破壁灵芝孢子粉促进溃疡愈合的潜在药效物质筛选研究

刘娟 王嘉祺 李园 丛钰艺 关晓兵
首都医科大学附属北京口腔医院，首都医科大学口腔医学院，北京 100071

[摘要] **目的** 筛选破壁灵芝孢子粉（BGLSP）促溃疡愈合的潜在药效物质并行活性验证。**方法** 结合网络药理学与分子对接筛选BGLSP的潜在活性成分，并通过细胞计数试剂盒（CCK）-8法、细胞划痕实验及大鼠口腔溃疡模型进行活性验证。**结果** BGLSP中的25种化合物经多靶点、多通路发挥促愈合作用，经分子对接筛选出7种化合物，根据其在BGLSP中的相对含量，确定灵芝酸A（GAA）与灵芝酸G（GAG）为BGLSP中促进溃疡愈合的潜在药效物质。GAA及GAG低浓度时无细胞毒性，GAA呈浓度依赖性促进人牙龈成纤维细胞（HGFs）迁移，GAG仅在2.5 μmol/L时具有促迁移作用。GAA与GAG均可促进大鼠口腔溃疡胶原沉积与血管生成，加快口腔溃疡愈合；GAA的促愈合作用早期以低浓度为佳，后期以高浓度更优，GAG呈现浓度依赖性的促进作用。**结论** BGLSP经多成分-多靶点-多通路协同作用促进溃疡愈合，其中GAA和GAG作为BGLSP的潜在药效物质，在口腔溃疡早期愈合中发挥重要作用。

[关键词] 破壁灵芝孢子粉； 灵芝酸A； 灵芝酸G； 口腔溃疡； 网络药理学
[中图分类号] R988.2 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/hxkq.2026136

本文链接 开放科学标识码

Screening of potential bioactive constituents in wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder for promoting ulcer healing

Liu Juan, Wang Jiaqi, Li Yuan, Cong Yuyi, Guan Xiaobing
Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, School of Stomatology, Capital Medical University, Beijing 100071, China
Correspondence: Guan Xiaobing, E-mail: guanxbing@mail.ccum.edu.cn

[Abstract] **Objective** To screen and validate the activity of potential therapeutic substances in wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder (BGLSP) for promoting ulcer healing. **Methods** The potential active components of BGLSP were screened through network pharmacology combined with molecular docking and verified via the cell counting kit (CCK)-8 assay, cell scratch assay, and a rat oral ulcer model. **Results** Network pharmacology revealed that 25 compounds in BGLSP exert prohealing effects through multiple targets and pathways. Molecular docking identified seven compounds with strong binding affinity. On the basis of their relative contents in BGLSP, ganoderic acid A (GAA) and ganoderic acid G (GAG) were identified as the key potential active constituents promoting ulcer healing. At low concentrations, GAA and GAG showed no cytotoxicity. GAA promoted the migration of human primary gingival fibroblasts in a concentration-dependent manner, whereas GAG showed a promotive effect only at 2.5 μmol/L. GAA and GAG enhanced collagen deposition and angiogenesis in rat oral ulcers, accelerating healing. GAA demonstrated a good effect at low concentrations in the early stage of ulcer healing but a superior effect at high concentrations in the later stage of ulcer healing, whereas GAG exhibited a concentration-dependent promotive effect. **Conclusion** BGLSP promotes ulcer healing through multicomponent, multitarget, and multipathway synergistic effects. GAA and GAG, as potential active constituents of BGLSP, play important roles in the early healing of oral ulcers.

[Key words] wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder; ganoderic acid A; ganoderic acid G; oral ulcer; network pharmacology

[收稿日期] 2026-04-14
[第一作者] 刘娟，硕士，E-mail：1820181512@qq.com
[通信作者] 关晓兵，主任医师，博士，E-mail：guanxbing@mail.ccum.edu.cn

口腔溃疡是临床上最常见的口腔黏膜病损之一，在普通人群中的患病率为5%~25%[1]。该病损伴有明显疼痛，严重影响患者的进食、言语和生活质量。其发病是局部创伤、遗传因素、营养缺乏、病毒和细菌感染以及免疫紊乱等多因素互相作用的结果[2]，临床治疗以调节免疫、抗炎，镇痛和促进愈合为主，但目前治疗方法存在个体差异及不良反应。因此，寻找能够多靶点干预、安全性高的药物具有重要临床意义。

中药具有多成分、多靶点治疗疾病的特点，在防治口腔溃疡方面展现独特优势。灵芝作为传统名贵药材，在《神农本草经》中被列为上品，久服无毒。灵芝孢子是灵芝的生殖细胞[3]，其破壁后获得的破壁灵芝孢子粉（wall-broken *Ganoderma lucidum* spore powder，BGLSP）富含多糖、三萜类等多种活性成分。中医理论认为，BGLSP味甘、性平，归心、肺、脾、肾经，具有扶正固本、健脾益气的功效[4]。现代药理学研究证实，BGLSP的三萜类成分具有抗炎活性，可缓解溃疡性结肠炎小鼠的炎症，改善小鼠急性胃黏膜损伤[5-6]。多糖类可显著调节促炎和抗炎细胞因子，缓解小鼠溃疡性结肠炎；提高成纤维细胞的存活率及迁移能力，增强血管生成及胶原蛋白沉积，促进小鼠皮肤伤口的愈合[7-9]。灵芝孢子油含有脂肪酸、灵芝三萜、甾醇及其他生物活性，局部使用可加速皮肤烧伤伤口愈合[10]。这些特性提示BGLSP在促进组织修复方面拥有巨大潜力。

BGLSP的多种活性成分被证实具有促进皮肤溃疡愈合的作用，但口腔黏膜与皮肤在解剖结构、微环境和免疫等方面存在显著差异[11-12]，目前尚无研究探讨BGLSP在口腔溃疡的作用及机制。因此，为了阐明BGLSP的潜在药效物质基础及其对口腔溃疡的治疗潜力，本研究主要采用网络药理学、分子对接筛选BGLSP促进溃疡愈合的潜在药效物质，继而在细胞层面和大鼠口腔溃疡模型上进行活性验证。为后续深入阐明BGLSP的药效物质基础及作用机制奠定基础。

1　材料和方法

1.1　主要材料

30只SPF级雄性SD大鼠，6周龄，购自斯贝福（北京）实验动物科技有限公司。人牙龈成纤维细胞（human primary gingival fibroblasts，HGFs）购自美国模式培养物集存库。

细胞计数试剂盒（cell counting kit，CCK）-8（苏州新赛美生物科技有限公司）、重组牛碱性成纤维细胞生长因子（recombinant bovine basic fibroblast growth factor，rb-bFGF）凝胶（珠海亿胜生物制药有限公司），Masson三色染色、改良天狼猩红（sirius red，SR）染色试剂盒、抗Ki-67小鼠单克隆抗体、重组抗-CD31抗体兔单克隆抗体（武汉赛维尔生物科技有限公司）、冰醋酸（国药集团化学试剂有限公司）、灵芝酸（ganoderic acid，GA）A、G（MedChemExpress公司，美国）。

