

基于“通路-疾病”交互网络的葛根芩连汤及其指标成分组合物干预小鼠溃疡性结肠炎相关结肠癌的作用

徐蓓蕾^{1,2,3}, 吴迪¹, 杨娜娜¹, 韩晓宇¹, 刘晶晶⁴, 胡扬^{1,2,3}, 杨波^{1,2,3}, 热增才旦⁵, 孙向明^{1,2,3}, 阎新佳^{1,2,3}, 孙志伟^{1,2,3}, 张琰¹, 梁伟^{1,2,3}, 李文兰^{1,2,3*}

1. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076
2. 抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076
3. 黑龙江省预防与治疗老年性疾病药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076
4. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050
5. 青海民族大学 药学院, 青海 西宁 810007

摘要: **目的** 建立溃疡性结肠炎相关结肠癌(UCRCC)与NF- κ B信号通路的网络模型, 预测UCRCC的关键炎症靶标, 明确葛根芩连汤及其指标成分组合物对这些靶标的影响。**方法** 采用HPLC法, 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱, 测定10种指标成分; 检索Pubmed、ScienceDirect等数据库, 分别查阅UCRCC疾病、NF- κ B通路的上下游蛋白, 采用Cytoscape软件, 预测UCRCC的关键炎症靶标; 在AOM/DSS诱导的UCRCC小鼠模型中, 通过免疫组化、ELISA方法明确葛根芩连汤及其指标成分组合物对关键炎症靶标的影响。**结果** 葛根芩连汤中葛根素、大豆苷、甘草苷、药根碱、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、甘草酸、汉黄芩素的含量分别为1.677、0.154、0.159、0.045、0.448、0.035、0.095、0.013、0.111、0.006 $\mu\text{g/g}$ 。交互网络中综合排名较高的前8位炎症因子分别是NF- κ Bp65、iNOS、COX-2、Bcl-2、TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1和VCAM-1。与模型组比较, 葛根芩连汤低、中、高剂量组及其指标成分组合物组、美沙拉秦肠溶片(5-ASA)组均显著下调UCRCC模型小鼠结肠组织中NF- κ Bp65、iNOS、Bcl-2、COX-2蛋白表达($P < 0.01$), 并显著降低血清中TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1水平($P < 0.05$ 、0.01)。**结论** 葛根芩连汤及其指标成分组合物能够改善UCRCC小鼠结肠组织病理情况, 并下调炎症因子的表达, 对UCRCC具有一定的干预作用, 为确定葛根芩连汤质量标志物(Q-marker)奠定了基础。

关键词: 葛根芩连汤; 溃疡性结肠炎相关结肠癌; NF- κ B通路; 指标成分组合物; 网络药理学; 质量标志物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)19-4991-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.19.018

Effect of Gegen Qinlian Decoction and composition of index components on ulcerative colitis related colon cancer in mice based on “pathway-disease” interaction network

XU Bei-lei^{1,2,3}, WU Di¹, YANG Na-na¹, HAN Xiao-yu¹, LIU Jing-jing⁴, HU Yang^{1,2,3}, YANG Bo^{1,2,3}, REZENG Cai-dan⁵, SUN Xiang-ming^{1,2,3}, YAN Xin-jia^{1,2,3}, SUN Zhi-wei^{1,2,3}, ZHANG Yan¹, LIANG Wei^{1,2,3}, LI Wen-lan^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. Engineering Research Center of Natural Anti-cancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China
3. Heilongjiang Key Laboratory of Preventive and Therapeutic Drug Research of Senile Diseases, Harbin 150076, China
4. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China
5. School of Pharmacy, Qinghai Nationalities University, Xining 810007, China

Abstract: Objective A network model of ulcerative colitis-associated colon cancer (UCRCC) and NF- κ B signaling pathway was established, in order to predict the key inflammatory targets of UCRCC and identify the effect of GQD and composition of index components on these targets. **Methods** HPLC method was used, the mobile phase was acetonitrile-0.2% phosphoric acid aqueous solution,

收稿日期: 2020-03-10

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201810240010); 黑龙江省自然科学基金联合引导项目(LH2020H069); 青海省科技计划项目(2018-ZJ-708); 黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2018134); 哈尔滨市应用技术与开发项目(2016RAQXJ009, 2017RAQXJ046); 哈尔滨商业大学校级科研项目(17XN028); 哈尔滨商业大学研究生科研创新项目(YJSCX2019-614HSD); 中药所学科建设-分子生物学鉴定中成药项目(1020050090114)

作者简介: 徐蓓蕾(1983—), 女, 博士, 副教授, 中药药效物质基础和质量评价研究。Tel: 15124515866 E-mail: xubeilei2006@163.com

