疫印迹检测50%乙醇叠加水提取灵芝各组分（50 μg/mL）处理C2C12细胞后Akt及p-Akt水平变化。Met：二甲双胍，Metformin；PA：棕榈酸钠，Sodium Palmitate；Insulin：胰岛素；Compounds：成分；Akt：蛋白激酶B；p-Akt：磷酸化Akt；Phospho-Akt Peptide；GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶，Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase。

图4　复合工艺提取灵芝各组分缓解胰岛素抵抗分析

Figure 4　Analysis of fractions of G. lucidum obtained by combined extraction for alleviating insulin resistance

3　讨论

本研究发现不同提取工艺获得的灵芝各组分可不同程度缓解胰岛素抵抗，为此我们提出中药发挥作用存在的一种模式，即异物同靶，此处的靶泛指包括信号通路在内的靶标。不同提取工艺制备的灵芝组分的组成及其活性存在显著差异，表明优化提取工艺对实现灵芝的综合利用或高值利用至关重要。

本研究发现，总杂萜作为灵芝中微量成分在药理作用中的不可替代性。在95%和50%乙醇提取工艺中，总杂萜表现出最强的活性，而水提工艺因对总杂萜的提取或保持能力较弱，导致总杂萜的活性未能充分体现。该结果提示，在灵芝的开发与利用中，应特别注重优化对总杂萜的提取，以最大化发挥其药理作用。组合或配伍实验发现，灵芝的总三萜、总杂萜在一定浓度范围内表现出协同作用，但高浓度配伍反而降低了活性；总多糖与总三萜或总杂萜的配伍可以增强单一组分的活性，尤其在促进Akt磷酸化和葡萄糖摄取方面表现突出。然而，总多糖与总三萜或总杂萜配伍的活性未能超过总三萜或总杂萜单独使用时的水平，这可能与配伍浓度比及提取组分所包含成分有关。

灵芝中含有不同极性的有效成分，95%乙醇提取可有效地提取脂溶性成分，特别是总杂萜，但无法获得大极性的多糖类成分。水提取的工艺对灵芝多糖的提取效果最优，但对脂溶性成分尤其是总三萜和总杂萜的提取效率有限；50%乙醇提取虽能够同时兼顾水溶性和脂溶性成分，但对于不同极性成分的提取效率均不如前述两种单一工艺。复合提取工艺则有效结合了上述单一方法的优点：通过首先采用95%乙醇提取，能够高效提取脂溶性活性成分，尤其是具有重要药理活性的总三萜和总杂萜；随后使用水作为溶媒对高浓度乙醇提取后的残渣进一步提取，则可获得活性显著的多糖及其他水溶性成分。这种复合工艺可显著提升灵芝成分的整体提取效率，减少单一方法产生的有效成分损失或浪费，可实现灵芝资源的高值利用，灵芝的这一案例可在中药工业实践中加以借鉴。

本研究均是体外实验结果，由于脂溶性成分生

物利用度大小的不确定因素，加上多糖在肠道将会被不同程度地降解，因此体内的结果可能与体外有所出入，但这并不影响对中药多成分整合起效模式的判断以及对灵芝高值利用的参考。此外，各类成分在灵芝中的绝对含量是不同的，体外研究时采取了同浓度下的活性比较，对于认识每类成分的作用强度是有帮助的，但体内可能因实际暴露量不同，协同效应或有所不同，这也不影响对中药整合效应的理解，同样对选择性高值利用其中的某类成分是有积极作用的。最后，对于不同的疾病，灵芝起效的成分可能是不同的，本研究结果对于灵芝用于糖尿病胰岛素抵抗具有重要参考价值，但灵芝用于其他疾病的药效物质需要开展具体研究方能得出结论。

参考文献

[1] JOHRA F T, HOSSAIN S, JAIN P, et al. Amelioration of CCl_4-induced oxidative stress and hepatotoxicity by Ganoderma lucidum in long evans rats[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 9909.