1.2　方法

1.2.1　BGLSP潜在药效物质筛选

1）活性成分靶点收集：经液相色谱-质谱联用（liquid chromatograph-mass spectrometer，LC-MS）鉴定、筛选出BGLSP中与溃疡愈合相关的58种活性成分，将其SMILES输入到Swiss Target Prediction数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/）平台，获得活性成分Probability>0.1的作用靶点。

2）疾病靶点的收集：分别以“ulcer”为检索词，在GeneCard数据库（https://www.genecards.org/）、OMIM数据库（https://www.omim.org/）、Therapeutic Target数据库（https://ttd.idrblab.cn/）检索获得疾病靶点，去除重复值后，取并集。采用Venny 2.1.0软件将成分靶点和疾病靶点进行映射，获得交集靶点。

1.2.2　蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络的构建

将上述交集靶点导入到STRING数据库（https://cn.string-db.org/），物种选择为“Homo sapiens”获取PPI网络数据，下载相应tsv文件，并将数据导入到Cytoscape3.9.1和Cytoscape3.7.0软件绘制PPI网络图，利用Network Analyzer插件进行拓扑分析，其中度值用于量化特定节点在网络中与其他节点直接连接的数量。

1.2.3　基因本体（gene ontology，GO）分析、京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）富集分析

登录David数据库（https://davidbioinformatics.nih.gov/），限定物种为“Homo sapiens”，上传上述交集靶点，进行GO分析与KEGG富集分析，并筛选关注的核心通路。GO分析主要包括3个模块：生物过程（biological process，BP）、细胞组分（cell component，CC）和分子功能（molecular function，MF），采用微生信在线平台将前10的数据富集结果可视化。KEGG筛选出来前20种核心

通路用气泡图表示，通路富集的靶点数量由节点的大小表示，*P*值的大小由节点的颜色反映，节点的颜色由红到绿表示*P*值由小到大，颜色越红，表示该通路越显著富集。

1.2.4 活性成分-靶点-核心通路网络的构建

以药物活性成分、成分与疾病的交集靶点、核心通路为节点，建立相互作用关系，编写相应Network和Type的Excel文件，并导入Cytoscape3.9.1软件构建活性成分-靶点-核心通路网络，利用CytoNCA APP插件进行拓扑学分析。

1.2.5 分子对接技术预测BGLSP成分与靶点结合能力

选取活性成分-靶点-核心通路网络中度值≥2的11种活性成分进行分子对接。从TCMSP（https://www.tcmsp-e.com/tcmsp.php）下载活性成分的3D结构，从PDB数据库（https://www.rcsb.org/）中获取度值排名前15靶点的蛋白结构，通过PyMol 2.5.1（Schrödinger公司，美国）及Autodock Tools（Scripps研究所，美国）处理蛋白和小分子配体。采用Autodock Vina（Scripps研究所，美国）进行分子对接，计算结合能，结合能小于−7 kcal/mol时记为强结合。使用GraphPad Prism 9.5.1软件将全部结果绘制热图，使用PyMol 2.5.1将部分对接结果可视化。以上数据库使用时间为2024年7月—2025年1月。

1.3 体外实验活性验证

1.3.1 CCK-8实验

HGFs用含有10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素的DMEM完全培养基培养，在96孔板中以1×10^4细胞/孔接种，孵育24 h。次日分别加入含浓度为0、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L GAA和GAG的完全培养基，每组设置6个复孔，同时设置6个仅含培养基的空白对照孔，孵育24 h。弃原培养基，每个孔加入90 μL无血清培养基+10 μL CCK-8液，避光孵育30~60 min。酶标仪检测OD值，波长450 nm。对照组细胞的存活率设定为100%。细胞活性=[（药物干预组OD值−空白孔OD值）/（对照组OD值−空白孔OD值）]×100%。

1.3.2 划痕实验

将HGFs细胞以8×10^5个/孔的密度接种于6孔板，使用DMEM培养基培养24 h。待细胞融合度达约90%时，用1 mL加样枪头在每孔中央区域均匀划3条平行划痕，PBS轻柔冲洗去除脱落细胞。随后分别加入含0、1、2.5、5、10 μmol/L GAA或GAG的无血清培养基继续培养。在0、24、48 h拍摄划痕图像，用ImageJ计算划痕部位面积，细胞迁移率=[（0 h划痕部位面积−24 h或48 h划痕部位面积）/0 h划痕部位面积]×100%。

1.4 体内实验活性验证

1.4.1 醋酸诱导的大鼠口腔溃疡模型构建及试验分组

30只6周龄的SPF级雄性SD大鼠用异氟烷诱导并维持麻醉后，将浸泡在70%醋酸溶液中的圆形滤纸（直径5 mm）置于舌背黏膜上3 min，诱导口腔溃疡的形成。24 h后溃疡形态稳定，记为实验第1天。将大鼠随机分为6组，每组5只，Control组：局部涂抹空白凝胶；rb-bFGF组：局部涂抹rb-bFGF凝胶；GAA低浓度（GAA-L）组：局部涂抹含0.25 mg/mL GAA的凝胶；GAA高浓度（GAA-H）组：局部涂抹含1 mg/mL GAA的凝胶；GAG低浓度（GAG-L）组：局部涂抹含0.25 mg/mL GAG的凝胶；GAG高浓度（GAG-H）组：局部涂抹含1 mg/mL GAG的凝胶。所有组涂抹厚度均约1 mm、Qd。每日观察大鼠情况，若出现严重感染，及时处死大鼠。第5天结束实验，麻醉处死大鼠。

1.4.2 口腔溃疡愈合率计算

每天观察大鼠溃疡愈合情况并拍照，采用ImageJ软件计算溃疡面积，愈合率（%）=（初始溃疡面积−不同时间溃疡面积）/初始溃疡面积×100%。

1.4.3 溃疡组织的病理学检测

取固定后的口腔溃疡组织，经乙醇梯度脱水、石蜡包埋，制备5 μm厚的切片，分别进行以下染色。1）苏木精-伊红（hematoxylin and eosin，HE）染色：切片脱蜡水化后，行常规HE染色，脱水、透明、封片，光学显微镜下观察组织形态学结构。2）Masson染色：切片脱蜡水化，加Masson A液（Weigert铁苏木素）于65 ℃染核30 min，随后以Masson B液与Masson C液等体积混合液浸染，室温下1 min；分化后再以Masson D液（苯胺蓝）室温浸染6 min，依次经Masson E液（室温，1 min）和Masson F液（室温，2~30 s）处理后漂洗分化，最后以无水乙醇漂洗脱水、透明、封片，光学显微镜下观察胶原纤维分布。3）SR染色：切片脱蜡水化，浸于改良SR A液于65 ℃下作用30 min；转入改良SR B液浸染，室温浸染2 min；再转入改良SR C液，室温浸染1 h，随后脱水、透明、封片，于光学显微镜和偏光显微镜（polaized light microscopy，PLM）观察胶原纤维。SR染色

