

基于质量标志物 (Q-Marker) 理论的满药质量评价方法构建及其在核桃楸皮中的应用

王诗蒙¹, 张强¹, 李媛媛¹, 包永睿^{1,2,3,4}, 王帅^{1,2,3,4}, 李天娇^{1,2,3,4}, 许海玉^{1,4}, 孟宪生^{1,2,3,4*}

1. 辽宁中医药大学, 辽宁 大连 116600

2. 辽宁省中药多维分析专业创新技术中心, 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600

4. 天津市中药质量标志物重点实验室辽宁分中心, 辽宁 大连 116600

摘要: **目的** 构建一套基于质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 理论、兼顾化学属性及药效相关性的满药功效关联质量评价方法, 并以核桃楸皮抗肝癌药效评价为例验证其适用性。 **方法** 按照功效导向的核心药效部位界定、物质基础解析与候选 Q-Marker 物质库构建、候选成分药效代表性验证、体内有效性与安全性评价的递进路径, 建立质量评价方法。以核桃楸皮为例, 采用 CCK-8、划痕和 Transwell 实验筛选抗肝癌药效部位; 采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术解析物质成分; 结合前期谱效关系、网络药理学、分子对接分析、单体及配伍实验筛选并验证候选 Q-Marker; 采用 H22 荷瘤小鼠评价体内药效与安全性; 采用 HPLC 方法对从核桃楸皮中筛选的 Q-Marker 进行定量分析。 **结果** 所构建方法形成了“药效定位-成分解析-功效验证-体内确证”的多层次证据链。在核桃楸皮应用中, 醋酸乙酯部位在 0.6 mg/mL 时对 HepG2 细胞增殖的抑制率为 92.6%, 且对细胞迁移和侵袭的抑制作用较强; 共鉴定没食子酸、丁香酸、槲皮素、鞣花酸和山柰酚等 17 种成分; 综合化学结构、可测性、前期谱效关系、网络药理学及体外药效结果, 筛选丁香酸、鞣花酸和山柰酚为候选 Q-Marker, 其配伍组分可表征醋酸乙酯部位 76.3% 的体外抗肿瘤活性; H22 荷瘤小鼠实验中, 醋酸乙酯部位高剂量组抑瘤率为 60.42%, 与模型组相比, 高剂量组血清白细胞介素-2 (interleukin-2, IL-2) 水平显著升高至 (227.85 ± 1.92) pg/mL, IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平分别降低至 (71.76 ± 2.86) pg/mL 和 (384.19 ± 4.74) pg/mL ($P < 0.01$), 脾脏指数和胸腺指数分别升高至 (3.965 ± 1.594) 和 (3.079 ± 1.366) mg/g ($P < 0.01$), 并改善肿瘤组织病理改变。 **结论** 构建了基于 Q-Marker 理论的满药功效关联质量评价方法, 并以核桃楸皮为例验证了方法的可行性。优选出的 3 种候选 Q-Marker 可作为核桃楸皮抗肝癌质量控制的重点指标, 为满药及相关制剂由单一成分控制向功效关联的多成分质量评价转变提供参考。

关键词: 满药; 质量标志物; 质量评价方法; 核桃楸皮; 肝细胞癌; H22 荷瘤小鼠; 丁香酸; 鞣花酸; 山柰酚

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)20-8350-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.20.032

Construction of quality evaluation method for Manyao based on Q-Marker theory and its application in *Cortex Juglandis Mandshuricae*

WANG Shimeng¹, ZHANG Qiang¹, LI Yuanyuan¹, BAO Yongrui^{1,2,3,4}, WANG Shuai^{1,2,3,4}, LI Tianjiao^{1,2,3,4}, XU Haiyu^{1,4}, MENG Xiansheng^{1,2,3,4}

1. School of Pharmacy, Liaoning University of TCM, Dalian 116600, China

2. Professional Innovation Technology Center for Multidimensional Analysis of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

3. Liaoning Province Modern Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China

4. Liaoning Branch Center of Tianjin Key Laboratory of Quality Markers for Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To establish an efficacy-linked quality evaluation method for Manyao based on Q-Marker theory, comprehensively considering chemical properties and pharmacodynamic correlation, and to verify its applicability by evaluating the anti-hepatocellular carcinoma efficacy of *Cortex Juglandis Mandshuricae*. **Methods** The quality-evaluation system was constructed