***通信作者** 李文兰(1967—), 女, 博士, 教授/院长, 中药药效物质基础和质量评价研究。Tel: 13936169153 E-mail: lwldzd@163.com

and the gradient elution was carried out. The 10 indicators were determined. The literature of databases such as Pubmed and ScienceDirect were searched, the terms of the upstream and downstream proteins of UCRCC disease and NF- κ B pathway were examined. The Cytoscape software was used to predict the key inflammatory targets of UCRCC. The UCRCC model was established by AOM/DSS method, and the effect of GQD and composition of index components on key inflammatory targets were identified by immunohistochemistry and ELISA. **Results** The contents of puerarin, daidzin, glycyrrhizin, jatrorrhizine, baicalin, palmatine, berberine, baicalein, glycyrrhizic acid and wogonin in GQD were 1.677, 0.154, 0.159, 0.045, 0.448, 0.035, 0.095, 0.013, 0.111 and 0.006 μ g/g, respectively. The top eight inflammatory factors of the key protein in the interaction network were NF- κ Bp65, iNOS, COX-2, Bcl-2, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 and VCAM-1. Compared with the model group, the high-, medium- and low-dose groups of GQD, the composition of index components group and the 5-ASA group were able to down-regulate the relative expression levels of NF- κ Bp65, iNOS, Bcl-2, COX-2 in colonic tissues of UCRCC mice ($P < 0.01$), and down-regulate the expression levels of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1 in serum of UCRCC mice ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** GQD and composition of index components can improve the pathological condition of colon tissue in UCRCC mice, down-regulate the expression of inflammatory factors in colon tissue of UCRCC mice, and have a certain intervention effect on UCRCC, which laid the foundation for determining the quality marker (Q-marker) of GQD.

Keywords: Gegen Qinlian Decoction (GQD); ulcerative colitis-associated colon cancer; NF- κ B signaling pathway; composition of index components; network pharmacology; quality markers

作为反映中药安全性和有效性的质量控制新模式，基于刘昌孝院士提出“中药质量标志物(Q-marker)”的新概念^[1-4]，国内外学者对元胡止痛滴丸、脑心通胶囊、双黄连制剂等进行了大量探索^[5-9]。Q-marker 是与中药的功能属性密切相关的化学物质，“有效性”是该研究模式中的关键因素之一。

葛根芩连汤具有轻清解肌、清热止利的功效，用于治疗太阳表邪内陷所致肠热下利证，现代药理学研究表明葛根芩连汤及其药效物质在解热、镇痛、抗炎、免疫、止泻、抗菌等方面均有良好的作用^[10-12]。溃疡性结肠炎相关结肠癌(ulcerative colitis related colon cancer, UCRCC)是溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)背景下高发的结肠癌，是 UC 患者的重要死亡原因^[13-15]。目前，众多学者认为 UCRCC 的发病机制与 UC 病程、炎症严重程度呈正相关^[16-17]。研究表明 NF- κ B 通路是桥连 UC 和 UCRCC 关键。同时，课题组前期已经揭示葛根芩连汤及其药效物质主要通过阻断 NF- κ B 通路治疗 UC 的重要机制^[18-19]，故推测葛根芩连汤也可能通过调控 NF- κ B 通路干预 UCRCC。本实验旨在研究葛根芩连汤及其指标成分组合物对 UCRCC 的影响，而其中关键问题是如何从众多指标成分中，有针对性地筛选 Q-markers。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Waters2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Adventurer 电子天平(美国 OHAUS 公司); Cytoscape (3.6.1) 软件; MULTISKAN MK3 全自动多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); RM2235 病

理切片机(德国徕卡公司); DH4000A 电热恒温培养箱(美国 OHAUS 公司); Nikon 倒置显微镜及成像系统(日本尼康公司); Anke TDL80-2C 离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药材

葛根、黄芩、黄连、炙甘草购买自哈尔滨市道外区三棵树药材市场，经哈尔滨商业大学杨玉山工程师鉴定分别为豆科植物野葛 *Pueraria lobate* (Willd.) Ohwi 的干燥根、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎。

1.3 药品与试剂

葛根素(批号 16080605)、大豆苷(批号 16042704)、黄芩苷(批号 16070503)、黄芩素(批号 16011504)、汉黄芩素(批号 16011002)、盐酸小檗碱(批号 130116)、盐酸巴马汀(批号 110311)、盐酸药根碱(批号 120423)、甘草酸(批号 16032502)、甘草苷(批号 16071504)对照品购于四川省维克奇生物科技有限公司，质量分数均 $\geq 98\%$ ；乙腈(色谱纯，批号 151102)(Fisher Scitific 公司)；氧化偶氮甲烷(AOM，批号 A5486，美国 Sigma 公司)；葡聚糖硫酸钠(DSS，相对分子质量 36 000~50 000，批号 160110，美国 MP biomedical 公司)；美沙拉秦肠溶片(5-ASA，批号 H20103359，黑龙江天宏药业股份有限公司)；ELISA 试剂盒、免疫组化试剂盒(北京中科万邦生物科技有限公司)；指标成分组合物由提取物按测定比例组成：葛根素、黄芩苷、盐酸小檗碱、甘

草酸铵、盐酸巴马汀提取物(宝鸡市润宇生物科技有限公司)、大豆苷提取物(天津中新药业有限公司)、甘草苷提取物(富生制药有限公司)、盐酸药根碱、汉黄芩素提取物(四川省维克奇生物科技有限公司)。

1.4 动物

清洁级 BALB/c 小鼠, 雌性, 8 周龄, 体质量 (20±2) g, 购买自长春市亿斯实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK-2016-0003。动物饲养于室温 20~25 ℃, 相对湿度 45%~70% 的环境下, 自由饮食饮水。