结果判读：光学显微镜下，胶原纤维红色，背景黄色；PLM下，Ⅰ型胶原呈橘黄色或亮红色的粗纤维，Ⅲ型胶原呈绿色的细纤维。

1.4.4　溃疡组织的免疫组化染色

口腔溃疡组织脱蜡水化，柠檬酸盐缓冲液（pH 6.0）99 ℃水浴修复抗原20 min，恢复至室温，3% H_2O_2阻断内源性过氧化物酶，山羊血清室温封闭15 min后，滴加一抗（Ki-67、CD31，1∶500）4 ℃孵育过夜。次日滴加标记适量辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠/兔工作液，二氨基联苯胺（diaminobenzidine，DAB）显色，苏木素复染核，脱水、透明、封片。Ki-67及CD31阳性细胞颗粒定位于胞浆，呈棕黄色。400倍镜下每张切片随机选取3个视野，ImageJ专业图像分析软件计算Ki-67阳性细胞数及微血管密度。

1.4.5　安全性检测

取大鼠主要脏器（心、肝、脾、肺、肾），经乙醇梯度脱水、石蜡包埋，制备5 μm厚的切片，行HE染色，光学显微镜下观察组织形态学结构。

1.5　统计方法

每组实验均独立重复3次。使用GraphPad Prism 9.5.1软件对结果数据进行统计学分析并绘制统计图。实验数据经Shapiro-Wilk正态性检验符合正态分布，用Levene方差齐性检验证实数据方差齐性，统计图以$\bar{x}\pm s$的形式表达数据。多组间比较采用单因素方差分析或双因素混合设计方差分析，组间比较采用Tukey's HSD检验。

2　结果

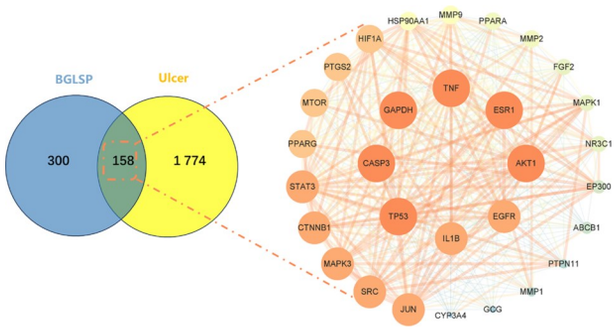
2.1　BGLSP潜在药效物质筛选结果

2.1.1　活性成分、疾病及靶点信息

共获得活性成分靶点300个，“ulcer”相关靶点1 774个，交集靶点158个（图1左）；PPI分析及可视化共获得30个核心靶点（图1右）。关键靶点及度值如下：肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）1、白细胞介素（interleukin，IL）-1β、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）、TP53、SRC、信号转导与转录激活因子3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）等靶点与其他靶点之间的关系密切，可能在治疗口腔溃疡中占据重要地位（图2）。

2.1.2　GO分析及KEGG富集分析结果

GO分析共富集到540个BP、67个CC及120个MF（P<0.05），将BP、CC、MF度值前10位可视化（图3）。BP主要包括细胞对化学应激的反应；CC排名靠前的为膜筏、膜微区、膜区域等；MF以核受体活性、配体激活的转录因子活性为主。



左：BGLSP治疗口腔溃疡交集靶点；右：交集靶点的PPI网络。

图1　BGLSP治疗口腔的靶点信息

Fig 1　Target information of BGLSP in treating oral ulcers

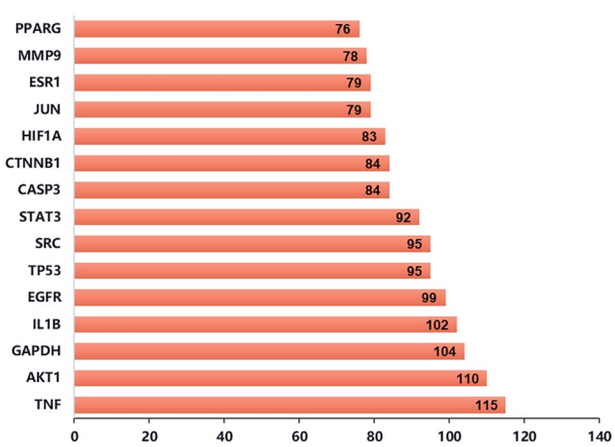


图2　BGLSP作用于溃疡的关键靶点及度值

Fig 2　Key targets and degree values of BGLSP in ulcer treatment

交集靶点显著富集在130条通路上，其中与溃疡愈合密切相关的核心通路40条。将前20项可视化如下，BGLSP可能通过PI3K-AKT、低氧诱导因子1（hypoxia inducible factor-1，HIF-1）、TNF、血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）等信号通路发挥作用（图4）。

2.1.3　活性成分-靶点-核心通路网络的构建结果

成分-靶点-核心通路网络包括25个化合物（红色），158个靶点（黄色），40条核心通路（蓝色）（图5）。按照度值大小排序确定核心成分：GAA、升麻素、石榴酸、泽泻醇B、松二糖、GAG、告达庭、槲皮素、GAC、灵芝烯酸D、赤灵酸D、积雪草酸等，重要靶点：丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）3、MAPK1、磷脂酰肌醇4,5-二磷酸3-激酶催化亚

基α、δ（phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha、Delta，PIK3CA、D）、磷脂酰肌醇-3-激酶调节亚基1（phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1，PIK3R1）、AKT1等可能在治疗中发挥重要药理作用。