收稿日期: 2026-08-16

基金项目: 辽宁省科技厅揭榜挂帅 (科技攻关专项) (2021JH1/10400058)

作者简介: 王诗蒙, 女, 硕士研究生, 研究方向为药效物质组学和作用机制整合。E-mail: 289897054@qq.com

*通信作者: 孟宪生, 男, 博士, 教授, 研究方向为药效物质组学和作用机制整合。E-mail: mxsvvv@126.com

following the progressive workflow: definition of core pharmacodynamic fractions guided by efficacy, analysis of material basis and establishment of the candidate Q-Marker library, verification of pharmacodynamic representativeness for candidate components, as well as *in vivo* efficacy and safety evaluation. Taking *Cortex Juglandis Mandshuricae* as the research object, CCK-8, wound-healing and Transwell assays were adopted to screen its anti-hepatocellular-carcinoma active fraction. UPLC-Q-TOF-MS was used for chemical-component identification. Candidate Q-Markers were screened and validated by combining spectrum-effect relationship, network pharmacology, molecular docking, monomer and compatibility experiments. H22 tumor-bearing mice were utilized to assess *in vivo* antitumor efficacy and biosafety. HPLC was used to quantify the selected Q-Markers from *Cortex Juglandis Mandshuricae*.

Results The established method formed a multi-layered evidence chain consisting of pharmacodynamic localization, component identification, efficacy validation and *in vivo* confirmation. For *Cortex Juglandis Mandshuricae*, the ethyl acetate fraction inhibited HepG2 cell proliferation by 92.6% at 0.6 mg/mL and showed strong inhibitory effects on cell migration and invasion. Seventeen constituents, including gallic acid, syringic acid, quercetin, ellagic acid, and kaempferol, were identified. Based on chemical structure, measurability, previous spectrum-effect relationship analyses, network pharmacology, and *in vitro* pharmacodynamic results, syringic acid, ellagic acid, and kaempferol were selected as candidate Q-Markers. Their combination accounted for 76.3% of the *in vitro* antitumor activity of the ethyl acetate fraction. In H22 tumor-bearing mice, the high-dose ethyl acetate fraction achieved a tumor inhibition rate of 60.42%. Compared with the model group, serum IL-2 levels increased to (227.85 ± 1.92) pg/mL, while IL-6 and TNF- α levels decreased to (71.76 ± 2.86) pg/mL and (384.19 ± 4.74) pg/mL, respectively ($P < 0.01$). The spleen and thymus indices increased to (3.965 ± 1.594) and (3.079 ± 1.366) mg/g, respectively ($P < 0.01$), and histopathological changes in tumor tissues were ameliorated. **Conclusion** This study constructs an efficacy-associated quality evaluation approach for Manchu medicinal herbs on the basis of Q-Marker theory, whose feasibility is verified via the case of *Cortex Juglandis Mandshuricae*. The three selected candidate Q-Markers can serve as core indicators for the anti-hepatocellular-carcinoma quality control of *Cortex Juglandis Mandshuricae*. This research provides a reference for shifting from single-component-based control to efficacy-linked, multi-component quality evaluation of Manyao and their related preparations.

Key words: Manyao; Q-Marker; quality evaluation method; *Cortex Juglandis Mandshuricae*; hepatocellular carcinoma; H22 tumor-bearing mice; syringic acid; ellagic acid; kaempferol

中药及民族药物物质基础复杂, 临床效应通常由多成分、多靶点和多通路共同作用形成, 仅依据单一成分含量进行质量控制, 往往难以准确表征其整体质量和功效一致性。中药质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 理论提出, 能够表征中药质量的关键成分应具有来源明确、结构清晰、质量可测、体内可达、药效相关及机制可解释等属性, 为质量评价由“化学成分控制”向“功效关联控制”转变提供了理论基础^[1-3]。满族医药是我国民族医药的重要组成部分, 具有鲜明的民族特色和传统用药经验, 在药物资源开发与临床应用方面具有一定的研究价值^[4]。然而, 满药资源种类多、传统应用特色突出, 目前仍缺乏能够贯通药效定位、体内外物质基础、功效验证与安全性评价的系统化研究路径^[5]。

基于上述理论, 本研究构建了基于 Q-Marker 的满药功效关联质量评价方法。该方法以目标功效为牵引, 设置 4 个递进模块: 首先通过分级提取和多指标药效评价界定核心药效物质范围; 随后结合化学成分析筛选来源明确的候选成分; 继而结合谱

