

基于急性肺损伤功效的灵芝质量标志物研究

胡 扬^{1,2}, 武建平^{1#}, 宗 政¹, 解利东¹, 刘树森¹, 陈鲁宁¹, 宋辰威¹, 韩沛轩¹, 徐蓓蕾^{1,2}, 程 斌³, 李文兰^{1,2,4*}, 丁振铎^{5*}

1. 哈尔滨商业大学药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076
2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076
3. 浙江药科职业大学, 浙江 宁波 315502
4. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076
5. 哈尔滨商业大学职业技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘 要: **目的** 基于灵芝改善急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 的药效作用, 建立不同产地灵芝指纹图谱, 通过“物质-功效”相关性分析揭示灵芝质量标志物 (quality marker, Q-Marker)。**方法** 采用超高效合相色谱-四极杆飞行时间串联质谱 (ultra-performance convergence chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, UPC²-Q-TOF-MS/MS) 技术, 在正、负离子模式下建立 15 批不同产地灵芝的指纹图谱, 并对共有峰进行指认。建立脂多糖诱导的 ALI 小鼠模型, 给药干预后, 以血清和支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 含量及肺组织湿干质量比为药效指标, 综合灰色关联度分析、双变量相关分析、正交偏最小二乘分析 3 种方法进行“物质-功效”相关性分析, 筛选出灵芝干预 ALI 的潜在 Q-Marker, 并测定 Q-Marker 含量。**结果** 15 批灵芝指纹图谱在正离子模式下相似度为 0.678~0.835, 共有峰 18 个; 在负离子模式下相似度为 0.645~0.899, 共有峰 22 个。药效实验表明 15 批不同产地灵芝对 ALI 均有一定保护作用。筛选出灵芝酸 F、灵芝酸 DM、灵芝烯酸 D、灵芝酸 A、灵芝酸 C2、棕榈酸乙酯共 6 个潜在 Q-Marker。选取药效最优的 S12 (产地为黑龙江牡丹江市) 灵芝开展潜在 Q-Marker 含量测定, 其中灵芝酸 A 含量最高, 为 (1.328 2 $\pm$ 0.025 1) mg/g; 灵芝烯酸 D 含量最低, 为 (0.186 3 $\pm$ 0.003 5) mg/g。**结论** 通过“物质-功效”相关性分析筛选出与灵芝干预 ALI 药效具有显著关联性的 6 个潜在 Q-Marker, 为灵芝的质量评价、品质控制及药效物质基础研究提供了科学依据, 也为灵芝在 ALI 防治中的进一步开发应用奠定了基础。

关键词: 灵芝; 急性肺损伤; 超高效合相色谱-四极杆飞行时间串联质谱; 质量标志物; 灵芝酸 F; 灵芝酸 DM; 灵芝烯酸 D; 灵芝酸 A; 灵芝酸 C2; 棕榈酸乙酯

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)20-8239-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.20.024

Research on quality markers from *Ganoderma lucidum* based on efficacy of acute lung injury

HU Yang^{1,2}, WU Jianping¹, ZONG Zheng¹, XIE Lidong¹, LIU Shusen¹, CHEN Luning¹, SONG Chenwei¹, HAN Peixuan¹, XU Beilei^{1,2}, CHENG Bin³, LI Wenlan^{1,2,4}, DING Zhenduo⁵

1. College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. National Ministry of Education Anti-tumor Natural Drug Engineering Research Center, Harbin 150076, China
3. Zhejiang Pharmaceutical University, Ningbo 315502, China
4. Engineering Technology Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

收稿日期: 2026-05-09

基金项目: 黑龙江省重点研发计划项目 (2024ZX10B05); 中央支持地方高校改革发展资金人才培养项目; 浙江省基础公益研究计划 (LTGN23H280003); 宁波市社会公益研究第二批项目 (2023S058)

作者简介: 胡 扬, 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为中药药效物质基础研究。E-mail: huy0506@126.com

#共同第一作者: 武建平, 男, 博士, 研究方向为中药药效物质基础研究。

*通信作者: 李文兰, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础及质量标准研究。E-mail: lwldzd@163.com

丁振铎, 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药学。E-mail: dzdwl@126.com

5. College of Vocational and Technical Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To establish finger print of *Ganoderma lucidum* from different origins and identify quality marker (Q-Marker) through “compound-effect” correlation analysis based on the pharmacological effect of *Ganoderma lucidum* in improving acute lung injury (ALI). **Methods** Ultra-performance convergence chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPC²-Q-TOF-MS/MS) technology was used to establish fingerprint spectra of 15 batches of *G. lucidum* from different origins in positive and negative ion modes, and common peaks were identified. A mouse model of lipopolysaccharide-induced ALI was established, after drug intervention, the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-1 β , myeloperoxidase (MPO) in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue wet dry mass ratio were used as pharmacological indicators. Comprehensive grey correlation analysis, bivariate correlation analysis and orthogonal partial least squares analysis were used to conduct “substance-efficacy” correlation analysis, potential Q-Markers of *G. lucidum* intervention in ALI were screened, and the contents of Q-Marker were measured. **Results** The similarity of 15 batches of *G. lucidum* fingerprint spectra in positive ion mode ranges from 0.678 to 0.835, with a total of 18 peaks. In negative ion mode, the similarity ranges from 0.645 to 0.899, with a total of 22 peaks. Pharmacological experiments showed that 15 batches of *G. lucidum* from different origins had a certain protective effect on ALI. A total of six potential Q-Markers were identified, including ganoderic acid F, ganoderic acid DM, ganoderic acid D, ganoderic acid A, ganoderic acid C2 and ethyl palmitate. The most effective *G. lucidum* with S12 (produced in Mudanjiang city, Heilongjiang Province) was selected for potential Q-Marker content determination, the content of ganoderic acid A was the highest, at $(1.328\ 2 \pm 0.025\ 1)$ mg/g, the content of ganoderic acid D was the lowest, at $(0.186\ 3 \pm 0.003\ 5)$ mg/g. **Conclusion** Through “substance-effect” correlation analysis, six potential Q-Markers were identified as significantly associated with the pharmacological effects of *G. lucidum* in the treatment of ALI. This provides a scientific basis for the quality evaluation, quality control, and research on material basis of the pharmacologically active components of *G. lucidum*, and lays the foundation for its further development and application in the prevention and treatment of ALI.

Key words: *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.; acute lung injury; UPC²-Q-TOF-MS/MS; quality marker; ganoderic acid F; ganoderic acid DM; ganoderic acid D; ganoderic acid A; ganoderic acid C2; ethyl palmitate

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是由感染、创伤、休克等多种肺内及肺外致病因素诱发的一种呼吸系统疾病,以顽固性低氧血症、肺水肿和弥漫性肺泡损伤为主要特征,病情持续进展可进一步恶化为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS),该病临床致死率较高,严重危害患者生命健康^[1-3]。ALI 的核心病理生理机制为肺部过度且失控的炎症级联反应,涉及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 等多种促炎介质的“细胞因子风暴”,伴随中性粒细胞浸润和异常活化导致的氧化应激损伤与肺组织破坏^[4-6]。目前多采用机械通气联合糖皮质激素对 ALI 进行辅助治疗,但该方案易引发免疫抑制、继发感染等不良反应,临床上仍缺乏安全高效的特异性治疗药物。因此,筛选具备多靶点抗炎与免疫调节作用的天然中药活性成分,已成为 ALI/ARDS 防治研究的热点方向^[7-8]。

灵芝为多孔菌科真菌赤芝 *Ganoderma lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst.或紫芝 *G. sinense* Zhao, Xu et

Zhang 的干燥子实体^[9],始载于《神农本草经》,主耳聋,利关节,坚筋骨,好颜色,保神益精,久服轻身不老延年^[10-11],是中医扶正固本、补气安神的经典上品药材。现代研究证实,灵芝富含三萜类、多糖类、甾醇类等多种活性成分^[12-13],具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、免疫调节等多重药理活性^[14-15],同时在肺炎、哮喘、肺纤维化等呼吸系统疾病模型中展现出良好的保护作用,提示其对 ALI 具有较好干预潜力^[14]。

中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 强调以有效性、特有性、传递与溯源、配伍环境、可测性为核心理论,是搭建中药物质基础与临床功效精准关联的桥梁,也是完善中药精准质量评价体系的核心手段^[16-17]。《中国药典》2025 年版仅以灵芝多糖、三萜及甾醇作为灵芝质量控制指标,这种传统模式多依靠对单一或少数指标性成分进行定量检测,难以全面反映药材的整体质量,更无法有效关联其特定的临床功效,易造成产品质量不均一、药效不稳定等问题,严重限制了灵芝的标准化质量评价、临床应用及产业化发展。超高效合相色谱-四极杆飞行时间

串联质谱 (ultra-performance convergence chromatography coupled to quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, UPC²-Q-TOF-MS/MS) 技术兼具超临界流体色谱的优势和传统高效液相色谱的易用性, 具有专属性强、灵敏度高、重复性好、快速简便和绿色环保等优势, 与常规的超高效液相色谱-质谱检测方法相比, 在结构类似的位置异构体和顺反异构体分离解析方面具有显著优势^[18-19]。