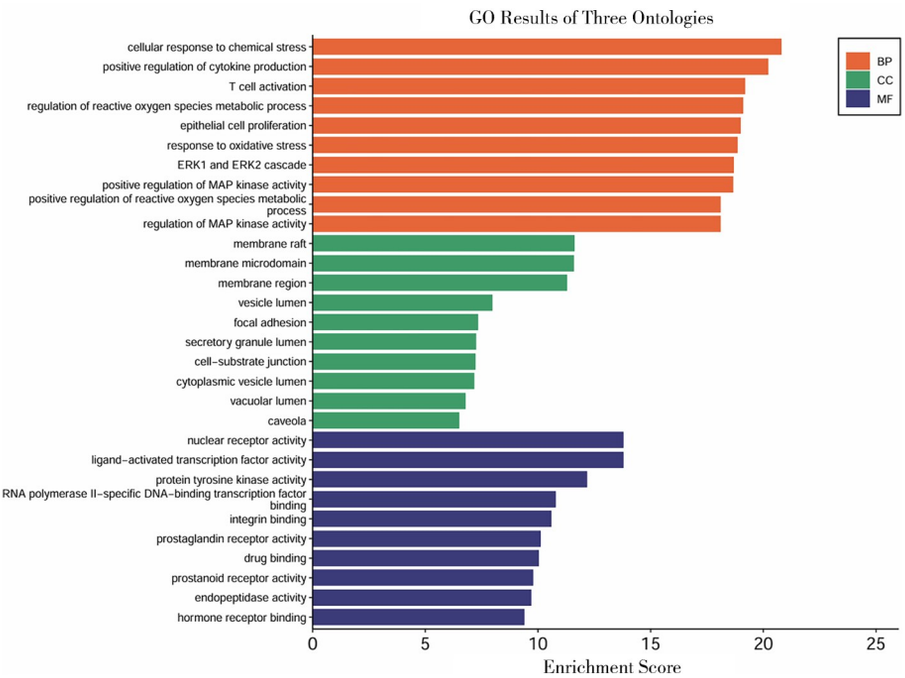


图 3　BGLSP作用于溃疡的功能注释

Fig 3　Functional annotation of BGLSP in ulcer treatment

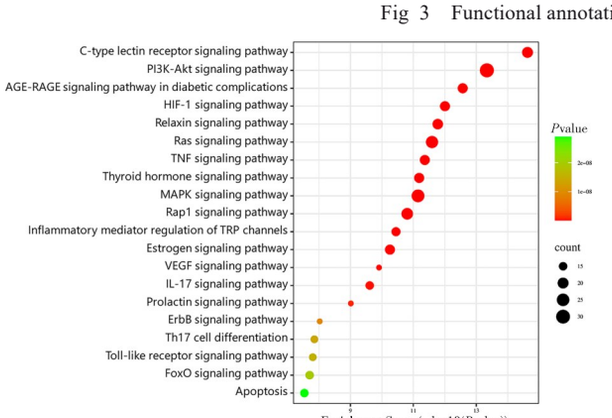


图 4　BGLSP作用于溃疡的KEGG富集分析

Fig 4　KEGG enrichment analysis of BGLSP in ulcer treatment

2.1.4　分子对接结果

分子对接结果表明：GAC、赤灵酸D、灵芝烯酸D、告达庭、泽泻醇B、GAA、GAG等活性成分与AKT1、TNF、SRC、MAPK3、过氧化物酶体增殖物激活受体γ（peroxisome proliferator activated receptor gamma，PPARG）、基质金属蛋白酶（matrix metallopeptidase，MMP）9等靶点蛋白的结合能为佳（图6A），将结合能排名前4的靶点蛋白-成分配体可视化如下（图6B）。在BGLSP中各成分含量GAA>GAG>GAC>灵芝烯酸D>泽泻醇B>赤灵酸D>告达庭。本研究优先对含量丰富且结合能表现良好的GAA与GAG进行活性验证。

2.2　活性成分验证结果

2.2.1　体外实验

毒性分析结果示：GAA在药物浓度大于40 μmol/L时开始对HGFs细胞表现出增殖抑制作用，在80 μmol/L时抑制作用显著（*P*=0.005 9）（图7A）；GAG仅在药物浓度高达80 μmol/L时，对HGFs细胞发挥显著增殖抑制作用（*P*=0.012 4）（图7B）。

划痕实验结果示：24 h时，1 μmol/L的GAA即可显著促进HGFs细胞的迁移（*P*=0.015 6），2.5 μmol/L的GAA促迁移作用增强（*P*=0.002 8），5 μmol/L（*P*=0.000 2）与10 μmol/L（*P*=0.000 2）的GAA促进作用均达到相近的较高水平；48 h时，10 μmol/L的GAA表现出显著促进细胞迁移的作用（*P*=0.001 3）（图7C、D）。GAG在24 h（*P*=0.034 0）及48 h（*P*=0.005 7），仅当药物浓度为2.5 μmol/L时具有促进细胞迁移的作用（图7C、E）。

2.2.2　体内实验

肉眼观察：实验第1天，大鼠舌背黏膜出现1个溃疡，表面被覆黄白色假膜，周围黏膜充血水肿。随着干预时间增加，各组大鼠的舌背溃疡面积呈逐渐缩小趋势（图8A）。第2天，与Control

组相比，GAA-L（P<0.000 1）、GAA-H（P<0.000 1）、GAG-L（P=0.043 6）及GAG-H（P<0.000 1）组的愈合率显著升高；与rb-bFGF组相比，GAA-L（P=0.000 5）、GAA-H（P=0.013 5）及GAG-H（P=0.001 9）组的愈合率显著升高；与GAG-L组相比，GAA-L（P=0.002 8）与GAG-H（P=0.009 7）组的愈合率显著升高。第3天，与Control组相比，GAA-L（P=0.046 6）、GAG-L（P=0.036 1）与GAG-H（P=0.000 4）组的愈合率仍显著升高（P<0.05）；与rb-bFGF组相比，GAG-H组的愈合率也显著升高（P<0.05）。实验第4天，与Control组相比，rb-bFGF（P=0.0259）、GAA-L（P=0.046 3）、GAA-H（P=0.034 2）及GAG-H（P=0.014 1）组的愈合率均保持显著升高（P<0.05）。第5天，各组之间的差异不具有统计学意义（P>0.05）（图8B）。

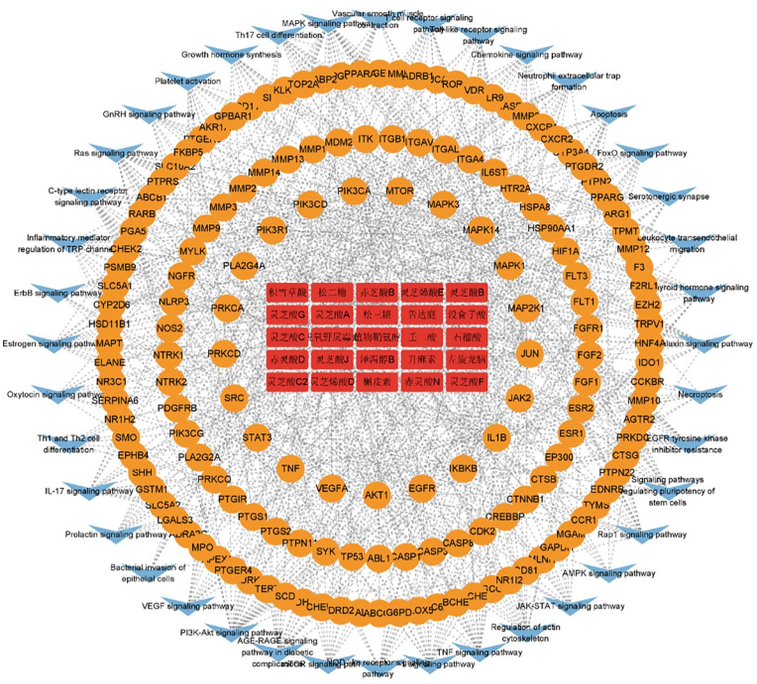
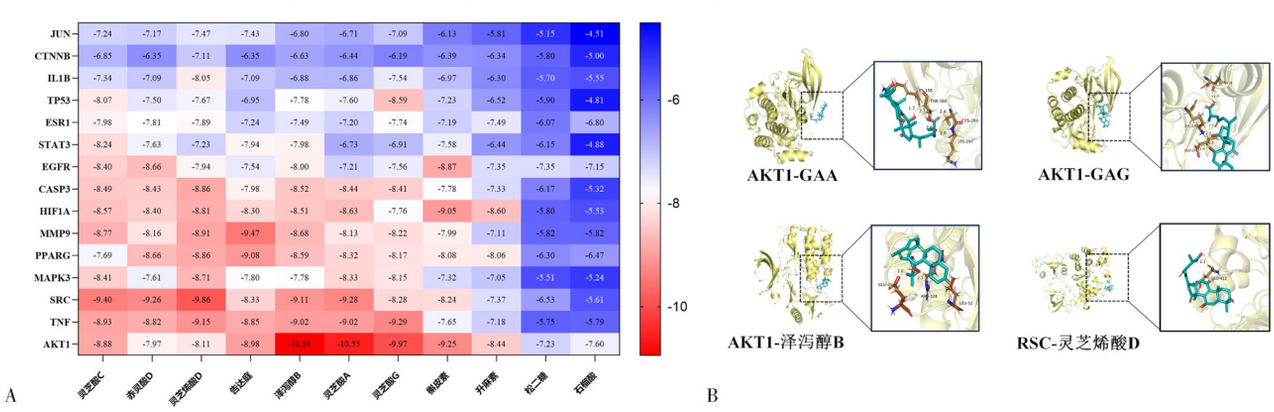