效关系、网络药理学以及单体与配伍药效实验, 评价候选成分的药效代表性; 最后通过动物实验验证药效部位的体内有效性与安全性。各模块共同形成“药效定位-成分析-候选筛选-功效验证-体内确证”的证据链, 可用于筛选能够表征满药整体功效的 Q-Marker。

核桃楸皮 *Cortex Juglandis Mandshuricae* 为胡桃科植物核桃楸 *Juglans mandshurica* Maxim. 的干燥枝皮或干皮, 是东北地区具有代表性的满族传统药材^[6]。历代本草及满医药文献记载其具有清热解毒、散结消肿等功效; 现代研究表明其富含酚酸类、黄酮类、萜醌类及三萜类等成分, 具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和免疫调节等活性^[7-8]。现行地方标准主要以没食子酸等单一成分作为其质量控制指标, 难以体现多成分协同作用, 也难以建立药材质量与实际功效之间的关联。

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌的主要病理类型, 也是全球癌症相关死亡的重要原因之一^[9]。由于早期缺乏特异性临床表现, 部分患者确诊时已处于中晚期, 且现有手术、

局部治疗、靶向治疗和免疫治疗常面临复发、耐药及不良反应等问题^[10-11]，从而导致治疗效果不佳。核桃楸皮具有较明确的传统抗肿瘤应用基础和现代药理证据，以抗肝细胞癌作用作为目标药效^[12]，可作为代表性实例，基于其明确药效检验本研究构建质量评价方法的可操作性。

因此，本研究以核桃楸皮抗肝细胞癌质量评价为例，依次开展核心药效部位筛选、成分解析、候选 Q-Marker 物质库构建、机制与药效代表性验证以及 H22 荷瘤小鼠体内有效性和安全性评价，旨在验证所构建方法的可行性，并筛选能够表征核桃楸皮抗肝细胞癌药效的候选 Q-Marker，为满药及相关制剂质量标准提升提供理论依据和技术路径。

1 仪器与材料

UPLC-Q-TOF-MS 系统 (Agilent 1290 Infinity LC/6545 Q-TOF, 美国 Agilent Technologies); Agilent 1260 高效液相色谱仪; 311 型 CO₂ 恒温培养箱 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限责任公司]; Ti-Eclipse 型倒置荧光显微镜 (日本尼康株式会社); MD M2e 型酶标仪 [帝肯 (上海) 实验器材有限公司]; Legend Micro 17R 型高速冷冻离心机 (德国 Thermo Electron LED GmbH)。

对照品丁香酸 (批号 WP23091312)、鞣花酸 (批号 WP23042614) 及山柰酚 (批号 WP25012712) 购自成都维科奇生物科技有限公司，质量分数均 ≥ 98%。乙腈、甲醇、甲酸购自 Merck 公司；超纯水

由 Milli-Q 超纯水系统制备。DMEM 高糖培养基 (批号 MA0212)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 PWL217)、青链霉素-链霉素双抗 (批号 PWL062) 及胰蛋白酶 (批号 MA0234) 购自大连美仑生物有限公司；Matrigel 基质胶 (批号 G4131) 购自武汉赛维尔生物有限公司。

核桃楸皮药材由丹东药业集团提供，经辽宁中医药大学张建逵教授鉴定为胡桃科植物核桃楸 *J. mandshurica* Maxim. 的干燥枝皮 (或干皮)，粉碎后过 60 目筛，密封避光保存备用。

人肝癌 HepG2 细胞购自武汉赛维尔生物有限公司。SPF 级昆明小鼠 (18~22 g) 购自辽宁长生生物科技股份有限公司 (实验动物许可证号: SCXK (辽) 2022-0001)，动物实验经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准后实施 (批准号 210000620240216)，实验过程符合国家实验动物管理规范。

2 方法

2.1 基于 Q-Marker 理论的满药质量评价方法设计 (以核桃楸皮为例)

围绕 Q-Marker “专属性、有效性、可测性、溯源性、传递性” 的基本要求，将满药质量评价过程划分为 4 个递进模块。首先明确各模块的一般性评价目标与筛选标准，再以核桃楸皮抗肝细胞癌研究为实例分别开展具体实验，从而形成由药效定位到体内确证的完整证据链，构建基于 Q-Marker 理论的满药质量评价方法。本研究整体路线见图 1。