[2] WANG W S, ZHANG Y H, WANG Z Y, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides improve lipid metabolism against high-fat diet-induced dyslipidemia[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 309(1): 116321.

[3] ZHEN C L, WU X X, ZHANG J, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides attenuates pressure-overload-induced pathological cardiac hypertrophy[J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14(1): 1127123.

[4] XU Z H, SU X, YANG G, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides protect against sepsis-induced cardiac dysfunction by activating SIRT1[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2022, 74(1): 124-130.

[5] AHMAD M F, ALSAYEGH A A, ALIAHMAD F A, et al. Ganoderma lucidum: Insight into antimicrobial and antioxidant properties with development of secondary metabolites[J]. Heliyon, 2024, 10(3): e25607.

[6] LI W S, ZHOU Q, LV B, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide supplementation significantly activates T-cell-mediated antitumor immunity and enhances anti-PD-1 immunotherapy efficacy in colorectal cancer[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(21): 12072-12082.

[7] TAKAKU S, SHIMIZU M, MORITA R. $CD^8(+)$ T cell-mediated therapeutic antitumor effect of an herbal mixture containing *Ganoderma Lucidum*[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2023, 2023(1): 9630816.

[8] PAN Y N, ZHANG Y, LI J Q, et al. A proteoglycan isolated from Ganoderma lucidum attenuates diabetic kidney disease by inhibiting oxidative stress-induced renal fibrosis both *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 310(1): 116405.

[9] FANG H, LIN D M, LI X X, et al. Therapeutic potential of Ganoderma lucidum polysaccharide peptide in Doxorubicin-induced nephropathy: Modulation of renin-angiotensin system and proteinuria[J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14(1): 1287908.

[10] CHAN S W, TOMLINSON B, CHAN P, et al. The beneficial effects of Ganoderma lucidum on cardiovascular and metabolic disease risk[J]. Pharmaceutical Biology, 2021, 59(1): 1161-1171.

[11] HU Y, WANG S X, WU F Y, et al. Effects and mechanism of Ganoderma lucidum polysaccharides in the treatment of diabetic nephropathy in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. BioMed Research International, 2022, 2022(1): 4314415.

[12] KHURSHEED R, SINGH S K, KUMAR B, et al. Self-nanoemulsifying composition containing curcumin, quercetin, Ganoderma Lucidum extract powder and probiotics for effective treatment of type 2 diabetes mellitus in streptozotocin induced rats[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2022, 612(1): 121306.

[13] PAN D, WANG L Q, CHEN C H, et al. Isolation and characterization of a hyperbranched proteoglycan from *Ganoderma Lucidum* for anti-diabetes[J]. Carbohydrate Polymers, 2015, 117(1): 106-114.

[14] WU G S, GUO J J, BAO J L, et al. Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from Ganoderma lucidum - a review[J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2013, 22(8): 981-992.

[15] HOLT R I G, COCKRAM C S, MA R C W, et al. Diabetes and infection: Review of the epidemiology, mechanisms and principles of treatment[J]. Diabetologia, 2024, 67(7): 1168-1180.

[16] LU X, XIE Q X, PAN X H, et al. Type 2 diabetes mellitus in adults: pathogenesis, prevention and therapy[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1): 262.

[17] SWEETING A, HANNAH W, BACKMAN H, et al. Epidemiology and management of gestational diabetes[J]. The Lancet, 2024, 404(10448): 175-192.

[18] JAMES D E, STOCKLI J, BIRNBAUM M J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance [J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2021, 22 (11): 751-771.

[19] 张娇娇, 彭云丽, 程永现 . 赤芝中新颖杂萜-三萜杂聚体的分离纯化及其改善 C2C12 细胞胰岛素抵抗作用[J]. 生物医学转化, 2023, 4(1): 61-77.

[20] 黄丽娜, MADHU B S, 刘云云, 等 . MS方法全景式破译灵芝孢子粉中酚性杂萜成分[J]. 中药与临床, 2023, 14 (4): 6-15.