图 5　BGLSP作用于溃疡成分-靶点-核心通路图

Fig 5　Compound-target-core pathway network diagram of BGLSP in ulcer treatment



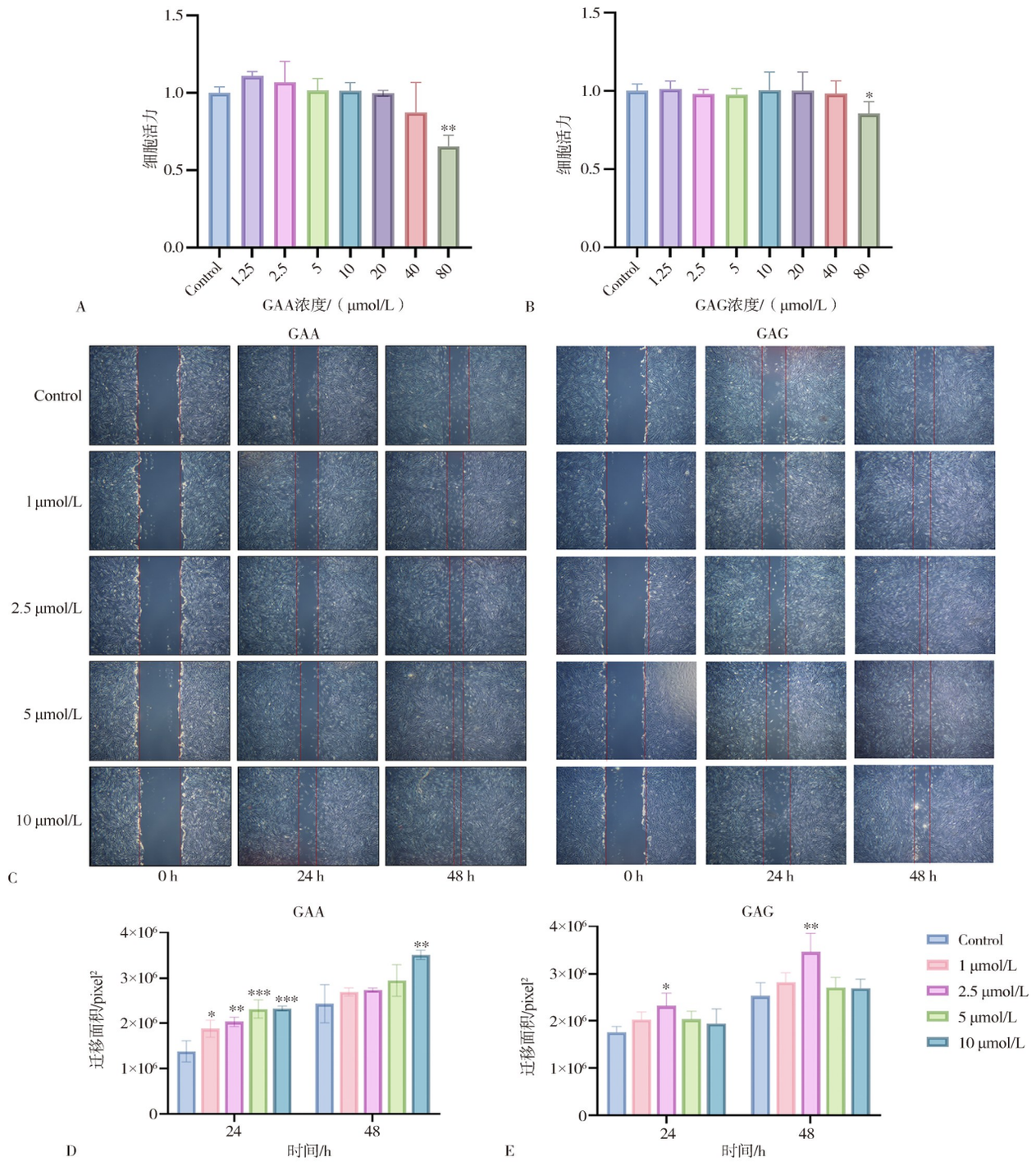
A：结合能热图；B：分子对接模式图。

图 6　活性成分与相关蛋白靶点的分子对接

Fig 6　Molecular docking of active components with related protein targets

病理学改变：1）HE染色结果示，不同处理组舌背黏膜均有上皮连续性中断、肉芽组织生成及炎细胞浸润，炎细胞以中性粒细胞及淋巴细胞为主，rb-bFGF、GAA-H组及GAG-H组的上皮组织趋于完整，细胞分层逐渐清晰（图9A）；2）Masson染色结果示，各组溃疡新生组织内均可见胶原纤维生成，Control组的胶原纤维较为稀疏，分布不规则，其余各组可见致密的胶原纤维交织排列（图9B）；3）SR染色结果示，在PLM下，Control组的胶原纤维多呈绿色，与Control组相

比，其余5组的胶原纤维多呈金黄色，其中rb-bFGF组有最多的金黄色的胶原纤维沉积；在GAA和GAG处理组中，高浓度组中的黄色胶原纤维多于低浓度组，GAA处理组的金黄色的胶原纤维较GAG处理组多（图9C）。



A：CCK-8法检测GAA对细胞活性的影响；B：CCK-8法检测GAG对细胞活性的影响；C：划痕实验评估GAA及GAG对细胞迁移的影响；D：GAA促细胞迁移面积的定量分析；E：GAG促细胞迁移面积的定量分析。与Control组比较，*P<0.05，**P<0.01，***P<0.001。