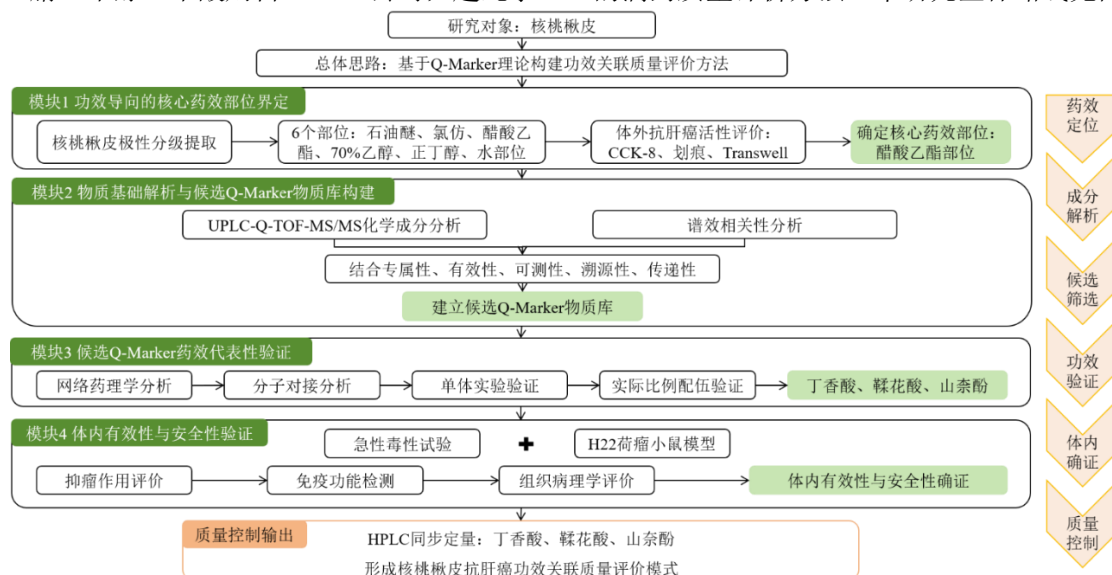


图 1 基于 Q-Marker 理论的满药质量评价方法构建及其在核桃楸皮中的应用

Fig. 1 Development of a Q-Marker theory-based quality evaluation method for Manchu medicine and its application to *Cortex Juglandis Mandshuricae*

2.2 功效导向的核心药效部位界定

该模块用于解决满药化学成分复杂、直接筛选范围过大的问题。通过极性分部或分级制备获得不同物质群,再以与目标功效直接相关的多个药效指标进行综合评价,锁定活性最强的核心药效部位,为后续化学成分解析和 Q-Marker 筛选限定物质范围。

2.2.1 核桃楸皮不同极性部位制备 取核桃楸皮药材粉末适量,分别采用石油醚、氯仿、醋酸乙酯、70%乙醇、正丁醇及水依次回流提取。各提取液经减压浓缩后真空干燥,分别得石油醚部位、氯仿部位、醋酸乙酯部位、70%乙醇部位、正丁醇部位及水部位提取物。各提取物用少量 DMSO 溶解,并以培养基稀释至所需浓度,终浓度的 DMSO 体积分数控制在 0.1% 以下。

2.2.2 核桃楸皮抗肝细胞癌核心药效部位筛选 以核桃楸皮抗肝细胞癌活性为评价指标,采用 CCK-8 法、细胞划痕实验及 Matrigel-Transwell 实验分别评价核桃楸皮不同极性部位提取物对 HepG2 细胞增殖、迁移及侵袭能力的影响。

采用 CCK-8 法检测不同极性部位对 HepG2 细胞增殖的影响,取对数生长期 HepG2 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,进行分组处理。实验分为空白组、细胞对照组及供试品细胞组。空白组加入相应溶剂及培养基,不含细胞;细胞对照组加入相应溶剂处理的 HepG2 细胞;给药组分别加入石油醚部位、氯仿部位、醋酸乙酯部位、70%乙醇部位、正丁醇部位及水部位提取物,使各提取物终质量浓度均为 0.6 mg/mL。按照 CCK-8 试剂盒说明书测定各孔吸光度(A)值,并计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{细胞对照}} - A_{\text{空白}})$$