2 方法与结果

2.1 葛根芩连汤化学成分分析

2.1.1 色谱条件 Agilent C₁₈ 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%磷酸水溶液, 梯度洗脱: 0~10 min, 15%乙腈; 10~25 min, 30%~40%乙腈; 25~40 min, 40%~80%乙腈; 40~50 min, 80%~100%乙腈; 50~55 min, 100%~15%乙腈; 柱温 30 ℃; 体积流量 0.8 mL/min; 进样量 10 μL。在此色谱条件下, 检测波长为 250 nm 时指出 10 个色谱峰, 如图 1 所示。

2.1.2 对照品溶液的制备 取葛根素、大豆苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、盐酸小檗碱、盐酸药根碱、盐酸巴马汀、甘草苷、甘草酸对照品适量, 精密称定, 分别加甲醇配制成质量浓度为 1.20、1.05、1.08、1.15、1.04、0.99、1.13、0.98、1.06 mg/mL 的对照品溶液。

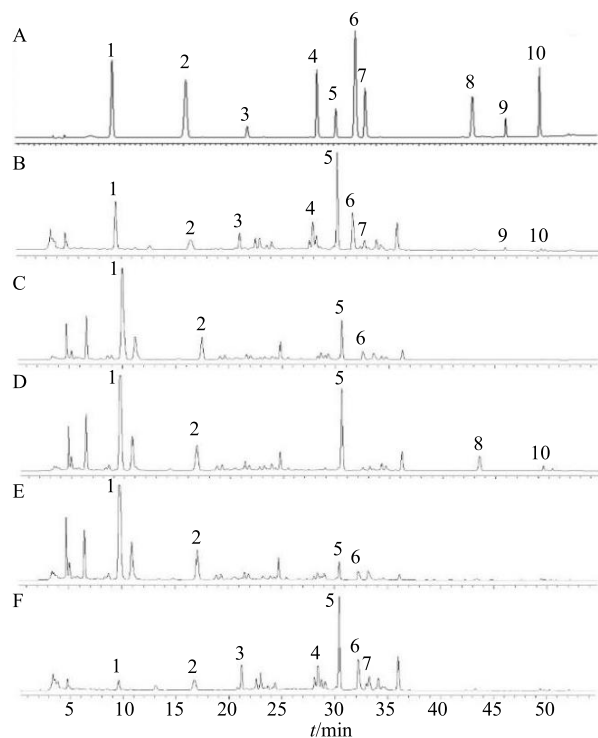
2.1.3 供试品溶液的制备 参照《中国药典》2015 年版对葛根、黄芩、黄连、炙甘草各饮片进行鉴定。取葛根 8 g、黄芩 3 g、黄连 3 g、炙甘草 2 g, 加入 10 倍量水, 浸泡 30 min。先煎葛根, 水沸后煎煮 20 min, 再和余药共煎至 30 min, 滤过, 残渣加入 10 倍量水, 水沸后再煎 20 min, 趁热滤过; 合并两次滤液, 浓缩, 冷至常温, 加水调整至药材质量浓度为 0.1 g/mL。

2.1.4 阴性样品溶液的制备 按供试品溶液制备方法, 分别制备缺葛根、缺炙甘草、缺黄芩、缺黄连的阴性样品溶液。

2.1.5 方法学验证

(1) 线性关系考察: 分别精密量取对照品溶液, 加甲醇稀释, 摇匀, 得系列混合对照品, 进样测定各成分峰面积。以峰面积积分值为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X), 进行线性回归。结果见表 1, 各成分在质量浓度范围内线性关系良好。

(2) 精密度试验: 精密量取混合对照品溶液,



1-葛根素 2-大豆苷 3-甘草苷 4-药根碱 5-黄芩苷 6-巴马汀
7-小檗碱 8-黄芩素 9-甘草酸 10-汉黄芩素

1-puerarin 2-daidzin 3-liquiritin 4-jatrorrhizine 5-baicalin
6-palmatine 7-berberine 8-baicalein 9-glycyrrhizic acid 10-wogonin

图 1 混合对照品 (A)、葛根芩连汤 (B)、缺炙甘草 (C)、缺黄连 (D)、缺黄芩 (E)、缺葛根 (F) 溶液 HPLC 图

Fig.1 HPLC of mixed reference substance (A), Gegen Qinlian Decoction (B), without *G. uralensis* (C), without *C. chinensis* (D), without *S. baicalensis* (E) and without *P. lobata* (F) solution

连续进样 5 次测定, 记录色谱图。结果表明, 葛根素、大豆苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱、药根碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸峰面积的 RSD 值分别为 0.75%、0.62%、1.10%、1.03%、1.05%、0.98%、0.67%、0.92%、1.08%、1.25%。

(3) 稳定性试验: 精密量取混合对照品溶液, 分别于 0、2、4、8、12 h 进样, 记录色谱图。结果表明, 葛根素、大豆苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱、药根碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸峰面积的 RSD 值分别为 0.78%、0.98%、1.36%、1.08%、0.96%、0.88%、1.02%、1.13%、0.10%、0.85%。

(4) 重复性试验: 制备 3 份供试品溶液, 进样测定, 记录色谱图。结果表明, 葛根素、大豆苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱、药根碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸峰面积的 RSD 值分别为