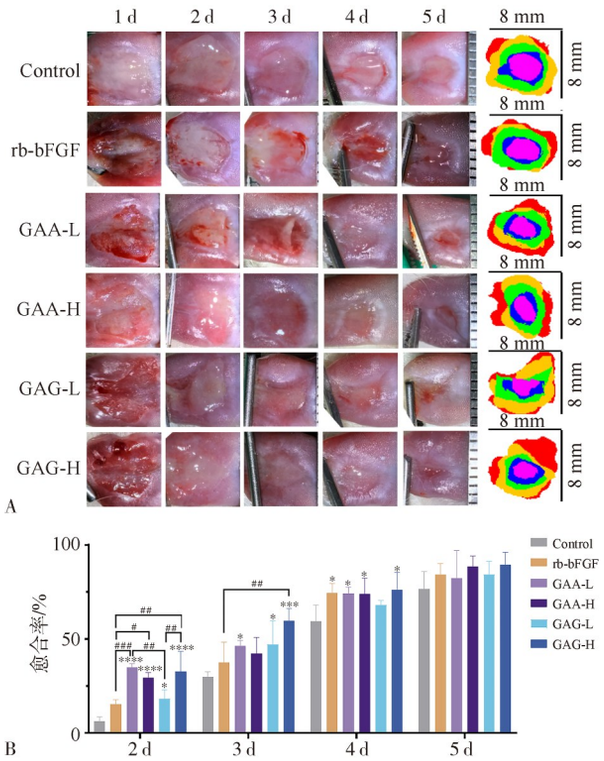
图 7　GAA及GAG的体外活性验证

Fig 7　*In vitro* activity validation of GAA and GAG

细胞增殖情况：与Control组相比，rb-bFGF组的Ki-67阳性细胞率显著升高（P =0.034 4），其余各组差异不具有显著性（P>0.05）（图9D、E）。

血管生成情况：与Control组相比，rb-bFGF（P=0.030 1）、GAA-H（P=0.007 0）及GAG-H（P=0.008 6）组的血管数量显著增多，各组间血管数

量差异不具有显著性（P>0.05）（图9 F、G）。



A：口腔溃疡愈合情况的宏观观察；B：口腔溃疡愈合率的统计分析结果，与Control组比较，*P<0.05，***P<0.001，****P<0.000 1；$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01，$^{\#\#\#}P$<0.001。

图 8　肉眼观察GAA及GAG对大鼠口腔溃疡的影响

Fig 8　Macroscopic observation of the effects of GAA and GAG on rat oral ulcers

安全性检测结果：内脏组织HE染色结果表明，各组均未观察到脏器组织病理学病变，提示GAA及GAG在试验剂量下具备良好的生物安全性（图10）。

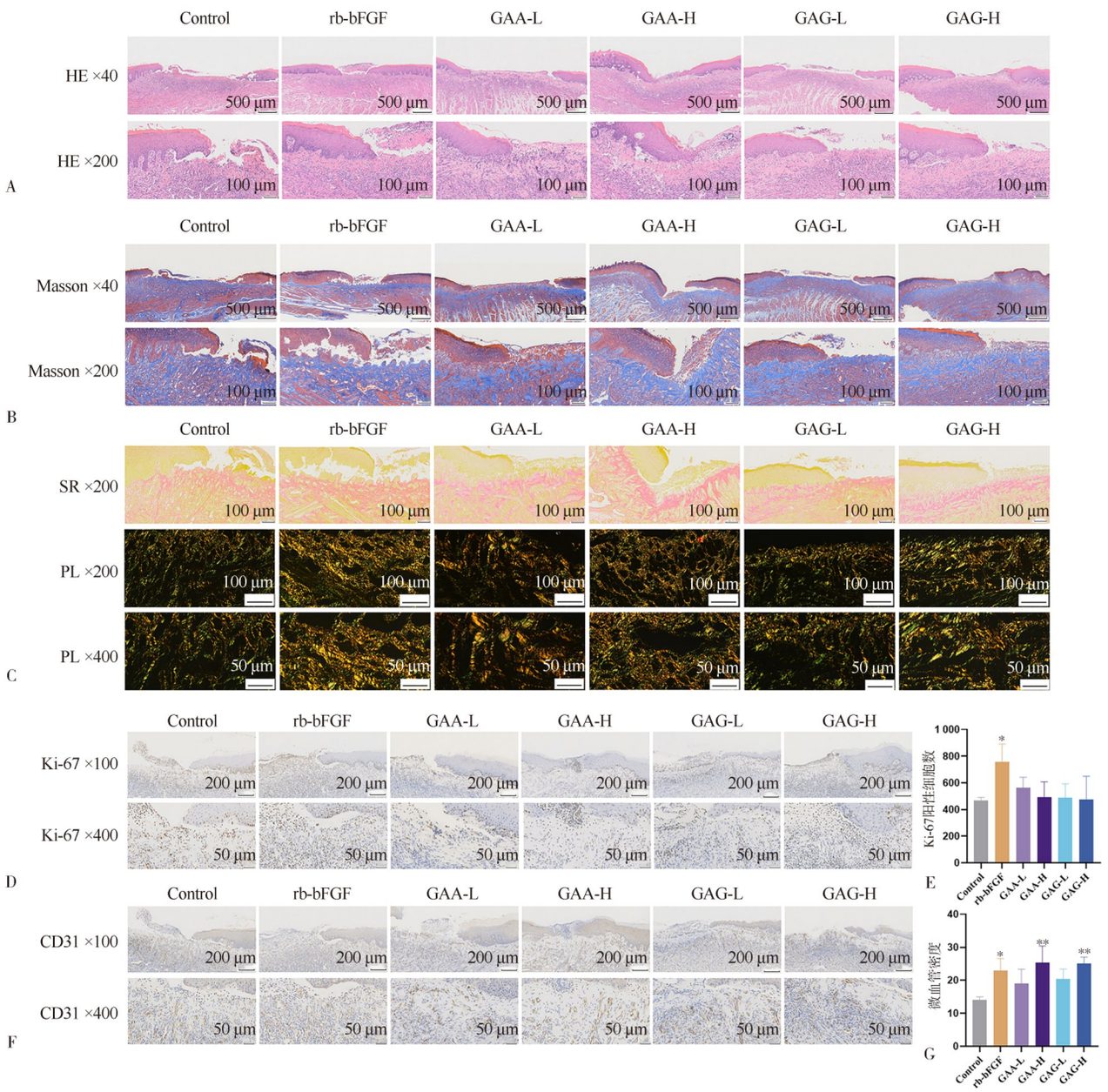
3　讨论

BGLSP是一种化学成分复杂的混合物，确切的药效物质基础尚不明确，因此，筛选潜在药效物质是深入理解作用机制、优化给药方案、实现质量控制乃至开发新药的关键[13]。网络药理学能够从系统层面揭示中药多成分-多靶点-多通路与疾病之间的相互作用关系，分子对接可通过计算模拟药物小分子与靶点蛋白之间的结合能力。将二者结合应用于中药药效物质基础的筛选，具有高效快速、成本低、可进行高通量预测的优势[14]。而中药成分能否成为药效物质，取决于其生物活性的强弱及其在药材中的含量水平[15]。本研究结合网络药理学、分子对接分析以及LC-MS的相对定量，发现GAA与GAG在课题组关注的BGLSP活性成分中相对含量最高，约占比0.8%及0.3%。这提示二者是主要的活性成分，也可能是BGLSP的潜在药效物质基础。因此，课题组优先选择GAA与GAG进行验证。