采用细胞划痕实验评价各部位对 HepG2 细胞迁移能力的影响。细胞贴壁并形成单层后划痕,清洗去除脱落细胞,实验分为细胞对照组及 6 种极性部位供试品组。细胞对照组加入含相应溶剂的培养基;各供试品组分别加入石油醚部位、氯仿部位、醋酸乙酯部位、70%乙醇部位、正丁醇部位及水部位提取物,使各提取物终质量浓度均为 0.6 mg/mL。于规定时间拍照记录划痕变化,并计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (0 \text{ h 划痕面积} - 24 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

采用 Matrigel-Transwell 实验评价各部位对 HepG2 细胞侵袭能力的影响。将基质胶包被于

Transwell 小室上室,并分别加入相应供试品,使各极性部位提取物终质量浓度均为 0.6 mg/mL;下室加入含血清培养基作为趋化条件,培养结束后,擦除上室未穿膜细胞,对穿膜细胞固定、染色,在显微镜下随机选取多个视野计数。

$$\text{相对侵袭率} = \text{给药组穿膜细胞数} / \text{溶剂对照组穿膜细胞数}$$

$$\text{侵袭抑制率} = 1 - \text{相对侵袭率} / 100$$

综合 3 项实验结果,以抗肝细胞癌活性最强的部位作为后续药效物质基础解析和候选 Q-Marker 筛选对象。

2.3 物质基础解析与候选 Q-Marker 物质库构建

该模块用于明确药效物质基础。采用高分辨质谱解析核心药效部位的化学组成,结合结构明确性、质量可测性及既往功效证据建立候选 Q-Marker 物质库。根据模块 1 考察结果,依次对所确定的核桃楸皮抗肝细胞癌核心药效部位进行体外化学成分和给药后血清原型成分鉴定。

2.3.1 核桃楸皮抗肝细胞癌核心药效部位体外化学成分分析 取醋酸乙酯部位适量,甲醇溶解,制成质量浓度为 0.02 g/mL 的溶液,经 0.22 μm 滤膜滤过后采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析。根据保留时间、精确质量分数及 MS/MS 碎片信息,结合 MassBank、PubChem 数据库及文献资料进行化合物鉴定。

(1) 色谱条件:色谱柱为 Agilent poroshell SB-C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 4.6 mm, 2.7 μm);流动相:正离子模式下为 0.1% 甲酸水 (A)-甲醇 (B),负离子模式下为水 (A)-甲醇 (B);梯度洗脱程序:0~2 min, 10%~15% B; 2~4 min, 15%~19% B; 4~9 min, 19%~36% B; 9~12 min, 36%~37% B; 12~14 min, 37%~38% B; 14~30 min, 38%~70% B; 30~43 min, 70%~87% B; 43~55 min, 87%~100% B; 体积流量 0.4 mL/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 0.5 μL 。

(2) 质谱条件:采用 ESI 离子源;分别在正、负离子模式下采集数据:正离子模式下毛细管电压为 4 000 V,负离子模式下为 3 500 V;干燥气体体积流量为 13 L/min;干燥气体温度为 250 $^{\circ}\text{C}$;雾化器压力为 310 kPa;鞘气温度为 350 $^{\circ}\text{C}$;鞘气体积流量为 11 L/min;碎裂电压为 125 V;在 m/z 100~1 500 进行检测,碰撞电压为 20 eV。

2.3.2 核桃楸皮抗肝细胞癌候选 Q-Marker 物质库构建 综合核桃楸皮醋酸乙酯部位的成分鉴定结果,并结合化合物结构明确性、质量可测性、课题

组前期谱效关系结果及文献药效证据,建立候选 Q-Marker 物质库,筛选进入药效代表性与机制验证模块的重点候选成分。

2.4 候选 Q-Marker 药效代表性验证

该模块旨在验证候选成分与目标功效之间的关联,回答候选成分“是否能够代表整体功效”以及“其作用是否具有合理机制解释”2 个问题。在核桃楸皮实例中,首先通过网络药理学预测候选成分的关键靶点和通路,再采用单体及 3 种成分按照课题组前期实测含量比例配伍的体外药效实验,评价候选成分对核心药效部位整体活性的贡献。