为此, 本研究采用 UPC²-Q-TOF-MS/MS 技术, 建立不同产地灵芝指纹图谱, 并对共有峰进行指认。同时构建脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的小鼠 ALI 模型, 通过检测炎症因子水平、肺组织湿干质量比等关键药效指标, 评价不同产地灵芝抗 ALI 活性。进一步结合灰色关联度分析、双变量相关分析、正交偏最小二乘分析 (orthogonal partial least squares, OPLS) 等多元统计方法, 开展“物质-功效”关联性研究, 筛选出与抗 ALI 药效高度相关的潜在 Q-Marker 并进行含量测定。以期对灵芝的质量评价及其在呼吸系统疾病防治中的合理应用提供实验依据与理论支撑。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 Balb/c 小鼠, 体质量 (20±2) g, 购自长春国家生物产业基地实验动物中心, 许可证号 SCXK (吉) 2020-0002, 动物质量合格证号 No.210726250101259342。动物于温度 (23±2) °C、相对湿度 40%~60% 的环境中饲养, 保持室内通风良好。动物实验经哈尔滨商业大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 HSDYXY-2024086)。

1.2 药材

灵芝产地分别为浙江龙泉市 (S1)、安徽六安市 (S2)、广东韶关市 (S3)、福建武夷山市 (S4)、山东泰安市 (S5)、吉林白山市 (S6)、黑龙江齐齐哈尔市 (S7)、黑龙江漠河市 (S8)、黑龙江黑河市 (S9)、黑龙江北安市 (S10)、黑龙江佳木斯市 (S11)、黑龙江牡丹江市 (S12)、黑龙江抚远市 (S13)、黑龙江铁力市 (S14)、黑龙江哈尔滨市 (S15), 经哈尔滨商业大学徐蓓蕾教授鉴定均为多孔菌科真菌赤芝 *G. lucidum* (Leyss. ex Fr.) Karst. 的干燥子实体。

1.3 药品与试剂

对照品灵芝酸 A、灵芝烯酸 D、灵芝酸 F、灵芝酸 DM、棕榈酸乙酯、灵芝酸 C2 (批号分别为 PS000596、PS010884、PS013922、PSD250922-256、

PS020135、PS010837), 质量分数均 ≥98%, 购自成都普思生物科技股份有限公司; LPS (批号 L2880) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; 甲醇、乙腈、甲酸铵、甲酸 (批号分别为 210658、20220731、70221、214911) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 小鼠 TNF-α ELISA 试剂盒 (批号 AD202305)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (批号 AD202305)、小鼠 IL-1β ELISA 试剂盒 (批号 AD202305)、小鼠髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) ELISA 试剂盒 (批号 AD202305) 购自安迪华泰生物科技有限公司; 地塞米松注射液 (批号 250502, 兽药字 041531146) 购自山西金馥康生物药业股份有限公司。

1.4 仪器

Acquity UPC² 色谱仪、Xevo G2-XS Q ToF 质谱仪、Acquity UPLC I-Class 色谱仪、Xevo TQD 三重四级杆质谱仪 (美国 Waters 公司); TD4C 型台式低速离心机、UC-250E 型超声波清洗器 (上海精其仪器有限公司); LE204E/02 型电子分析天平 [梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司]; RE-2000A 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂); DZKW-4 型电子恒温水浴锅 (北京中兴伟业仪器有限公司); RT-6100 型酶标分析仪 (深圳雷杜生命科学股份有限公司)。

2 方法与结果

2.1 灵芝指纹图谱的建立及共有峰化学成分表征

2.1.1 灵芝供试品溶液的制备 分别称取 15 批不同产地灵芝适量粉碎, 按料液比 1:8 加入 70% 乙醇, 80 °C 回流提取 3 次, 每次 2 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩制成浸膏, -20 °C 保存。分别称取适量灵芝提取物浸膏, 用 80% 甲醇充分溶解, 离心取上清液, 用 0.22 μm 针式过滤器滤过, 制成 0.05 g/mL (以生药计) 的不同产地灵芝供试品溶液。

2.1.2 检测条件

(1) 色谱条件: Acquity UPC²™ BEH 色谱柱 (100 mm×3.0 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸甲醇-乙腈 (1:1) 溶液, B 为超临界 CO₂, 补偿溶液为甲酸铵甲醇溶液 (2.5 mmol/L), 梯度洗脱: 0~5 min, 1%~5% A; 5~13 min, 5%~8% A; 13~25 min, 8%~10% A; 25~33 min, 10%~17% A; 33~34 min, 17%~1% A; 34~35 min, 1% A。柱温 45 °C; 体积流量 1 mL/min; 进样量 2 μL。

(2) 质谱条件: 电喷雾离子源 (electrospray ion source, ESI), 正、负离子模式扫描, 扫描范围 *m/z* 50~1 200, 低能量 6 V, 高能量 25~50 V, 离子源

温度 100 ℃, 雾化温度 400 ℃, 喷雾电压 3.0 kV, 去溶剂气体流量 800 L/h, 锥孔电压 40 V, 毛细管电压 2 500 V。

2.1.3 指纹图谱建立及方法学考察 取 15 个产地的灵芝供试品溶液进行 UPC²-Q-TOF-MS/MS 分析, 采集正、负离子模式下的质谱图, 导入“中药色谱指纹图谱相似度评价系统 2004A 版”分别建立 2 种离子模式的指纹图谱见图 1, R 为对照图谱, 以 S8 作为参照图谱进行色谱峰匹配, 正、负离子模式下标记共有峰 18、22 个。采用 S12 供试品溶液进行精密度、重复性、24 h 稳定性的方法学考察。

正离子模式下以 4 号峰(灵芝酸 F)的保留时间和峰面积为参照, 负离子模式下以 18 号峰(灵芝酸

A) 的保留时间和峰面积为参照进行方法学考察。

①精密度试验: 取 S12 产地供试品溶液, 连续进样 6 次, 正、负离子模式各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.89\%$ 、 0.83% , 相对峰面积的 $RSD \leq 2.26\%$ 、 2.44% 。②稳定性试验: 取 S12 产地供试品溶液, 分别于配制后 0、6、12、18、24 h 进样测定, 正、负离子模式各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.82\%$ 、 0.91% , 相对峰面积的 $RSD \leq 2.43\%$ 、 2.19% 。③重复性试验: 取 S12 产地药材, 按“2.1.1”项下方法平行制备 6 份供试品溶液并测定, 正、负离子模式各共有峰相对保留时间的 $RSD \leq 0.84\%$ 、 0.82% , 相对峰面积的 $RSD \leq 2.02\%$ 、 2.01% 。表明本方法精密度和重复性良好, 供试品溶液在 24 h 内稳定。

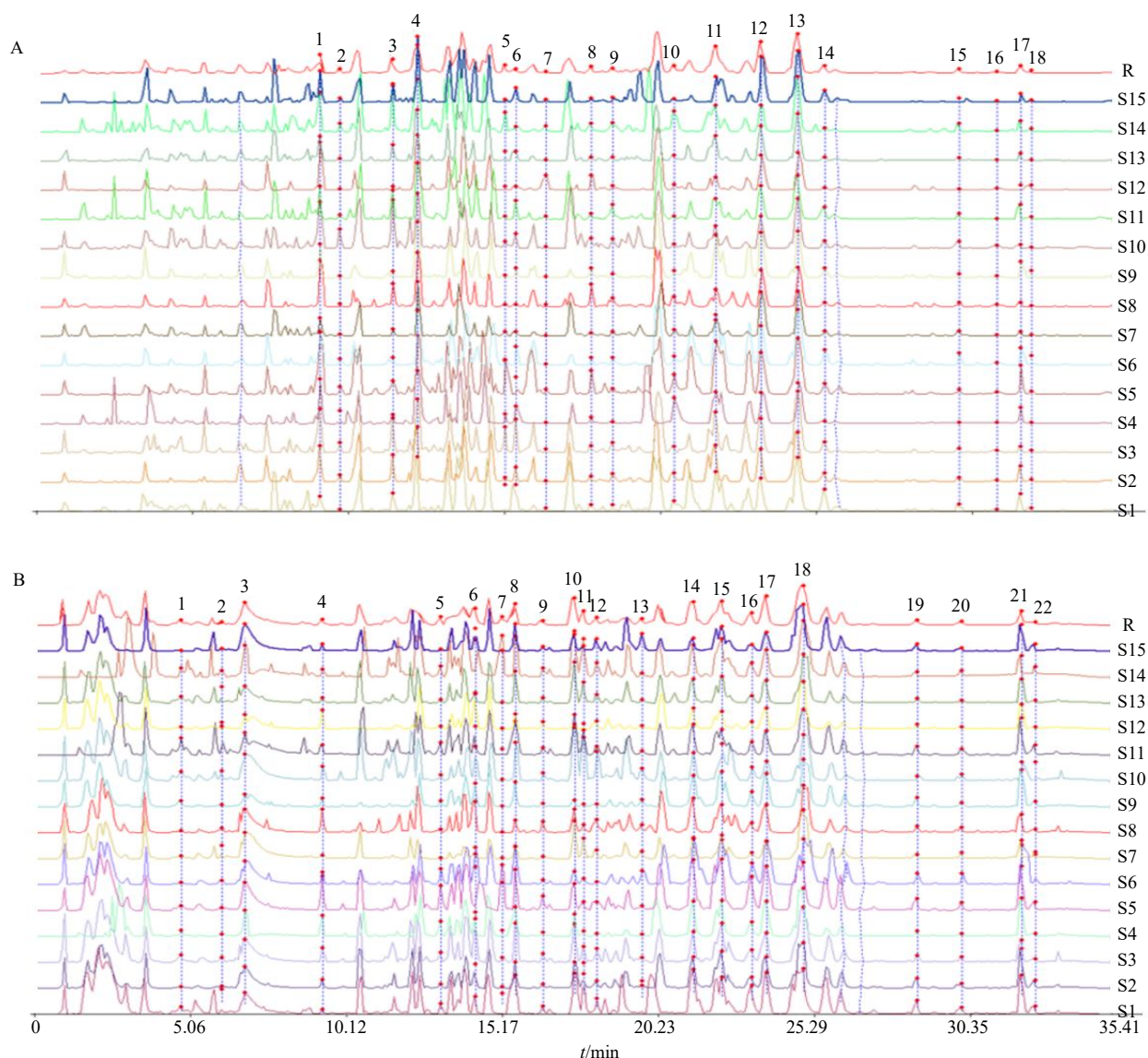


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下不同产地灵芝的指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint chromatogram of *G. lucidum* from different origins in positive (A) and negative (B) ion modes