既往研究显示，GAA具有抗炎、抗氧化特性[16]，可通过抑制白细胞介素17信号通路来缓解溃疡性结肠炎[5]。而GAG的相关研究较为有限。细胞划痕实验显示，GAA呈现浓度依赖性地促进成纤维细胞迁移，而GAG仅在2.5 μmol/L下才表现出显著的促迁移作用。碱性成纤维细胞生长因子（basic fibrobast growth factor，bFGF）是一种临床广泛用于溃疡修复的多功能细胞生长因子，能够有效刺激来源于中胚层和神经外胚层的细胞增殖，促进溃疡愈合过程中的细胞增殖与分化、肉芽组织形成以及组织重建等[17]，因此本研究选择rb-bFGF作为阳性对照药物。体内实验结果表明，rb-bFGF、GAA与GAG均能够促进大鼠口腔溃疡愈合，且在实验第2天，GAA及GAG-H的促愈合效果优于rb-bFGF组，可能由于此时溃疡正处于炎症期，GAA和GAG因其较强的抗炎能力提高了溃疡愈合率[16]。与Control组相比，GAA在干预初期（第2~3天）显示出低浓度组效果更优，随干预时间延长，高浓度组效果更为显著；GAG则整体表现为浓度依赖性促进愈合。溃疡愈合的早期需要炎症因子的参与[18]，网络药理学研究[19]显示，GAA可能通过TNF及MMP9靶点发挥抗炎作用，而高浓度GAA在炎症期可能因过度抗炎而干扰溃疡愈合的进程。在体内外实验结果中，GAG有效浓度趋势存在差异，可能是因为细胞实验缺乏细胞间相互通讯或微环境的改变，故未能体现出体内实验中疗效的浓度依赖性。在溃疡愈合过程中，成纤维细胞先合成Ⅲ型胶原搭建肉芽组织支架，之后被机械强度高、排列有序的Ⅰ型胶原替代，完成组织功能化重建[20]。有研究[21]提示，BGLSP可能作用于MMP9等靶点以及PI3K-AKT与MAPK通路调节胶原生成。本研究也表明，GAA与GAG与MMP9对接良好，GAA与GAG可促进Ⅰ型胶原沉积，但作用稍弱于rb-bFGF组。这可能是因为BGLSP中除GAA和GAG外，GAC、赤灵酸D、灵芝烯酸D、告达庭、泽泻醇B等同样可与MMP9蛋白有良好对接，可通过协同或互补作用共同促进胶原的成熟与有序排列。

rb-bFGF可刺激角质细胞和成纤维细胞增殖，参与肉芽组织的形成和血管生成，增加溃疡局部

血供，从而促进愈合[22]。本研究显示，潜在药效物质GAA及GAG具有与rb-bFGF相当的促血管生成能力，机制可能与作用于HIF1A靶点，进而调控HIF及VEGF通路相关[23]。在促细胞增殖方面，BGLSP可能调控AKT1、MAPK3、EGFR等关键靶点，并激活PI3K-AKT与MAPK信号通路发挥作用[24]。但GAA和GAG未表现出显著的增殖促进作用，分子对接结果表明，二者除与增殖相关靶点结合外，还显示出对TNF、IL-1β等炎症关键靶点的强结合能力，提示其功能可能更侧重于调控炎症微环境。



A：HE染色图；B：Masson染色图；C：SR染色的光学显微镜图及PLM图；D、E：Ki-67免疫组织化学（IHC）染色及阳性细胞数定量统计；F、G：CD31的IHC染色及血管密度定量统计。与Control组比较，*P<0.05，**P<0.01。

图 9　GAA及GAG对大鼠口腔溃疡的影响

Fig 9　Effects of GAA and GAG on rat oral ulcers

现有毒理学研究[25-26]已从急性毒性、遗传毒性及重复给药毒性等方面对BGLSP进行系统评估，表明其在常规实验条件下安全性较高。本研究也发现，在体内实验所用剂量下，GAA与GAG未表现明显毒性；但细胞实验提示，过高浓度对细胞增殖有抑制效应，且GAA的抑制作用略强于GAG，提示未来局部应用时需注意给药剂量。

本研究采用醋酸烧灼法诱导大鼠口腔溃疡，

这是一种化学性损伤模型。虽然该方法能标准化构建溃疡模型，但其发病机制与临床常见的复发性阿弗他溃疡的发病机制存在显著差异。因此，未来研究需构建更接近复发性阿弗他溃疡机制的动物模型。另外本研究未探讨药物在愈合不同阶段的作用。因此，后续工作将重点考察GAA与GAG在溃疡愈合不同阶段对炎症因子、生长因子及胶原蛋白表达的影响，以明确其随时间变化的作用机制。BGLSP中尚有其他促进胶原生成和细胞增殖的药效成分，课题组也将继续验证BGLSP中其余药效物质。

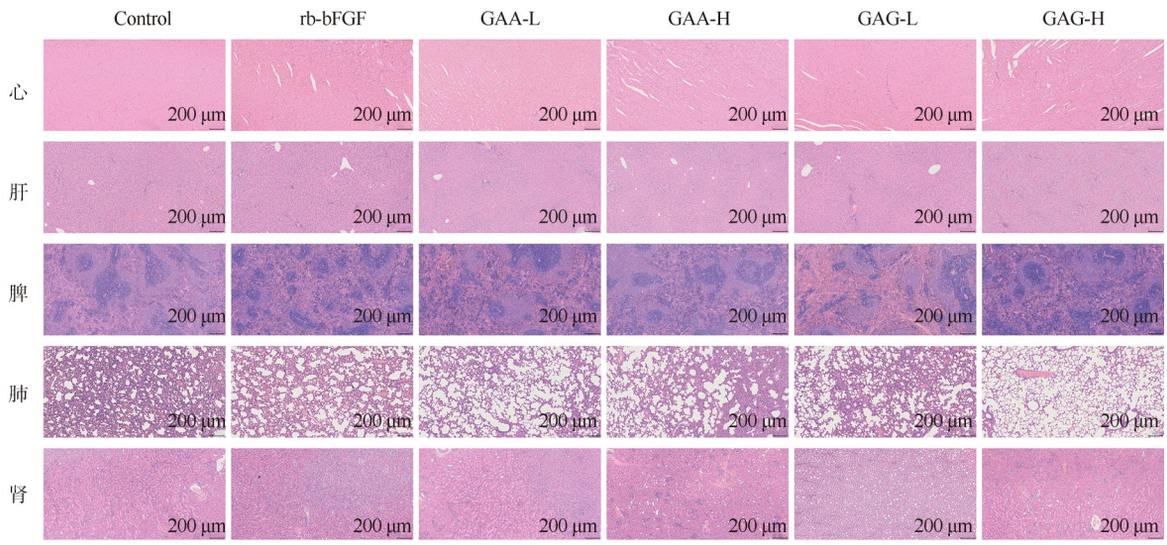


图 10　各组大鼠主要脏器（心、肝、脾、肺、肾）的HE染色图 × 100

Fig 10　HE staining images of major organs (heart, liver, spleen, lung, kidney) in rats from each group × 100