2.4.1 网络药理学分析及分子对接验证 依据候选 Q-Marker 化学结构信息,通过 SwissTargetPrediction 预测潜在作用靶点;利用 GeneCards、OMIM、TTD、DrugBank 及 PharmGKB 数据库检索肝癌相关靶点。采用 Venny 平台筛选药物-疾病交集靶点,导入 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein-protein interaction, PPI),利用 Cytoscape 软件进行拓扑学分析并筛选核心靶点;采用 Metascape 平台进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,构建“候选 Q-Marker-靶点-通路”调控网络。采用 AutoDock Vina 软件对筛选的 Q-Marker 与相关性较高的靶点进行分子对接验证。

2.4.2 核桃楸皮抗肝细胞癌候选 Q-Marker 体外药效代表性验证 结合课题组前期谱效关系结果、候选物质库及文献药效证据,选择丁香酸、鞣花酸和山柰酚进行体外验证。依据课题组前期实验测定的核桃楸皮醋酸乙酯部位中 3 种成分的含量结果,按照实测含量比例(丁香酸:鞣花酸:山柰酚=2.11:0.95:1.97)制备混合组分,混合组分中 3 个单体的质量浓度分别为 0.252、0.113、0.235 mg/mL。另分别设置丁香酸、鞣花酸和山柰酚单体组,各单体组的给药质量浓度均为 0.6 mg/mL;同时设置混合组分和核桃楸皮醋酸乙酯部位组,二者的给药质量浓度均为 0.6 mg/mL。采用 HepG2 细胞增殖实验评价各组的体外抗增殖作用,并以混合组分的细胞增殖抑制率与醋酸乙酯部位的细胞增殖抑制率之比,评价候选 Q-Marker 组合对醋酸乙酯部位整体抗增殖作用的相对表征程度。

2.5 体内安全性与有效性验证

该模块用于在整体动物水平验证核心药效部位的有效性和安全性,为候选 Q-Marker 与实际药效之间建立进一步的体内证据。评价内容包括一般

毒性、主要脏器安全性、肿瘤生长抑制、免疫功能及组织病理学变化。在核桃楸皮实例中,首先评价醋酸乙酯部位的急性毒性,再从抑瘤率、免疫功能和组织病理学等方面验证其体内抗肝细胞癌作用。

2.5.1 核桃楸皮醋酸乙酯部位急性毒性试验 采用昆明小鼠评价核桃楸皮醋酸乙酯部位的急性毒性。实验动物随机分为空白组和给药组(10.53 g/kg,以生药 9 g 的临床人用等效剂量扩大 9 倍计),每组 10 只,雌雄各半。给药组小鼠按 10 mL/kg 进行 ig 给药,2 次/d,空白组 ig 等体积的蒸馏水。给药后 4 h 内密切观察小鼠的行为状态,每天观察记录小鼠的行为表现、中毒反应及死亡情况。于第 1、3、5、7、9、11、14 d 记录小鼠的体质量、摄食量及饮水量。观察结束后采用颈椎脱臼的方法处死小鼠,确认小鼠死亡后,解剖主要脏器称定质量,计算脏器指数,并对肝脏、肾脏组织进行病理学检查。

2.5.2 H22 荷瘤小鼠模型建立及药效评价 取对数生长期 H22 肝癌细胞制备细胞悬液,接种于雄性昆明小鼠右腋下建立荷瘤模型。另取 10 只未接种 H22 肝癌细胞的小鼠作为空白组。接种后观察小鼠一般状态及接种部位变化,以接种部位出现可触及的肿瘤结节作为初步判定依据。造模成功后,将荷瘤小鼠随机分为模型组(相应溶剂)、环磷酰胺(0.02 g/kg)组及核桃楸皮醋酸乙酯部位低、中、高(1.17、3.51、10.53 g/kg)剂量组,每组 10 只。各组连续灌胃(ig)14 d,末次给药后称量瘤体质量,按公式计算抑瘤率;测定脾脏指数和胸腺指数;采用 ELISA 法检测血清 IL-2、IL-6 及 TNF- α 水平;取瘤体组织进行 HE 染色观察病理学变化。

抑瘤率=(模型组平均瘤体质量-给药组平均瘤体质量)/模型组平均瘤体质量

2.6 核桃楸皮 Q-Marker 含量测定

2.6.1 供试品溶液制备 取核桃楸皮药材打粉,过 65 目筛,称取 1 g 上述药粉,加入 25 mL 甲醇,称定质量,超声提取 30 min。冷却至室温,用甲醇补足损失质量,过 0.22 μ m 微孔滤膜,取续滤液,即得供试品溶液。