2.1.4 相似度评价 将 15 个不同产地灵芝指纹图谱与对照图谱进行相似度评价,结果见表 1。正离子模式下相似度为 0.678~0.835,负离子模式下相似度为 0.645~0.899,相似度在 0.8 以上的产地分别仅有 6 个和 8 个,表明不同产地的灵芝质量差异较大。

2.1.5 共有峰化学成分表征 通过从 PubMed、CNKI、Chemspider、TCMSP 等数据库以及文献资料收集关于灵芝相关内容,构建灵芝成分自建库。将正、负离子模式下采集的数据用 Waters Masslynx

4.1 软件进行分析,根据相对分子质量、分子式、碎片离子、同类化合物的质谱裂解规律及相关文献资料进行共有峰化学成分析,结果见表 2、3。

2.2 灵芝改善 ALI 的药效学研究

2.2.1 ig 溶液的制备 取“2.1.1”项下不同产地灵芝提取物浸膏,用蒸馏水溶解成 1 g/mL(以生药计)的 ig 溶液备用。

2.2.2 分组、造模、给药与取材 取雄性 Balb/c 小鼠随机分为 18 组,每组 10 只,分别为对照组、模

表 1 相似度评价结果
Table 1 Similarity evaluation result

样品号	相似度		样品号	相似度	
	正离子	负离子		正离子	负离子
S1	0.742	0.821	S9	0.835	0.899
S2	0.835	0.822	S10	0.746	0.791
S3	0.834	0.777	S11	0.719	0.645
S4	0.678	0.677	S12	0.751	0.820
S5	0.807	0.841	S13	0.723	0.775
S6	0.824	0.889	S14	0.729	0.675
S7	0.779	0.804	S15	0.816	0.881
S8	0.766	0.781			

表 2 正离子模式共有峰 UPC²-Q-TOF-MS/MS 鉴定结果
Table 2 UPC²-Q-TOF-MS/MS identification results of common peaks in positive ion mode

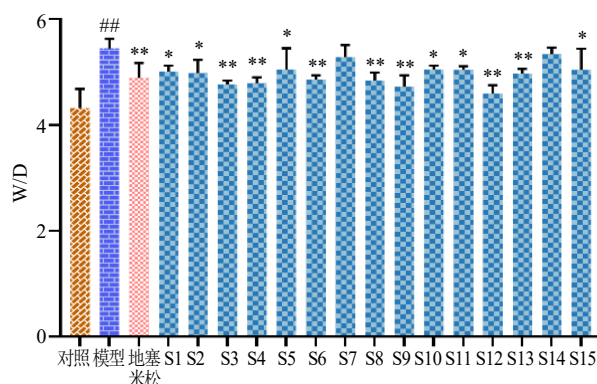
峰号	离子模式	t _R /min	成分	分子式	相对分子质量	m/z		误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子 (m/z)
						理论值	实测值		
1	[M+H] ⁺	9.17	灵芝酸TR	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468.324 0	469.331 8	469.328 0	-8.10	469.328 0, 451.315 3, 423.315 6, 407.282 3
2	[M+H] ⁺	9.83	(22S,24E)-22-acetoxy-3,7-dioxolanosta-8,24-dien-26-oic acid	C ₃₂ H ₄₆ O ₆	526.329 4	527.337 3	527.335 3	-3.79	467.308 7, 439.349 6
3	[M+H] ⁺	11.56	3-O-乙酰基灵芝酸H	C ₃₄ H ₄₆ O ₁₀	614.309 1	615.316 9	615.320 3	5.53	555.284 3, 495.264 5
4	[M+H] ⁺	12.22	灵芝酸F	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	570.282 9	571.290 7	571.291 3	1.05	543.318 7, 511.266 7, 467.308 7
5	[M+H] ⁺	15.05	灵芝酸V	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	528.345 1	529.352 9	529.348 5	-8.31	469.328 0, 451.310 9, 423.315 6
6	[M+H] ⁺	15.44	灵芝烯酸D	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512.277 4	513.285 2	513.281 4	-7.40	513.281 4, 495.264 5
7	[M+H] ⁺	16.54	灵芝烯酸E	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	528.272 3	529.280 1	529.282 5	4.53	511.201 9, 485.319 1, 467.313 1
8	[M+H] ⁺	18.03	灵芝酸O	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	528.272 3	529.280 1	529.277 8	-4.35	529.277 8, 511.266 7, 467.268 9, 439.233 9
9	[M+H] ⁺	18.72	(11α,24E)-11-hydroxy-3,7-dioxolanosta-8,24-dien-26-oic acid	C ₃₀ H ₄₄ O ₅	484.318 9	485.326 7	485.323 6	-6.39	485.323 6, 467.308 7, 439.315 3
10	[M+H] ⁺	20.87	(7β,12β,20Z)-12-acetoxy-7-hydroxy-3,11,15,23-tetraoxolanosta-8,20(22)-dien-26-oic acid	C ₃₂ H ₄₂ O ₉	570.282 9	571.290 7	571.291 3	1.05	571.291 3, 553.280 2, 511.336 1
11	[M+H] ⁺	22.15	灵芝酸G	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	532.303 6	533.311 4	533.310 5	-1.69	533.310 5, 515.300 0, 497.288 5, 479.274 8
12	[M+H] ⁺	23.55	灵芝酸C6	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	530.288 0	531.295 8	531.294 6	-2.26	513.286 0, 495.273 6, 485.287 5
13	[M+H] ⁺	24.83	灵芝酸A	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516.308 7	517.316 5	517.313 4	-5.99	499.302 9, 481.288 3
14	[M+H] ⁺	25.58	灵芝烯酸E	C ₃₀ H ₄₂ O ₇	514.293 1	515.300 9	515.300 0	-1.75	497.247 4, 479.270 3, 471.338 3
15	[M+H] ⁺	29.90	12β-乙酰氧基灵芝酸D	C ₃₂ H ₄₄ O ₉	572.298 5	573.306 4	573.308 2	3.14	555.274 7, 529.268 4, 513.281 4
16	[M+H] ⁺	31.46	赤芝酸J	C ₂₇ H ₃₈ O ₈	490.256 7	491.264 5	491.265 1	1.22	463.027 7, 429.086 3
17	[M+H] ⁺	31.99	丹芝酸A	C ₃₀ H ₄₄ O ₆	500.313 8	501.321 6	501.321 4	-0.39	501.321 4, 483.310 6, 457.360 6
18	[M+H] ⁺	32.20	灵芝烯酸C	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516.308 7	517.316 5	517.318 0	2.90	499.298 3, 481.288 3, 471.342 8, 455.345 4

表 3 负离子模式共有峰 UPC²-Q-TOF-MS/MS 鉴定结果
Table 3 UPC²-Q-TOF-MS/MS identification results of common peaks in negative ion mode