表 1 葛根芩连汤中 10 种成分的回归方程

Table 1 Regression equation of 10 ingredients in Gegen Qinlian Decoction

成分	回归方程	r	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
葛根素	$Y=295\ 809\ X+50\ 429$	0.999 3	1.20~18.00
大豆苷	$Y=363\ 902\ X+29\ 840$	0.999 1	1.05~15.75
甘草苷	$Y=50\ 303\ X+29\ 456$	0.999 5	0.98~14.70
药根碱	$Y=242\ 143\ X+18\ 688$	0.999 7	0.99~14.85
黄芩苷	$Y=65\ 955\ X+18\ 783$	0.999 1	1.08~16.20
巴马汀	$Y=457\ 761\ X+43\ 187$	0.999 5	1.15~17.25
小檗碱	$Y=218\ 194\ X+23\ 436$	0.999 7	0.96~14.40
黄芩素	$Y=229\ 634\ X+104\ 360$	0.999 2	1.13~16.95
甘草酸	$Y=21\ 078\ X+5\ 259$	0.999 1	1.06~15.90
汉黄芩素	$Y=190\ 941\ X+14\ 819$	0.999 5	1.04~15.60

0.95%、0.96%、1.15%、1.36%、126%、1.05%、1.18%、
1.65%、1.83%。

(5) 加样回收率试验: 精密量取已知各成分含量的样品 3 份, 每份 1 mL, 精密加入对照品, 制备供试品溶液, 进样测定, 并计算回收率。结果表明, 葛根素、大豆苷、黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、小檗碱、药根碱、巴马汀、甘草苷、甘草酸的加样回收率分别为 100.05%、100.20%、100.08%、99.21%、97.92%、100.37%、99.92%、99.66%、99.84%、99.97%, RSD 值分别为 0.067%、0.87%、1.69%、1.96%、1.65%、0.88%、1.73%、1.77%、0.93%、0.42%。

(6) 含量测定: 制备 3 批葛根芩连汤, 每批平行测定 3 次, 进样测定峰面积, 计算各批次各成分含量, 结果表明葛根素、大豆苷、甘草苷、药根碱、黄芩苷、巴马汀、小檗碱、黄芩素、甘草酸、汉黄芩素的质量分数分别为 1.677、0.154、0.159、0.045、

0.448、0.035、0.095、0.013、0.111、0.006 μg/g,
RSD 值分别为 1.45%、0.21%、0.31%、0.15%、2.48%、
0.26%、0.25%、0.10%、0.31%、0.06%。

2.2 建立 UCRCC 疾病与 NF- κ B 通路的交互网络模型筛选关键炎症因子

通过 Pubmed、ScienceDirect、Web of Science、CNKI 等关键数据库,分别查阅 UCRCC 疾病、NF- κ B 通路的上下游蛋白,采用 Cytoscape 软件分别将 NF- κ B 与 UCRCC 的上下游蛋白作为起点和终点,所建立 NF- κ B 通路与 UCRCC 的交互作用网络如图 2 所示,依据 Betweenness 和 Degree 两项指标,推测 NF- κ B 与 UCRCC 交互作用的关键蛋白,其中综合排名较高的前 8 位炎症因子分别是核因子-p65 (NF- κ Bp65)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、环氧化酶-2 (COX-2)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、细胞间

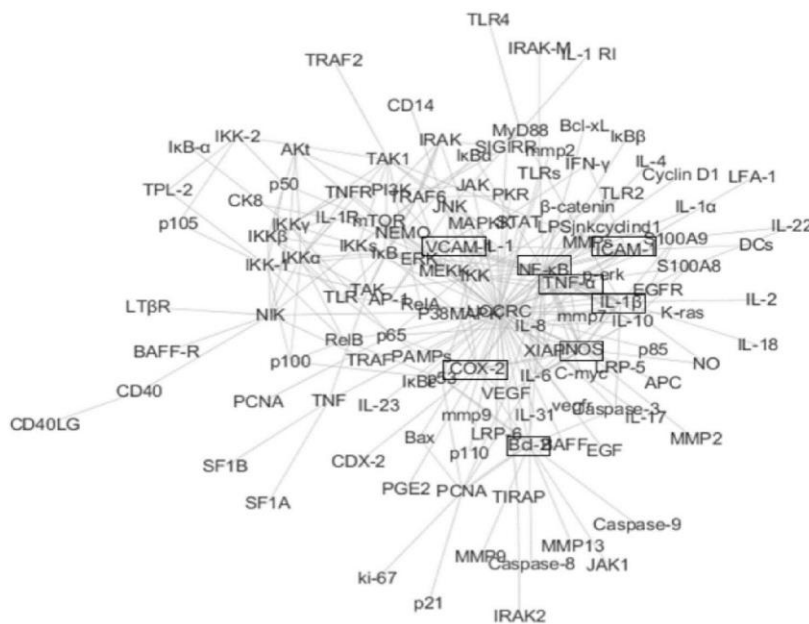
图2 UCRCC与NF- κ B通路交互网络图

Fig. 2 Interaction network between UCRCC and NF- κ B pathway

黏附分子-1 (ICAM-1) 和血管内皮细胞黏附分子 1 (VCAM-1)。以此为依据, 后续实验将对以上 8 项指标进行测定。

2.3 葛根芩连汤对关键炎症因子的影响

2.3.1 葛根芩连汤的制备 同“2.1.3”项下方法。

2.3.2 指标成分组合物的制备 按照所测定成分在复方中的比例进行组方。精密称定葛根素 1.20 mg、大豆苷 1.05 mg、黄芩苷 1.08 mg、黄芩素 1.13 mg、汉黄芩素 1.04 mg、盐酸小檗碱 0.96 mg、盐酸药根碱 0.99 mg、盐酸巴马汀 1.15 mg、甘草苷 0.98 mg、甘草酸 1.06 mg, 溶于 1 mL 甲醇中, 得到指标成分组合物溶液。