综上所述，研究证实BGLSP具有多成分-多靶点-多通路协同作用的特点。其中GAA和GAG作为主要药效物质基础，可促进口腔溃疡愈合。本研究为明确BGLSP治疗口腔溃疡的药效物质基础与作用机制奠定了基础。

利益冲突声明：作者声明本文无利益冲突。

[参考文献]

[1] Conejero Del Mazo R, García Forcén L, Navarro Aguilar ME. Recurrent aphthous stomatitis[J]. Med Clin (Barc), 2023, 161(6): 251-259.

[2] Wang Z, Cao H, Xiong J, et al. Recent advances in the aetiology of recurrent aphthous stomatitis (RAS)[J]. Postgrad Med J, 2022, 98(1155): 57-66.

[3] Xu J, Li P. Researches and application of Ganoderma spores powder[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1181: 157-186.

[4] 汤如莹. 灵芝孢子粉与灵芝中药药性对比研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
Tang RY. Comparative study on *Ganoderma lucidum* spore powder and Ganoderma lucidum[D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.

[5] Ye Y, Chen Y, Cao Y, et al. Ganoderic acid A alleviates ulcerative colitis by inhibiting the interleukin17 signaling pathway via targeting retinoic acid-related orphan receptor alpha[J]. J Ethnopharmacol, 2026, 361: 121297.

[6] Liu Y, Li W, Yang L, et al. Discovery of ganodecalone A, from *Ganoderma calidophilum* for the treatment of acute gastric ulcers by binding to ALOX5 via the MAPK/NF- κB/iNOS signaling[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 351: 120082.

[7] Qiao H, He J, Chen Y, et al. Sporoderm-broken of *Ganoderma lucidum* spore polysaccharides alleviate dextran sulfate sodium-induced colon inflammation in mice by regulating Th17/Treg homeostasis and restore gut microbiota balance[J]. Int J Biol Macromol, 2025, 323(Pt 1): 147015.

[8] Hu F, Yan Y, Wang CW, et al. Article effect and mechanism of Ganoderma lucidum polysaccharides on human fibroblasts and skin wound healing in mice[J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(3): 203-209.

[9] Zou Y, Yang Y, Pei J, et al. *Ganoderma lucidum* polysaccharide/carboxymethyl chitosan hydrogels modulate macrophage polarization for wound healing[J]. Biomacromolecules, 2025, 26(4): 2675-2689.

[10] Jiao C, Xie Y, Yun H, et al. The effect of *Ganoderma lucidum* spore oil in early skin wound healing: interactions of skin microbiota and inflammation[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(14): 14125-14140.

[11] Larjava H, Wiebe C, Gallant-Behm C, et al. Exploring scarless healing of oral soft tissues[J]. J Can Dent Assoc, 2011, 77: b18.

[12] Brand HS, Ligtenberg AJ, Veerman EC. Saliva and wound healing[J]. Monogr Oral Sci, 2014, 24: 52-60.

[13] 毕肖林, 马世堂, 狄留庆, 等. 中药药效物质筛选与辨识的研究思路及进展[J]. 中草药, 2018, 49(22): 5229-5234.
Bi XL, Ma ST, Di LQ, et al. Research ideas and progress on screening and identification of pharmacodynamic substance of Chinese materia medica[J]. Chin Trad Herbal Drugs, 2018, 49(22): 5229-5234.

[14] Huang N, Wei Y, Wang M, et al. Dachaihu decoction alleviates septic intestinal epithelial barrier disruption via PI3K/AKT pathway based on transcriptomics and network pharmacology[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 337 (Pt 3):118937.

[15] Bai G, Zhang T, Hou Y, et al. From quality markers to data mining and intelligence assessment: a smart quality-evaluation strategy for traditional Chinese medicine based on quality markers[J]. Phytomedicine, 2018, 44: 109-116.

[16] Sui Q, Zhu C, Shi S, et al. Ganoderic acid A: an in-depth review of pharmacological effects and molecular docking analysis[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 349: 119868.

[17] 刘晓波, 杨国勋, 武智强, 等. 重组牛碱性成纤维细胞生长因子治疗糖尿病足溃疡的随机对照试验的系统评价和Meta分析[J]. 感染、炎症、修复, 2025, 26(1): 8-15.
Liu XB, Yang GX, Wu ZQ, et al. Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of recombinant bovine basic fibroblast growth factor in the treatment diabetic foot ulcers[J]. Infec Inflam Rep, 2025, 26 (1): 8-15.

[18] Huang CJ, Pu CM, Su SY, et al. Improvement of wound healing by capsaicin through suppression of the inflammatory response and amelioration of the repair process [J]. Mol Med Rep, 2023, 28(2): 155.

[19] Cardoso LM, Pansani TN, Hebling J, et al. Chemotherapy drugs and inflammatory cytokines enhance matrix metalloproteinases expression by oral mucosa cells[J]. Arch Oral Biol, 2021, 127: 105159.

[20] Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in wound healing[J]. Bioengineering (Basel), 2021, 8(5): 63.

[21] Fang C, Zeng Z, Ni B, et al. Fibroblast PI3K/AKT signaling and extracellular matrix homeostasis: mechanisms, targets, and delivery challenges[J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1681875.

[22] Zare R, Abdolsamadi H, Soleimani Asl S, et al. The bFGF can improve angiogenesis in oral mucosa and accelerate wound healing[J]. Rep Biochem Mol Biol, 2023, 11(4): 547-552.

[23] Hong WX, Hu MS, Esquivel M, et al. The role of hypoxia-inducible factor in wound healing[J]. Adv Wound Care (New Rochelle), 2014, 3(5): 390-399.

[24] Chuhuaicura P, Rodríguez-Niklitschek C, Oporto GH, et al. Distinct molecular mechanisms in oral mucosal wound healing: translational insights and future directions[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(21): 10660.

[25] 郭婕, 谢玮, 颜燕, 等. 灵芝孢子粉富硒酵母制剂的毒理学安全性评价[J]. 毒理学杂志, 2017, 31(6): 491-494.
Guo J, Xie W, Yan Y, et al. Toxicological safety evaluation of Ganoderma spore powder selenium rich yeast preparation[J]. J Toxicol, 2017, 31(6): 491-494.

[26] Xia L, Sun R, Zhang L, et al. A 26-week repeated dose toxicity evaluation of sporoderm-removed Ganoderma lucidum spores in rats[J]. Food Chem Toxicol, 2023, 182: 114175.

（本文编辑　张玉楠）