峰号	离子模式	<i>t_R</i> /min	成分	分子式	相对分子质量	<i>m/z</i>		误差 (×10 ⁻⁶)	碎片离子 (<i>m/z</i>)
						理论值	实测值		
1	[M-H] ⁻	4.70	(10 <i>E</i> ,12 <i>E</i>)-9-羟基-10,12-十八碳二烯酸 (10 <i>E</i> ,12 <i>E</i>)-9-hydroxy-10,12-octadecadienoic acid	C ₁₈ H ₃₂ O ₃	296.235 1	295.227 3	295.225 5	-6.10	295.225 5, 277.216 5, 251.210 4
2	[M-H] ⁻	5.95	灵芝酸SZ	C ₃₀ H ₄₄ O ₃	452.329 0	451.321 2	451.323 6	5.32	451.323 6, 423.324 3, 407.334 4
3	[M-H] ⁻	6.79	棕榈酸乙酯	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284.271 5	283.263 7	283.264 5	2.82	283.264 5, 255.232 1
4	[M-H] ⁻	9.32	灵芝酸DM	C ₃₀ H ₄₄ O ₄	468.324 0	467.316 1	467.318 3	4.71	467.318 3, 439.325 7, 423.328 5
5	[M-H] ⁻	13.20	ganoderoid D	C ₃₂ H ₄₀ O ₉	568.267 2	567.259 4	567.260 6	2.12	567.260 6, 507.240 4, 463.249 4
6	[M-H] ⁻	14.30	灵芝内酯	C ₂₇ H ₃₆ O ₆	456.251 2	455.243 4	455.243 7	0.66	455.243 7, 437.224 7, 393.206 3
7	[M-H] ⁻	15.20	灵芝酸V	C ₃₂ H ₄₈ O ₆	528.345 1	527.337 3	527.339 8	4.74	527.339 8, 509.322 9, 467.318 3
8	[M-H] ⁻	15.50	灵芝烯酸D	C ₃₀ H ₄₀ O ₇	512.277 4	511.269 6	511.270 7	2.15	511.270 7, 493.259 9, 483.312 3, 449.267 9
9	[M-H] ⁻	16.63	灵芝烯酸E	C ₃₀ H ₄₀ O ₈	528.272 3	527.264 5	527.264 6	0.19	527.264 6, 509.253 6, 465.261 7
10	[M-H] ⁻	17.52	赤芝酸B	C ₂₇ H ₃₈ O ₇	474.261 8	473.253 9	473.252 2	-3.59	455.243 7, 445.213 7, 411.254 2
11	[M-H] ⁻	17.82	赤芝酸P	C ₂₉ H ₄₂ O ₈	518.288 0	517.280 1	517.280 9	1.55	517.280 9, 499.273 3, 457.260 5, 413.267 0
12	[M-H] ⁻	18.27	赤芝酸C	C ₂₇ H ₄₀ O ₇	476.277 4	475.269 6	475.268 3	-2.74	475.268 3, 457.260 5, 439.248 4
13	[M-H] ⁻	19.67	赤芝酸I	C ₂₇ H ₃₈ O ₇	474.261 8	473.253 9	473.252 2	-3.59	473.252 2, 455.243 7, 411.250 1
14	[M-H] ⁻	21.40	灵芝酸α	C ₃₂ H ₄₆ O ₉	574.314 2	573.306 4	573.305 8	-1.05	573.305 8, 555.295 0, 513.287 2, 511.307 8
15	[M-H] ⁻	22.36	灵芝酸G	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	532.303 6	531.295 8	531.298 0	4.14	513.287 2, 495.277 0, 469.295 1, 451.284 4
16	[M-H] ⁻	22.60	赤芝酸Q	C ₂₇ H ₄₀ O ₆	460.282 5	459.274 7	459.273 0	-3.70	459.273 0, 441.263 9, 397.274 0
17	[M-H] ⁻	23.65	灵芝酸C6	C ₃₀ H ₄₂ O ₈	530.288 0	529.280 1	529.279 4	-1.32	529.279 4, 511.270 7, 467.278 4
18	[M-H] ⁻	24.89	灵芝酸A	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516.308 7	515.300 9	515.298 4	-4.85	515.298 4, 497.289 2, 453.301 1
19	[M-H] ⁻	28.62	灵芝酸I	C ₃₀ H ₄₄ O ₈	532.303 6	531.295 8	531.298 0	4.14	531.298 0, 513.282 6, 495.277 0, 469.299 5, 451.288 8
20	[M-H] ⁻	30.11	丹芝酸B	C ₃₀ H ₄₆ O ₆	502.329 4	501.321 6	501.321 1	-1.00	501.321 1, 483.307 8, 457.256 1
21	[M-H] ⁻	31.99	灵芝酸C2	C ₃₀ H ₄₆ O ₇	518.324 4	517.316 5	517.318 2	3.29	517.318 2, 499.305 4, 455.318 0
22	[M-H] ⁻	32.29	灵芝烯酸C	C ₃₀ H ₄₄ O ₇	516.308 7	515.300 9	515.303 0	4.08	515.303 0, 497.289 2, 479.286 3, 453.301 1

型组、地塞米松（10 mg/kg）组和不同产地（S1～S15）灵芝组。经预实验确定灵芝给药剂量为 8.0 g/(kg·d)（按生药计），灵芝组 ig 相应药物，对照组、模型组和地塞米松组 ig 等体积的生理盐水，1 次/d，连续给药 2 周。给药第 14 天，地塞米松组 ip 地塞米松注射液。末次给药 0.5 h 后，除对照组外，其余小鼠 ip LPS（10 mg/kg）诱导 ALI 模型。造模 12 h 后，分别采集各组小鼠的血清和支气管肺泡灌洗液（bronchoalveolar lavage fluid, BALF），于-80 ℃冰箱保存待测。

2.2.3 不同产地灵芝对 ALI 小鼠肺组织湿干质量比（W/D）的影响 分离各组小鼠未灌洗的肺组织右叶，滤纸吸干表面液体后称定质量，记为湿质量（W）；肺组织经 70 ℃干燥 48 h 后称定质量，记为干质量（D），计算 W/D，结果见图 2。与对照组比较，模型组小鼠 W/D 显著升高（ $P<0.01$ ）；与模型组比较，除 S7 和 S14 呈降低趋势外，其他产地的



与对照组比较：### $P<0.01$ ；与模型组比较：* $P<0.05$ ** $P<0.01$ ，图 3、4 同。
$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, same as figs. 3, 4.

图 2 不同产地灵芝对 ALI 小鼠肺组织 W/D 的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 2 Effect of *G. lucidum* from different origins on W/D of lung tissue in ALI mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

灵芝均能显著降低 ALI 小鼠 W/D ($P < 0.05, 0.01$)。

2.2.4 不同产地灵芝对 ALI 小鼠血清和 BALF 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MPO 水平的影响 按照 ELISA 试剂盒说明书分别测定血清和 BALF 中 TNF- α 、IL-

1 β 、IL-6、MPO 水平, 结果见图 3、4。与对照组比较, 模型组小鼠血清和 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、MPO 水平显著升高 ($P < 0.01$), 表明 LPS 诱导的小鼠 ALI 模型制备成功。与模型组比较, 不同产地的

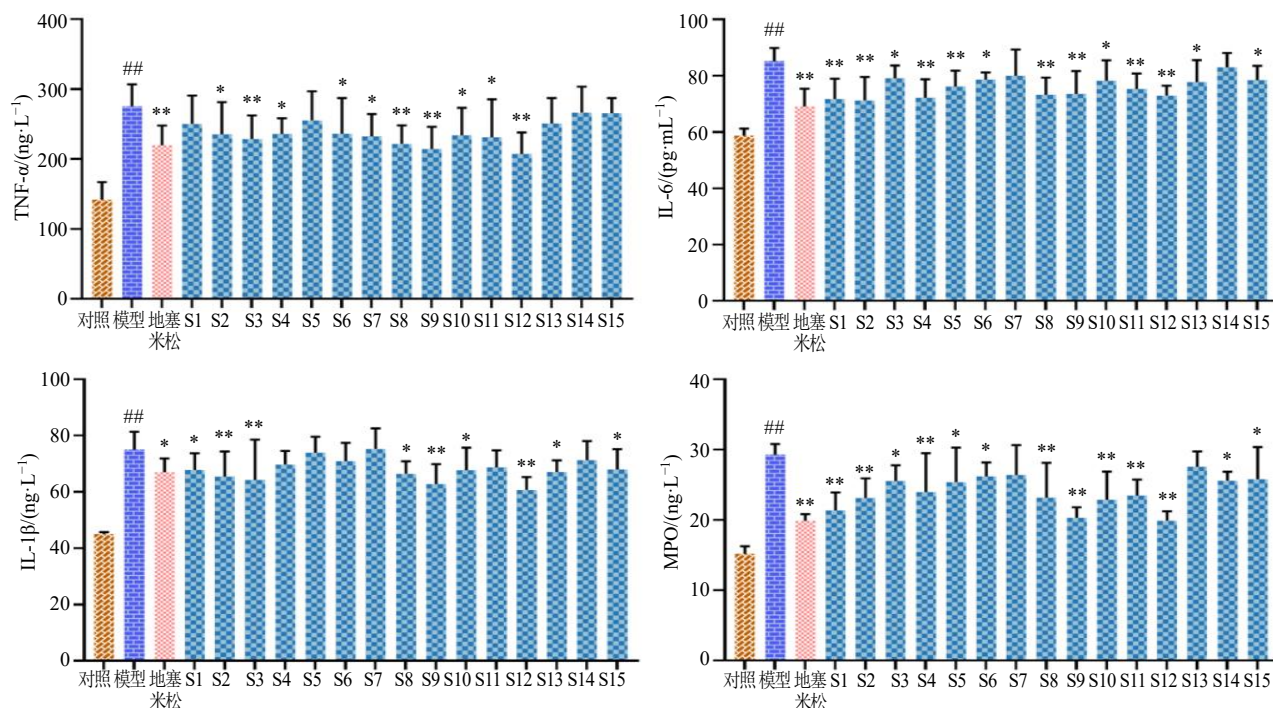


图 3 不同产地灵芝对 ALI 小鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effect of *G. lucidum* from different origins on levels of inflammatory factors in serum of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

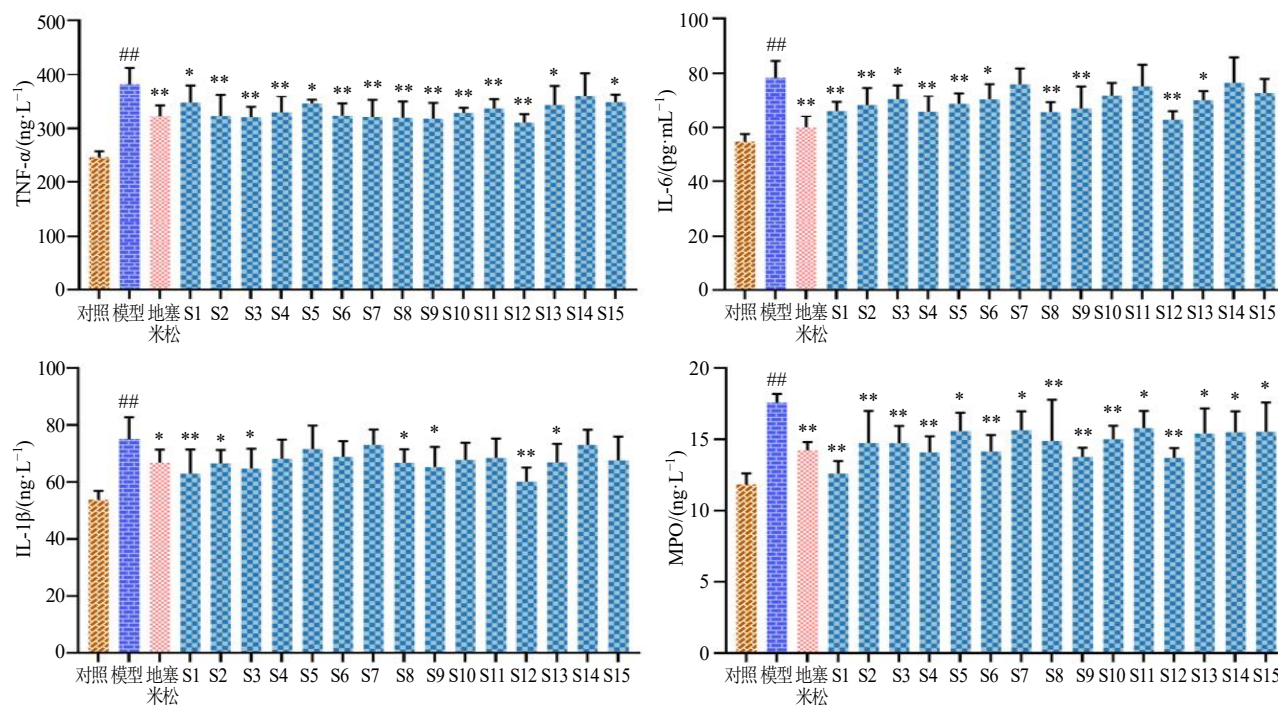


图 4 不同产地灵芝对 ALI 小鼠 BALF 中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 4 Effect of *G. lucidum* from different origins on levels of inflammatory factors in BALF of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