2.3.3 分组、造模及给药 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组, 模型组, 葛根芩连汤低、中、高剂量 (成年人以 70 kg 计, 临床剂量为 48 g/d, 按小鼠与人体表面积比值折算, 小鼠 ig 给药的低、中、高剂量分别为 3.12、6.23、12.46 g/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1、2 倍) 组, 葛根芩连汤指标成分组合物组, 5-ASA (临床剂量为 0.58 g/d, 按小鼠与人体表面积比值折算, 小鼠 ig 给药剂量为 0.075 g/kg) 组, 每组 8 只。造模第 1 周, 小鼠 ip 10 mg/kg AOM (用灭菌水溶解), 第 2 周给予含有 2% DSS (用灭菌水溶解) 的饮用水, 自由饮用 4 d, 而后给予正常饮

用水, 每日观察动物状态, 称定质量, 至第 3 周末, 为第 1 个周期循环; 第 4 周开始为第 2 个周期循环; 第 7 周开始为第 3 个周期循环, 制备 UCRCC 模型。药物以水溶解配制成相应浓度的溶液, 自造模同时, 分别于第 2、5、8 周开始, 各给药组每日按剂量 ig 给予药物, 给药体积为 10 mL/kg, 对照组和模型组均 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 2 周。最后 1 个周期休息 10 d 后处死全部小鼠, 取血及结肠组织^[9]。

2.3.4 葛根芩连汤及其指标成分组合物对 UCRCC 小鼠血清炎症因子水平的影响 取小鼠血样, 按酶联免疫试剂盒说明测定小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 水平。结果如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 葛根芩连汤各剂量组、指标成分组合物组以及 5-ASA 组小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)。

2.3.5 葛根芩连汤及其指标成分组合物对 UCRCC 小鼠结肠组织病理变化的影响 将小鼠结肠组织于 4% 多聚甲醛中固定, 后续脱水、石蜡包埋, 连续切片, 厚 4 μ m, 进行 HE 染色, 于光学显微镜下观察各组小鼠结肠组织病理变化。结果如图 3 所示, 对照组小鼠结肠黏膜上皮完整, 黏膜下血管清晰, 腺

表 2 葛根芩连汤对 UCRCC 小鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 、ICAM-1、VCAM-1 水平的影响 (ELISA, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Table 2 Effects of Gegen Qinlian Decoction on TNF- α , IL-1 β , ICAM-1 and VCAM-1 levels in serum of UCRCC model rats (ELISA, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF- α / (ng·mL ⁻¹)	IL-1 β / (ng·mL ⁻¹)	ICAM-1/ (ng·mL ⁻¹)	VCAM-1/ (ng·mL ⁻¹)
对照	—	50.34 $\pm$ 17.36	25.46 $\pm$ 9.82	47.48 $\pm$ 9.19	5.35 $\pm$ 4.28
模型	—	100.22 $\pm$ 16.46 ^{##}	52.52 $\pm$ 11.09 ^{##}	108.04 $\pm$ 16.75 ^{##}	19.78 $\pm$ 15.60 ^{##}
葛根芩连汤	3.12	88.63 $\pm$ 10.37 ^{**}	42.30 $\pm$ 15.93 ^{**}	97.97 $\pm$ 9.34 ^{**}	19.44 $\pm$ 12.60 ^{**}
	6.23	78.38 $\pm$ 13.79 ^{**}	40.50 $\pm$ 15.82 ^{**}	86.99 $\pm$ 12.37 ^{**}	18.77 $\pm$ 5.97 ^{**}
	12.46	76.44 $\pm$ 15.48 ^{**}	30.25 $\pm$ 12.98 ^{**}	63.98 $\pm$ 16.98 ^{**}	14.55 $\pm$ 9.58 ^{**}
5-ASA	0.075	92.93 $\pm$ 15.38 [*]	29.24 $\pm$ 15.93 ^{**}	83.65 $\pm$ 11.18 ^{**}	19.19 $\pm$ 6.51 ^{**}
指标成分组合物	—	85.48 $\pm$ 12.67 ^{**}	47.39 $\pm$ 11.47 [*]	84.56 $\pm$ 18.27 ^{**}	18.68 $\pm$ 4.21 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

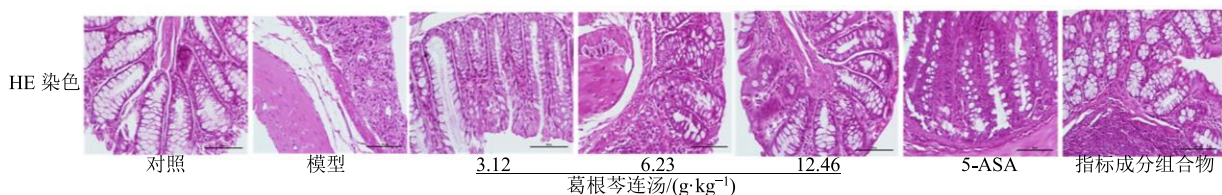


图 3 葛根芩连汤对 UCRCC 小鼠结肠组织病理变化的影响 (×200)