灵芝均能不同程度地降低 ALI 小鼠血清和 BALF 中炎症因子的水平。

2.3 灵芝改善 ALI 的 Q-Marker 筛选

2.3.1 灰色关联度分析 (grey relation analysis, GRA) 分别以正、负离子模式下共有峰相对峰面积为子序列, 以 W/D、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MPO 数据为母序列, 进行 GRA, 各成分与药效指标的关联度见图 5, 以关联度大于平均值为标准进行筛选, 正离子模式下 1、4、9、11~13、15、18 号峰符合

条件, 负离子模式下 3、4、8、9、13、15~21 号峰符合条件。

2.3.2 双变量相关分析(bivariate correlation analysis, BCA) 分别以正、负离子模式下共有峰相对峰面积与 W/D、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MPO 数据作为分析变量, 导入 IBM SPSS Statistics 26.0 版软件, 进行 Pearson BCA, 结果见表 4, 正离子模式下 3、4、7、8、16 号峰和负离子模式下 3、4、8、15、18、21 号峰与所有药效指标有显著关联作用 ($P<0.05$ 、 0.01)。

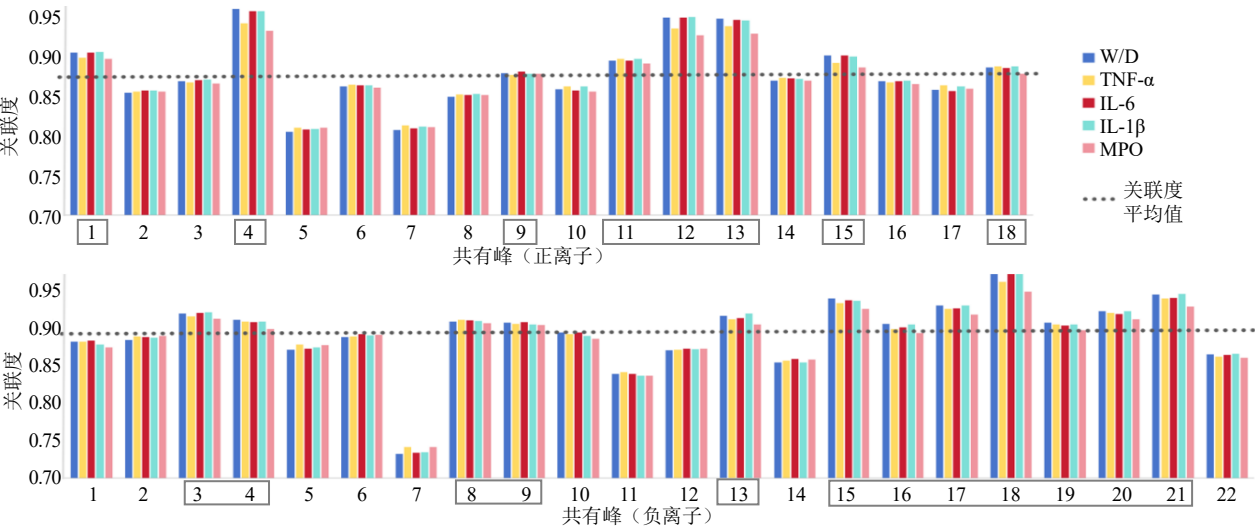


图 5 GRA 结果

Fig. 5 GRA results

表 4 BCA 结果

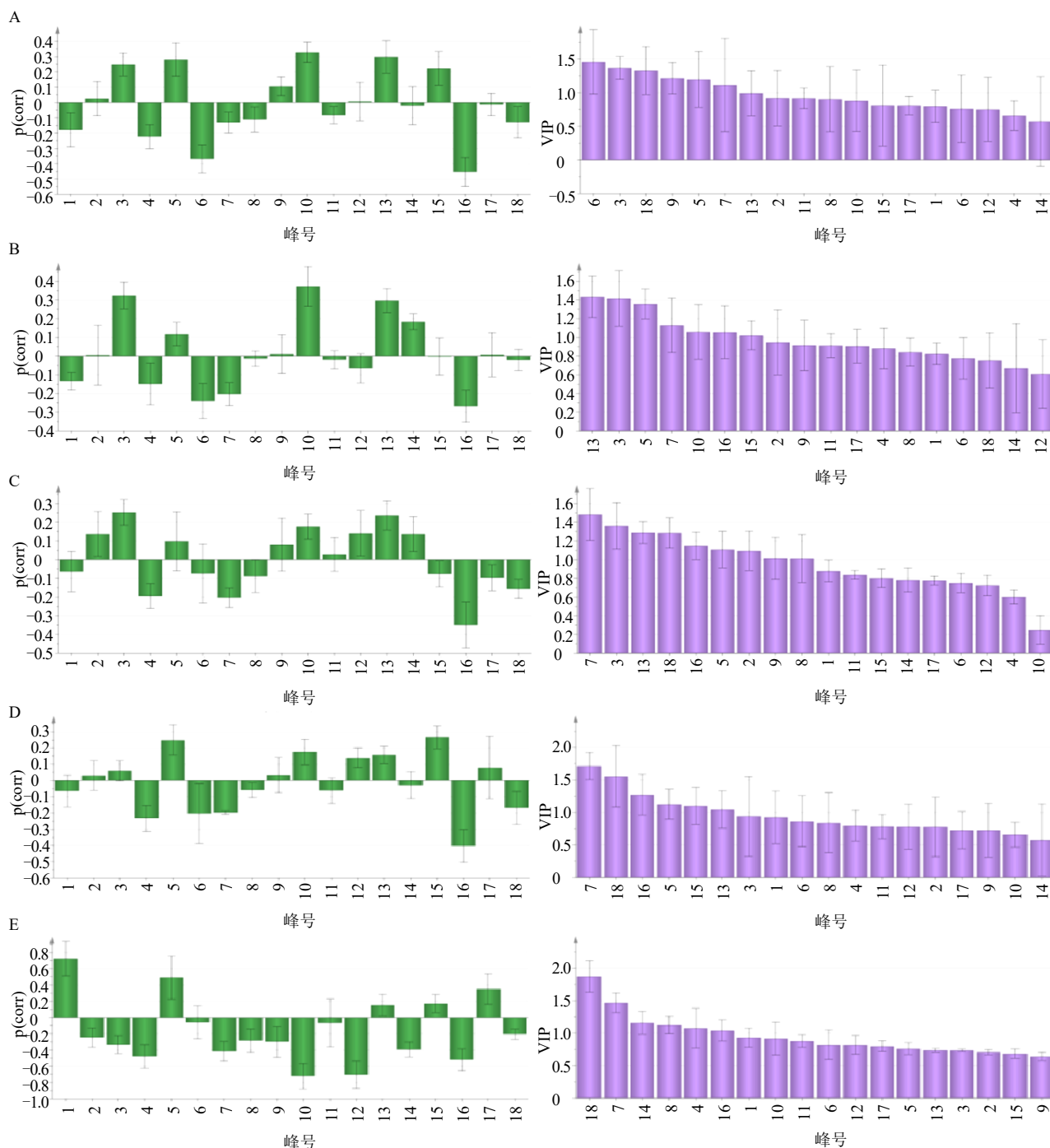
Table 4 Results of BCA

峰号	关联度 (正离子模式)					峰号	关联度 (负离子模式)				
	W/D	TNF- α	IL-6	IL-1 β	MPO		W/D	TNF- α	IL-6	IL-1 β	MPO
1	-0.152	0.001	-0.097	-0.111	0.006	1	0.089	0.084	0.087	0.055	0.001
2	0.191	0.086	-0.026	0.110	0.020	2	0.225	0.418**	0.129	0.375**	0.100
3	0.431**	0.406**	0.383**	0.166*	-0.148*	3	0.357*	0.395**	0.432**	0.236**	0.255**
4	-0.440**	-0.223**	-0.406**	-0.435**	-0.479**	4	-0.300*	-0.217**	-0.166*	-0.142*	-0.336**
5	0.262	0.352**	0.257**	0.251**	0.065	5	0.021	0.089	0.019	0.080	-0.046
6	-0.136	0.077	0.086	-0.102	-0.124	6	-0.190	-0.063	-0.067	-0.072	-0.280**
7	-0.386**	-0.355**	-0.467**	-0.491**	-0.359**	7	0.484**	0.461**	0.269**	0.298**	0.039
8	-0.337*	-0.154*	-0.239**	-0.189**	-0.243**	8	0.296*	0.456**	0.324**	0.153*	-0.164*
9	0.373*	0.238**	0.282**	0.150*	0.010	9	0.057	0.210**	0.035	-0.048	-0.088
10	-0.008	0.346**	0.045	0.166*	0.151*	10	-0.079	0.395**	-0.092	0.018	-0.033
11	-0.094	0.179*	0.286**	0.036	-0.128	11	0.043	0.211**	0.342**	0.286**	0.125
12	-0.131	-0.090	0.073	-0.133	0.079	12	0.307*	0.267**	0.246**	0.141*	0.034
13	0.278	0.416**	0.336**	0.211**	0.001	13	-0.045	-0.017	0.298**	0.061	0.069
14	-0.092	0.166*	0.141*	-0.023	-0.249**	14	0.223	0.141*	-0.128	0.303**	-0.244**
15	0.345*	0.208**	0.099	0.263**	-0.105	15	0.540**	0.423**	0.225**	0.203**	-0.184*
16	-0.496**	-0.222**	-0.315**	-0.339**	-0.240**	16	0.053	0.288**	-0.165*	0.073	-0.238**
17	0.005	-0.078	0.055	0.164*	-0.118	17	-0.073	0.182*	-0.061	0.013	-0.227**
18	0.330*	0.194**	0.061	0.133	-0.231**	18	0.539**	0.473**	0.365**	0.245**	0.179*
						19	0.024	-0.187**	0.014	-0.273**	-0.288**
						20	-0.360*	0.161*	0.100	0.112	-0.155*
						21	-0.336*	-0.165*	-0.264**	-0.183*	-0.189**
						22	0.876**	0.588**	0.476**	0.487**	0.124

* $P<0.05$ ** $P<0.01$.

2.3.3 OPLS 分别将正、负离子模式下共有峰相对峰面积与 W/D、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MPO 数据导入 SIMCA 14.1 版软件，构建 OPLS 模型进行分析，模型验证显示，共有峰相对峰面积与各药效指标间建立的 OPLS 模型 R^2_X 、 R^2_Y 、 Q^2 均大于 0.5，表明模型拟合度良好，可用于后续预测分析。采用

OPLS 模型分别对正、负离子模式下共有峰相对峰面积与各药效指标进行关联分析，得到标准化回归系数及变量投影重要性（variable projection importance, VIP），其中 VIP 值用于评估自变量对因变量的贡献程度。通常以 $VIP > 1$ 作为影响显著性的判别标准。结果见图 6、7，以 $VIP > 1$ 和具有



A-W/D, B-TNF- α , C-IL-6, D-IL-1 β , E-MPO, 图 7 同。

A-W/D, B-TNF- α , C-IL-6, D-IL-1 β , E-MPO, same as fig. 7.

图 6 正离子模式下 OPLS 回归分析的标准化回归系数图和 VIP 图

Fig. 6 Standardized regression coefficient chart and VIP chart for OPLS regression analysis in positive ion mode

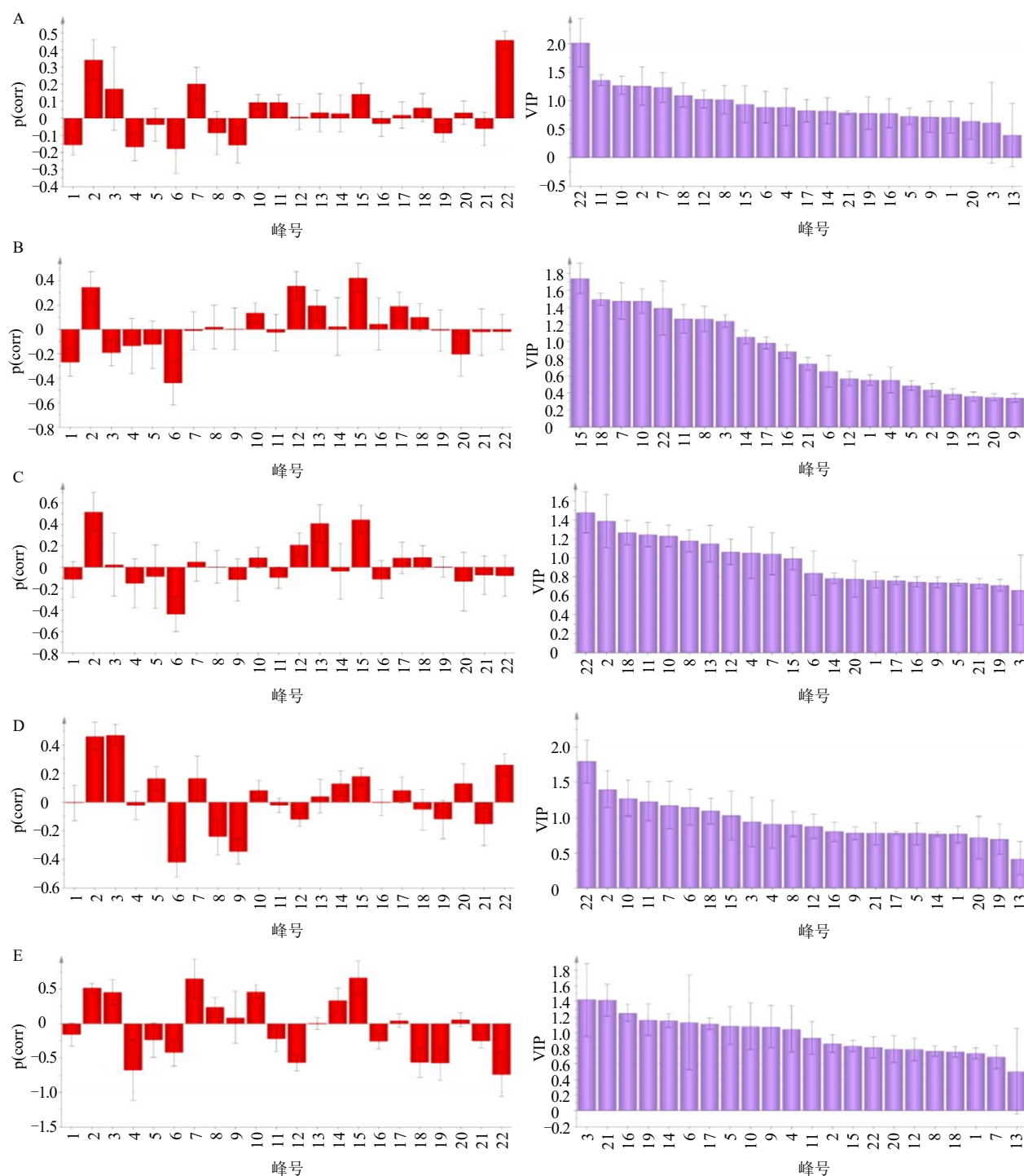


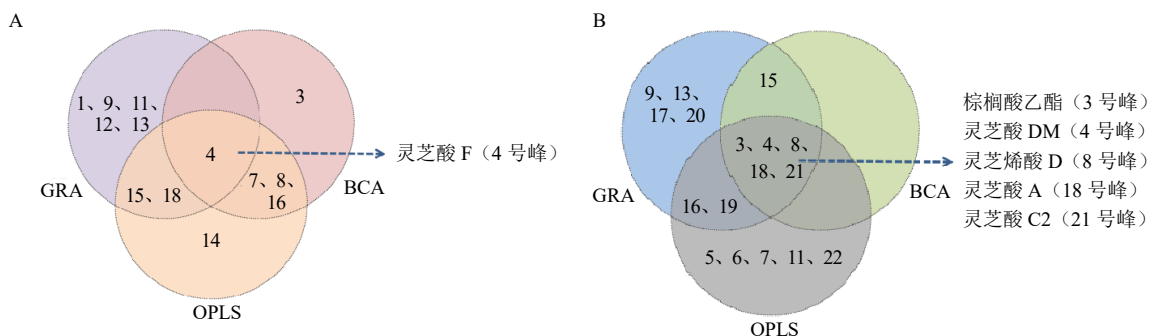
图 7 负离子模式下 OPLS 回归分析的标准化回归系数图和 VIP 图

Fig. 7 Standardized regression coefficient chart and VIP chart for OPLS regression analysis in negative ion mode

负相关性为筛选标准, 综合分析得到正离子模式下 4、7、8、14~16、18 号峰和负离子模式下 3~8、11、16、18、19、21、22 号峰具有更为突出的表现。

将上述 3 种方法所得结果进行综合分析, 由图 8 可知正离子模式下 4 号峰和负离子模式下 3、4、

8、18、21 号峰与药效指标高度相关。结合表 2 共有峰指认结果最终确定灵芝干预 ALI 作用的潜在 Q-Marker 为灵芝酸 F (正离子 4 号峰)、棕榈酸乙酯 (负离子 3 号峰)、灵芝酸 DM (负离子 4 号峰)、灵芝烯酸 D (负离子 8 号峰)、灵芝酸 A (负离子 18 号峰)、灵芝酸 C2 (负离子 21 号峰)。



GRA 以关联度大于均值为筛选标准; BCA 以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 为筛选标准; OPLS 以 $VIP > 1$ 为筛选标准。

GRA uses correlation greater than mean as screening criterion; BCA uses $P < 0.05$ and $P < 0.01$ as screening criteria; OPLS uses $VIP > 1$ as screening criterion.