Fig. 3 Effects of Gegen Qinlian Decoction on pathological changes in colonic tissue of UCRCC model rats (×200)

体排列整齐,无溃疡形成。模型组小鼠结肠黏膜上皮脱落,腺体排列紊乱,部分腺体有大范围破坏,黏膜层内有大量炎性细胞浸润,核深染,部分核明显拉长,部分腺体排列紊乱,部分可见增生。葛根芩连汤中、高剂量组、指标成分组合物组及 5-ASA 组大鼠结肠黏膜上皮大部分增生修复,排列较整齐,少量炎细胞浸润。葛根芩连汤低剂量组小鼠结肠黏膜上皮有较大缺损,部分腺体增生,黏膜下层仍可见较多炎性细胞浸润。

2.3.6 葛根芩连汤及其指标成分组合物对 UCRCC 小鼠结肠组织炎性因子水平的影响

将小鼠结肠组织置于 4%多聚甲醛中固定,后续脱水、包埋和切片,加兔抗抗体(按 1:100 稀释),4℃恒温过夜后,37℃下滴加二抗孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min,用滤纸去除多余水分,配制新鲜 AEC 显色,于光学显微镜下观察。结果如图 4 和表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠结肠组织中 NF-κBp65、iNOS、Bcl-2、COX-2 蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,葛根芩连汤低、中、高剂量组、指标成分组合物以及 5-ASA 组 NF-κBp65、iNOS、Bcl-2、COX-2 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$)。

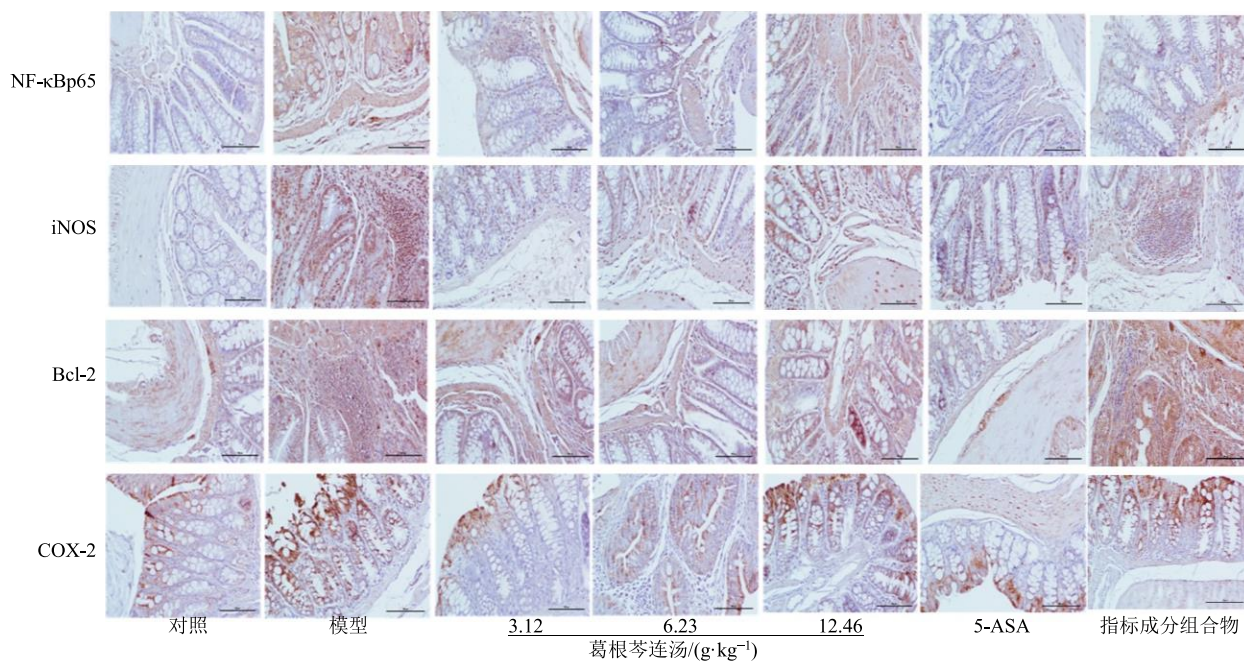


图 4 葛根芩连汤对 UCRCC 小鼠结肠组织 NF-κBp65、iNOS、Bcl-2、COX-2 蛋白表达的影响 (×200)

Fig. 4 Effects of Gegen Qinlian Decoction on pathological changes and expression of NF-κBp65, iNOS, Bcl-2, COX-2 in colonic tissue of UCRCC model rats (×200)