图 8 正 (A)、负 (B) 离子模式下 Q-Marker 筛选结果

Fig. 8 Screening results of Q-Marker in positive (A) and negative (B) ion modes

2.4 潜在 Q-Marker 含量测定

2.4.1 对照品溶液的制备 精密称取上述 6 个 Q-Marker 对照品适量, 于甲醇中充分溶解, 制成灵芝酸 F (0.248 mg/mL)、棕榈酸乙酯 (0.1 mg/mL)、灵芝酸 DM (0.042 mg/mL)、灵芝烯酸 D (0.044 mg/mL)、灵芝酸 A (0.304 mg/mL)、灵芝酸 C2 (0.068 mg/mL) 混合对照品储备液。

2.4.2 供试品溶液的制备 选取药效较好的 S12 样品进行 6 个潜在 Q-Marker 的含量测定, 按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液。

2.4.3 色谱、质谱条件

(1) 色谱条件: Waters Acquity UPLC® BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 灵芝酸 F、灵芝酸 DM、灵芝烯酸 D、灵芝酸 A、灵芝酸 C2 的流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 棕榈酸乙酯的流动相为含 2 mmol/L 甲酸铵溶液的 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~2 min, 65%~50% A; 2~4 min, 50%~30% A; 4~5 min, 30%~5% A; 5~6 min, 5% A; 6~7 min, 5%~65% A; 7~9 min, 65% A。柱温 35 °C; 体积流量 0.3 mL/min; 进样量 3 μL。

(2) 质谱条件: ESI 离子源, 正、负离子模式下扫描, 毛细管电压为 3.0 kV, 源温度为 350 °C, 雾化气温度为 500 °C, 雾化气体积流量为 650 L/h, 锥孔气体积流量为 50 L/h, 采用多反应监测模式 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描, 待测成分的定量离子对及参数设置见表 5。

2.4.4 线性关系 精密量取“2.4.1”项下制备的混合对照品储备液, 以倍数稀释法进行稀释, 得到不同质量浓度的对照品溶液, 按“2.4.3”项下条件进行分析。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 相应峰面积为纵坐标 (Y), 计算供试品溶液中各待测成分的标准曲线方程, 结果见表 6。

2.4.5 方法学考察

(1) 精密度试验: 取供试品溶液, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 灵芝酸 F、灵芝酸 DM、灵芝烯酸 D、灵芝酸 A、灵芝酸 C2、棕榈酸乙酯峰面积的 RSD 为: 1.12%、1.56%、1.88%、1.89%、2.40%、2.31%, 表明仪器精密度良好。

(2) 重复性试验: 平行制备 6 份供试品溶液分别进样检测, 记录峰面积, 计算灵芝酸 F、灵芝酸 DM、灵芝烯酸 D、灵芝酸 A、灵芝酸 C2、棕榈酸

表 5 各化合物的最优 MRM 参数

Table 5 Optimal MRM parameters of analytes

化合物	模式	离子对 (m/z)	锥孔能量/V	碰撞能量/V
灵芝酸 F	$[M-H]^-$	569.28~551.28	38	20
灵芝酸 DM	$[M-H]^-$	467.32~423.32	65	35
灵芝烯酸 D	$[M-H]^-$	511.27~493.27	45	18
灵芝酸 A	$[M-H]^-$	515.30~497.30	65	30
灵芝酸 C2	$[M-H]^-$	517.32~499.32	40	25
棕榈酸乙酯	$[M+NH_4]^+$	302.26~284.26	55	20

表 6 各对照品线性关系

Table 6 Linear relationship of reference substance

化合物	线性方程	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	<i>r</i>
灵芝酸F	$Y=1.0\times 10^6 X+15\ 323$	0.003 9~0.248 0	0.999 3
灵芝酸DM	$Y=3.3\times 10^5 X+228.3$	0.000 7~0.042 0	0.999 3
灵芝烯酸D	$Y=5.0\times 10^6 X+1\ 514.4$	0.000 7~0.044 0	0.999 3
灵芝酸A	$Y=4.9\times 10^5 X+13\ 754$	0.004 8~0.304 0	0.999 1
灵芝酸C2	$Y=4.0\times 10^5 X+432.1$	0.001 1~0.068 0	0.999 1
棕榈酸乙酯	$Y=1.033\ 1\times 10^4 X+288.9$	0.001 6~0.100 0	0.999 1

乙酯含量的 RSD 为 2.19%、1.99%、1.95%、2.23%、1.97%、1.95%，表明该方法重复性良好。

(3) 稳定性试验：取供试品溶液，分别在 0、6、12、18、24 h 进样检测，记录峰面积，计算灵芝酸 F、灵芝酸 DM、灵芝烯酸 D、灵芝酸 A、灵芝酸 C2、棕榈酸乙酯含量的 RSD 为 1.58%、1.51%、1.57%、1.74%、1.72%、2.58%，表明在 24 h 内供试品溶液稳定性良好。

(4) 加样回收率试验：精密称取已测定含量的 S12 样品 6 份，按 1:1 比例加入 6 种目标成分对照品，按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液分别进样检测，记录峰面积，计算各成分的加样回收率和 RSD。灵芝酸 F、灵芝酸 DM、灵芝烯酸 D、灵芝酸 A、灵芝酸 C2、棕榈酸乙酯平均加样回收率为 96.74%、97.48%、97.37%、97.89%、99.87%、96.95%，RSD 为 1.98%、1.36%、1.33%、2.01%、1.79%、2.25%。

2.4.6 含量测定 取供试品溶液，按“2.4.3”项下方法检测，根据线性方程计算得到灵芝酸 F 的质量分数为 $(1.087\ 0\pm 0.012\ 2)\text{ mg/g}$ ，灵芝酸 DM 的质量分数为 $(0.211\ 3\pm 0.003\ 3)\text{ mg/g}$ ，灵芝烯酸 D 的质量分数为 $(0.186\ 3\pm 0.003\ 5)\text{ mg/g}$ ，灵芝酸 A 的质量分数为 $(1.328\ 2\pm 0.025\ 1)\text{ mg/g}$ ，灵芝酸 C2 的质量分数为 $(0.371\ 0\pm 0.008\ 9)\text{ mg/g}$ ，棕榈酸乙酯的质量分数为 $(0.367\ 8\pm 0.008\ 5)\text{ mg/g}$ 。

3 讨论

ALI 是临床高发的呼吸系统疾病，以肺部失控性炎症级联反应为核心病理特征。目前临床常规治疗方案仍存在不良反应明显、特异性不足等局限，难以从根源上阻断 ALI 的病理进程，因此，研发安全高效的天然抗炎药物，对该病的早期预防与精准干预具有重要的临床价值与现实意义。灵芝作为传统扶正固本经典中药材，现代药理学研究已证实其具有确切的抗炎、抗氧化及呼吸系统保护作用，在 ALI 的防治与新药研发领域拥有良好的开发潜力与

应用前景。《中国药典》2025 年版对灵芝的质量控制仅以多糖、总三萜等宏观指标为依据，本研究前期已对不同产地灵芝样本进行基原鉴定，确证均为正品药材；但正离子模式下化学指纹图谱分析显示，不同产地灵芝样品的相似度偏低，提示产地差异对灵芝内在化学成分具有显著影响。上述结果表明，仅依靠多糖、总三萜等宏观指标开展灵芝质量评价，无法客观、真实地反映药材内在品质，更难以实现化学成分与专属药效特征的精准关联，进而无法科学评价灵芝干预 ALI 的真实药用价值。究其原因，灵芝中富含结构多样的灵芝三萜及甾醇类成分，不同产地药材虽总三萜含量相近、可满足现行药典质量标准，但三萜及甾醇类成分的具体组成、种类与相对含量存在显著差异，这可能是正品灵芝药材指纹图谱中表现出明显差异性的重要原因。基于此，本研究将 15 批图谱相似度各异的样品全部纳入“物质-功效”关联分析，同时整合 GRA、BCA、OPLS 3 种互补的多元统计方法进行交叉验证。样本间化学成分丰度的梯度差异直观体现为指纹图谱相似度差异，该特征可扩大“物质-功效”数据集的动态范围，既不会干扰共有峰的定性指认，也不影响关联分析的统计学有效性，反而能够提升潜在 Q-Marker 筛选的代表性与普适性。最终筛选得到的核心成分均为各批次灵芝共有成分，且与 ALI 药效呈强相关性，可规避部分样品低相似度引发的筛选偏差。后续研究可将指纹图谱相似度作为灵芝产地适用性初筛指标，对不同产地 6 个潜在 Q-Marker 展开含量测定，明确相似度差异与 6 个潜在 Q-Marker 含量组成之间的相关性，进一步佐证本研究构建的灵芝抗 ALI 潜在 Q-Marker 筛选体系的科学性与可靠性。

本研究前期通过预实验系统考察了灵芝低、中、高剂量[2.0、4.0、8.0 g/(kg·d)]对 ALI 模型小鼠的干预作用，以肺水肿程度及血清、BALF 中关键炎症指标(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MPO)为评价依

据,结果显示灵芝对小鼠 ALI 的保护作用呈明显剂量相关性,随给药剂量升高,抗炎及肺保护效果逐渐增强,其中中、高剂量组均可显著抑制促炎因子的过度释放;组织病理学观察进一步证实,各剂量组均能不同程度改善 LPS 诱导的肺组织损伤。综合药效强度与安全性评价,高剂量组干预效果最为突出,且实验期间未观察到明显毒性反应,故选定该剂量作为本研究正式实验的给药剂量,确保后续药效结果稳定可测、数据可靠。

ALI 的病理机制并非单纯的局部炎症反应,其核心病理闭环由 3 大环节相互交织构成:一是 LPS 等诱因激活巨噬细胞、肺泡上皮细胞,诱发 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等促炎介质爆发性释放,形成“细胞因子风暴”,直接导致肺泡上皮/内皮屏障损伤、血管通透性升高,引发肺水肿^[20];二是过度炎症激活还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4),诱发肺组织氧化应激失衡,活性氧大量累积进一步放大炎症损伤,形成“氧化-炎症恶性循环”^[21];三是肺部固有免疫稳态被打破,中性粒细胞过度浸润、MPO 活性异常升高,加重肺组织结构破坏^[22]。灵芝酸 A、灵芝酸 F、灵芝酸 DM、灵芝酸 C2、灵芝烯酸 D 可通过抑制炎症介质释放发挥抗炎效应,是灵芝成分中的核心抗炎组分^[23-24];其中,灵芝酸 A 还可通过调控 Rho/ROCK/核因子- κ B 信号通路,改善 LPS 诱导的小鼠肺组织病理损伤,抑制氧化应激失衡与炎症因子风暴^[25];同时该类成分还可下调细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 等黏附分子表达,减少中性粒细胞向肺组织的募集,间接减轻继发性免疫损伤^[26]。灵芝酸 C2 与灵芝烯酸 D 侧重调控氧化应激轴:二者可特异性抑制 NOX4 的表达与活性,减少活性氧生成,同时激活蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 信号通路,提升超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶等内源性抗氧化酶活性,既可减轻氧化应激诱导的肺泡上皮细胞脂质过氧化损伤,又可阻断 ROS 诱导的 NLRP3 炎症小体激活,有效切断“氧化-炎症恶性循环”^[27-28]。棕榈酸乙酯则主要发挥固有免疫调节作用:其可下调 MPO 活性,抑制中性粒细胞的异常活化与脱颗粒,减少 MPO 介导的肺组织蛋白及脂质损伤,同时可调控肺泡巨噬细胞由促炎的 M1 型向抗炎的

M2 型极化,维持肺部免疫稳态,规避免疫过度激活诱发的继发性损伤^[29]。综上,本研究筛选获得的 6 个潜在 Q-Marker 可能是灵芝发挥 ALI 保护作用的关键物质基础。上述成分并非独立起效,而是通过通路交叉调控形成协同效应,共同介导 ALI 保护作用。后续还需进一步展开 6 个潜在 Q-Marker 抗 ALI 的机制研究,解析其调控网络与互作机制。

本研究虽成功筛选出灵芝干预 ALI 的潜在 Q-Marker,仍存在一定研究局限,有待后续完善。其一,对筛选得到的 6 个核心成分,尚未开展体外、体内独立活性验证,无法明确各单体成分的药效贡献度,亦难以阐明不同成分间的作用主次及协同调控机制。本研究选取药效最优的黑龙江牡丹江灵芝为代表,完成 6 个潜在 Q-Marker 的定量检测,结果显示灵芝酸 A 含量最高、灵芝烯酸 D 含量最低,各成分含量差异显著;后续课题组将依据含量测定结果进行分子配伍,采用成分“敲除”策略系统开展活性验证,明确各成分的贡献度与协同作用。其二,本研究重点聚焦灵芝三萜等小分子成分,未纳入灵芝标志性活性成分灵芝多糖的分析与探究。灵芝多糖是灵芝发挥免疫调节、抗炎、抗氧化作用的关键药效组分^[30-31],同样有可能参与 ALI 的损伤修复过程,遗漏多糖成分导致本研究无法完整阐释灵芝改善 ALI 的整体物质基础。针对上述不足,后续可在现有研究结论基础上,补充灵芝多糖的提取、检测与药效关联分析,探究多糖与其它类成分的协同抗炎效应,进一步完善灵芝干预 ALI 的物质基础研究体系,为其质量控制优化与临床精准用药提供更全面的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 丁乐乐,姜永红. 中药调控铁死亡干预急性肺损伤作用机制研究进展 [J]. 中成药, 2026, 48(4): 1221-1230.
- [2] 路晨奕,杨欣怡,钱海兵,等. 白花蛇舌草水提物对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的抗炎机制研究 [J]. 药物评价研究, 2026, 49(4): 1190-1198.
- [3] 谢苏薇,曾涛,王汛江,等. 谢苏薇,曾涛,王汛江,等. 防风色原酮 19A 通过激活 FXR 抑制 NF- κ B 通路改善小鼠急性肺损伤 [J]. 药学学报, 2026, 61(7): 2502-2513.
- [4] Zhao Z N, Zhu P J, Lou Y, *et al.* Receptor-interacting protein kinase 3-mediated modulation of endothelial cell necroptosis and mitochondrial dysfunction through AMPK/Drp1 signaling pathway: Insights into the pathophysiological mechanisms of lipopolysaccharide-

- induced acute lung injury [J]. *Int J Med Sci*, 2025, 22(1): 71-86.
- [5] Fu X, Dong J W, Yang J, *et al*. Identification and validation of oxidative stress-related genes for the diagnosis of sepsis-induced acute lung injury [J]. *PLoS One*, 2025, 20(7): e0327945.
- [6] 姚安洁, 饶晗钰, 王冰冰, 等. 急性肺损伤鼠类模型的研究进展 [J]. 同济大学学报: 医学版, 2022, 43(5): 749-756.
- [7] 刘燕, 徐磊, 史玉柱, 等. 基于 NLRP3 炎症通路探讨滨蒿提取物对急性肺损伤小鼠的保护作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(16): 5837-5846.
- [8] 余剑波, 史佳. 脓毒症急性肺损伤的中西医结合治疗概述 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2023, 29(5): 573-578.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 202-204.
- [10] 迟羽淳, 蒋鑫, 刘树民. 灵芝调节免疫系统疾病研究进展及质量标志物预测 [J]. 中国现代应用药理学, 2026, 43(1): 170-180.
- [11] 张静, 袁抒捷, 罗文慧, 等. 灵芝本草考证 [J]. 中成药, 2026, 48(3): 933-939.
- [12] Luo J C, Xu B L, Hu Y, *et al*. Analysis of chemical constituents in *Ganoderma tsugae* Murr. by UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Nat Prod Res*, 2025, doi: 10.1080/14786419.2025.2575127.
- [13] 乐膜铎, 丁淑敏, 陈长勇, 等. 基于色谱鉴别和含量测定的灵芝质量评价 [J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(9): 4438-4444.
- [14] Pozzobon R G, Rutkevski R, de Lima L S, *et al*. Anti-inflammatory potential of *Ganoderma lucidum* triterpenes: A systematic review and Meta-analysis of preclinical evidence [J]. *Pharmaceuticals*, 2026, 19(1): 188.
- [15] Karunarathna S C, Ediriweera A, Prasannath K, *et al*. Exploring the health benefits of *Ganoderma*: Bioactive compounds and mechanisms of action; immunomodulatory, and anti-tumour activities [J]. *New Zeal J Bot*, 2025, 63(5): 2325-2409.
- [16] Zhang T J, Bai G, Liu C X. Innovation theory, technical methods and industrial application of quality marker of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(1): 84-86.
- [17] 中华中医药学会《中药质量标志物研究技术指南》编写组. 中药质量标志物研究技术指南 [J]. 中草药, 2025, 56(7): 2249-2252.
- [18] 胡爽, 花镇东, 黄钰, 等. 超高效合相色谱-质谱技术对芬太尼类物质异构体的快速分离和检测 [J]. 分析化学, 2022, 50(6): 964-972.
- [19] 杨光勇, 沙丽娜, 梁秋艳, 等. QuEChERS-超高效合相色谱-串联质谱法测定化妆品中 45 种糖皮质激素 [J]. 分析实验室, 2021, 40(8): 959-965.
- [20] 甄建华, 于河, 谷晓红. 细胞因子风暴中医辨证要点解析 [J]. 北京中医药大学学报, 2023, 46(6): 763-769.
- [21] 邹康. EGR1 调控 KLF5 在 LPS 诱导的急性肺损伤的作用及机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2024.
- [22] 黎义炬, 吉登军, 刘建博. 基于数据挖掘和网络药理学的急性肺损伤用药规律及作用机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2026, 37(1): 189-198.
- [23] Akihisa T, Nakamura Y, Tagata M, *et al*. Anti-inflammatory and anti-tumor-promoting effects of triterpene acids and sterols from the fungus *Ganoderma lucidum* [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(2): 224-231.
- [24] Zhao R L, He Y M. Network pharmacology analysis of the anti-cancer pharmacological mechanisms of *Ganoderma lucidum* extract with experimental support using Hepa1-6-bearing C57 BL/6 mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 210: 287-295.
- [25] Wan B, Li Y, Sun S S, *et al*. Ganoderic acid A attenuates lipopolysaccharide-induced lung injury in mice [J]. *Biosci Rep*, 2019, 39(5): BSR20190301.
- [26] 金敏, 崔玉龙, 李梦琦, 等. 灵芝酸结构、药理作用及机制研究进展 [J]. 中国现代应用药理学, 2025, 42(3): 500-510.
- [27] Yang S P, Dai X L, Ji W L, *et al*. Protective effects of ganoderic acid C2 from *Ganoderma lucidum* against aflatoxin B1-induced splenorenal injury: Inhibition of NOX4-mediated oxidative stress and inflammation [J]. *J Environ Sci*, 2026, 169: 277-293.
- [28] 陈奕君, 杨小梅, 林丽华. 赤灵芝的营养成分、生物活性及其应用研究进展 [J]. 食品与机械, 2024, 40(6): 227-232.
- [29] Saeed N M, El-Demerdash E, Abdel-Rahman H M, *et al*. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 264(1): 84-93.
- [30] 张若冰, 杨玉赫, 李陈雪, 等. 灵芝多糖药理作用及机制的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(5): 879-887.
- [31] 罗虹建, 鲁国东, 林占熿, 等. 灵芝主要活性成分药理作用及生物合成研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(9): 3366-3379.

[责任编辑 李亚楠]