表 3 葛根芩连汤对 UCRCC 小鼠结肠组织 NF-κBp65、iNOS、Bcl-2、COX-2 蛋白表达的影响 (免疫组化法, $\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effects of Gegen Qinlian Decoction on expression of NF-κBp65, iNOS, Bcl-2 and COX-2 in colonic tissue of UCRCC model rats (Immunohistochemistry, $\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	NF-κBp65	iNOS	Bcl-2	COX-2
对照	—	10.89 ± 1.10	9.40 ± 1.80	11.50 ± 1.30	8.40 ± 1.10
模型	—	34.90 ± 2.34 ^{##}	37.80 ± 5.31 ^{##}	46.80 ± 5.93 ^{##}	26.30 ± 6.83 ^{##}
葛根芩连汤	3.12	24.30 ± 1.54 ^{**}	24.40 ± 4.50 ^{**}	27.30 ± 3.64 ^{**}	21.20 ± 1.32 ^{**}
	6.23	19.24 ± 1.92 ^{**}	18.40 ± 6.32 ^{**}	22.80 ± 2.72 ^{**}	19.70 ± 1.64 ^{**}
	12.46	18.84 ± 2.30 ^{**}	17.60 ± 3.10 ^{**}	20.32 ± 2.80 ^{**}	19.40 ± 2.30 ^{**}
5-ASA	0.075	19.81 ± 1.82 ^{**}	18.31 ± 2.00 ^{**}	21.86 ± 2.84 ^{**}	18.60 ± 2.70 ^{**}
指标成分组合物	—	22.17 ± 3.21 ^{**}	20.33 ± 4.32 ^{**}	32.40 ± 7.19 ^{**}	18.50 ± 3.40 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

3 讨论

据统计, 目前全球 UC 的发病率为 (1~2)/万, 随着 UC 患病率的不断上升, 对 UCRCC 的治疗和干预日益成为该领域的热点问题^[15]。其中, 对非可控性炎症恶性转化的调控是重要科学问题。炎症反应在肿瘤发生、发展、恶性转化、侵袭和转移等不同阶段起决定性作用, 作为枢纽中心的 NF- κ B 则是炎症恶性转化的重要因素之一^[17-18]。激活的 NF- κ B 信号主要通过调节癌基因功能; 抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤细胞增殖; 调控肿瘤细胞周期; 调控肿瘤细胞侵袭、黏附、转移、血管形成有关信号因子的表达; 调控其他信号通路, 使细胞去分化, 产生肿瘤起始细胞等方式来影响肿瘤的发生发展。大量研究证实, NF- κ B 既是 UC 的关键途径, 也是 UCRCC 的重要通路。通路中的多数信号因子既促进 UC 的发展, 也参与 UCRCC 的发生发展^[19,21-30]。Greten 等的研究表明, UCRCC 模型小鼠结肠黏膜中 NF- κ B 表达上调, 抑制 NF- κ B 通路可明显减少结肠炎症及肿瘤的形成, IKK β 基因敲除小鼠肿瘤形成的数量也明显减少, IKK/NF- κ B 通路的特异性失活可减少炎症相关肿瘤的形成^[31-32]。课题组前期研究表明, 葛根芩连汤及其药效物质通过 NF- κ B 信号通路干预 UC, 推测葛根芩连汤可能也通过该通路干预 UCRCC。

近年来, 中药科技工作者针对中药质量控制做了大量研究工作。随着新手段、新技术的应用, 中药质量控制研究水平得到了很大提升, 如建立了基于中药药效物质筛选与辨识的质量控制模式、基于体内过程的中药质控模式、基于谱效关系为指导的中药质控模式、基于生物学技术的中药质量控制思路以及基于计算机新技术的中药质控模式等。上述研究思路是中药质量控制领域的阶段性成就, 对中药发展起到了良好的助推作用, 但仍存在许多问题, 如质控指标与中药的安全性、有效性关联性不强, 有效性指标如何选择, 研究思路、方法如何有效整合等^[33-34]。随着 Q-marker 的提出, 出现了整合多种研究思路的“基于中药质量标志物的质控模式”, 为中药质量控制提出了新的研究模式与思路, 有利于建立中药全程质量控制体系。中药质量标志物是指存在于中药材和中药产品中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质, 可作为反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制; 而不是经过生物体内过程被吸收的化学

物质和所产生的化学物质, 需要经过结构分析确定其化学结构, 并可进行定性定量的特有的化学成分。中药质量标志物的基本条件是中药材和中药产品中固有存在的或加工制备过程中形成的化学物质, 与中药功能属性密切相关, 即有效性和可控性^[6]。因此, 本研究关注的是如何将药效与质量标示相统一, 如何在众多的药效指标中筛选 Q-marker。本研究以葛根芩连汤为载体, 从 Q-marker 的角度出发, 以期在传统经验方剂的质量评价提供参考。本研究在对葛根芩连汤化学物质组分研究基础上, 将“药效”这一关键要素融入到质量评价的研究中。然而, 在众多药效学指标中筛选关键的靶标是极为重要的环节, 因此, 在前期工作基础之上, 本研究借用网络药理学方法, 首先在 UCRCC 疾病与 NF- κ B 通路交互网络中寻找关键炎症靶标, 进而采用免疫组化、ELISA 等方法对葛根芩连汤及其指标成分组合物对关键炎症靶标的药理作用进行研究。课题组后续将通过谱-效关联等多种方法进一步明确 Q-marker, 并进行等效性、安全性等多方面的验证。

参考文献

- [1] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [2] 刘昌孝. 从中药资源-质量-质量标志物认识中药产业的健康发展 [J]. 中草药, 2016, 47(18): 3149-3154.
- [3] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设 [J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676.
- [4] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, et al. Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 349-356.
- [5] 张铁军, 许 浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.
- [6] 张铁军, 白 钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-marker) 研究路径 [J]. 中草药, 2018, 49(1): 1-13.
- [7] Li W, Polachi N, Wang X, et al. A quality marker study on salvianolic acids for injection [J]. *Phytomedicine*, 2018, 44: 138-147.
- [8] 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 等. 多元统计及“成分-靶点-疾病”在线关联分析脑心通胶囊中质量标志物 [J]. 中草药, 2018, 49(12): 2775-2785.
- [9] 王琼琚, 谢伟容, 郇艳妮, 等. 基于 Q-Marker 成分定性 & 定量的双黄连制剂质量评价 [J]. 中国实验方剂学杂

- 志, 2017, 23(18): 36-46.
- [10] 徐蓓蕾, 张贵君, 崔向微, 等. 葛根粉的药效学实验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(5): 99-101.
- [11] 徐蓓蕾, 张贵君, 崔向微, 等. 葛根芩连汤药效组分抑菌生物效价测定 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 230-233.
- [12] Xu B, Zhang G, Ji Y. Active components alignment of GegenQinlian Decoction protects ulcerative colitis by attenuating inflammatory and oxidative stress [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 162: 253-260.
- [13] Bewtra M, Kaiser L M, TenHave T, et al. Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with elevated standardized mortality ratios: A meta-analysis [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2013, 19(3): 599-613.
- [14] Van Der Kraak L, Gros P, Beauchemin N. Colitis-associated colon cancer: Is it in your genes [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(41): 11688-11699.
- [15] Rogler G. Chronic ulcerative colitis and colorectal cancer [J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(2): 235-241.
- [16] Mangerich A, Dedon P C, Fox J G, et al. Chemistry meets biology in colitis-associated carcinogenesis [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(11): 958-986.
- [17] 苏婧玲, 刘占举. 溃疡性结肠炎相关结直肠癌变机制研究进展 [J]. 世界华人消化病杂志, 2010, 18(9): 2008-2012.
- [18] Sergei I G, Florian R G, Michael K. Immunity, Inflammation, and Cancer [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 883-899.
- [19] Postler T S, Ghosh S, Bridging the gap: A regulator of NF- κ B linking inflammation and cancer [J]. *J Oral Biosciences*, 2015, 57(3): 143-147.
- [20] Neufert C, Becker C, Neurath M F. An inducible mouse model of colon carcinogenesis for the analysis of sporadic and inflammation-driven tumor progression [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(8): 1998-2004.
- [21] Huang W S, Yang J T, Lu C C, et al. Fulvic acid attenuates resistin-induced adhesion of HCT-116 colorectal cancer cells to endothelial cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 29370-29382.
- [22] Meng F, Tan S, Liu T, et al. Predictive significance of combined LAPTM4B and VEGF expression in patients with cervical cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 4849-4855.
- [23] Schwitalla S, Fingerle A A, Cammareri P, et al. Intestinal tumorigenesis initiated by dedifferentiation and acquisition of stem-cell-like properties [J]. *Cell*, 2013, 152(1/2): 25-38.
- [24] Yang H L, Huang P J, Liu Y R, et al. *Toona sinensis* inhibits LPS-induced inflammation and migration in vascular smooth muscle cells via suppression of reactive oxygen species and NF- κ B signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 901315.
- [25] Sakthivel K M, Guruvayoorappan C. Amentoflavone inhibits iNOS, COX-2 expression and modulates cytokine profile, NF- κ B signal transduction pathways in rats with ulcerative colitis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(3): 907-916.
- [26] Saxena A, Shoeb M, Tammali R, et al. Aldose reductase inhibition suppresses azoxymethane-induced colonic premalignant lesions in C57BL/KsJ-db/db mice [J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(1): 141-147.
- [27] Chowdhury R, Gales D, Valenzuela P, et al. Bromoethylindole (BEI-9) redirects NF- κ B signaling induced by camptothecin and TNF α to promote cell death in colon cancer cells [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(12): 1553-1563.
- [28] Ai X Y, Qin Y, Liu H J, et al. Apigenin inhibits colonic inflammation and tumorigenesis by suppressing STAT3-NF- κ B signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 100216-100226.
- [29] Zhou P, Wang C, Hu Z, et al. Genistein induces apoptosis of colon cancer cells by reversal of epithelial-to-mesenchymal via a Notch1/NF- κ B/slugg/E-cadherin pathway [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 813.
- [30] Tarhouni-Jabber S, Zakraoui O, Ioannou E, et al. Mertensene, a halogenated monoterpene, induces G2/M cell cycle arrest and caspase dependent apoptosis of human colon adenocarcinoma HT29 cell line through the modulation of ERK-1/-2, AKT and NF- κ B signaling [J]. *Mar Drugs*, 2017, 15(7): 221.
- [31] Greten F R, Arkan M C, Bollrath J, et al. NF- κ B is a negative regulator of IL-1 β secretion as revealed by genetic and pharmacological inhibition of IKK β [J]. *Cell*, 2007, 130(5): 918-931.
- [32] Greten F R, Eckmann L, Greten T F, et al. IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer [J]. *Cell*, 2004, 118(3): 285-296.
- [33] 李德坤, 苏小琴, 李智, 等. 注射用益气复脉(冻干)的质量标志物研究 [J]. 中草药, 2019, 50(2): 290-298.
- [34] 肖培根, 王永炎. 加速中药研究的创新步伐 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2047-2047.