2.6.2 混合对照品溶液制备 精密称取丁香酸、鞣花酸、山柰酚对照品适量,加入甲醇溶解,得对照品储备液。分别取适量对照品溶液,制成质量浓度为丁香酸 0.056 0 mg/mL、鞣花酸 0.044 6 mg/mL、山柰酚 0.063 4 mg/mL 的混合对照品溶液。

2.6.3 色谱条件 Agilent Poroshell 120 SB-C₁₈ (100

mm×4.6 mm, 2.7 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水 (A) - 甲醇 (B), 梯度洗脱: 0~2 min, 15% B; 2~4 min, 15%~19% B; 4~9 min, 19%~36% B; 9~12 min, 36%~37% B; 12~18 min, 37%~38% B; 18~20 min, 38%~50% B; 20~30 min, 50%~70% B; 30~40 min, 70%~100% B; 40~47 min, 100% B; 体积流量为 0.8 mL/min; 柱温为 30 °C; DAD 检测器波长为 265 nm; 进样量为 10 μL。

2.6.4 线性关系考察 取“2.6.2”项下混合对照品溶液, 分别精密稀释, 制备成 6 个不同质量浓度的混合对照品溶液, 按“2.6.3”项下色谱条件测定, 以对照品浓度为横坐标 (x)、峰面积为纵坐标 (y) 绘制标准曲线并考察线性关系。丁香酸、鞣花酸和山柰酚各主峰与相邻杂质峰分离良好, 专属性强。丁香酸、鞣花酸和山柰酚 3 种成分分别在 1.750~56.00、1.394~44.60 和 1.981~63.40 μg/mL 呈良好线性关系, 标准曲线方程依次为 $y=14\,161x+2.811\,4$ ($R^2=0.999\,8$)、 $y=41\,542x-85.97$ ($R^2=0.999\,2$) 和 $y=22\,469x-2.387\,6$ ($R^2=0.999\,2$)。

2.6.5 精密度考察 取“2.6.1”项下同一供试品溶液, 按“2.6.3”项下色谱条件重复进样 6 次, 结果丁香酸、鞣花酸和山柰酚峰面积 RSD 分别为 0.75%、0.61% 和 0.82%, 精密度良好。

2.6.6 稳定性考察 取“2.6.1”项下同一供试品溶液, 分别于制备后 0、2、4、8、12 和 24 h 进样, 按“2.6.3”项下色谱条件测定, 记录丁香酸、鞣花酸和山柰酚的峰面积, 计算 RSD 分别为 0.92%、0.99% 和 1.50%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6.7 重复性考察 精密称取同一批核桃楸皮药材 6 份, 每份 0.5 g, 分别按“2.6.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.6.3”项下色谱条件测定。结果显示, 丁香酸、鞣花酸和山柰酚的平均质量分数分别为 0.116 4、0.559 0 和 0.030 40 mg/g, RSD 分别为 1.30%、0.92% 和 1.60%, 表明该方法重复性良好。

2.6.8 加样回收率考察 精密称取已知各待测成分含量的核桃楸皮药材 6 份, 每份 0.5 g, 分别加入相应量的丁香酸、鞣花酸和山柰酚对照品, 按“2.6.1”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.6.3”项下色谱条件测定。结果显示, 丁香酸、鞣花酸和山柰酚的平均加样回收率分别为 99.5%、99.7% 和 97.8%, RSD 分别为 1.10%、0.90% 和 1.40%, 表明

该方法准确度良好。

2.6.9 含量测定 取 3 批核桃楸皮药材, 按照“2.6.1”项下方法制备供试品溶液, 按照“2.6.3”项下色谱条件进样检测, 计算核桃楸皮药材中 3 种 Q-Marker 的含量。

3 结果

3.1 功效导向的核心药效部位界定

CCK-8 实验结果显示, 与空白组相比, 各极性部位均可不同程度抑制 HepG2 细胞增殖, 其中醋酸乙酯部位抑制作用最显著 ($P<0.01$), 其次依次为 70% 乙醇部位、正丁醇部位、氯仿部位、水部位及石油醚部位 (图 2)。划痕实验结果表明, 醋酸乙酯部位能够显著抑制 HepG2 细胞迁移, 其 24 h 划痕愈合率明显低于其他各组 ($P<0.01$) (图 3-A)。

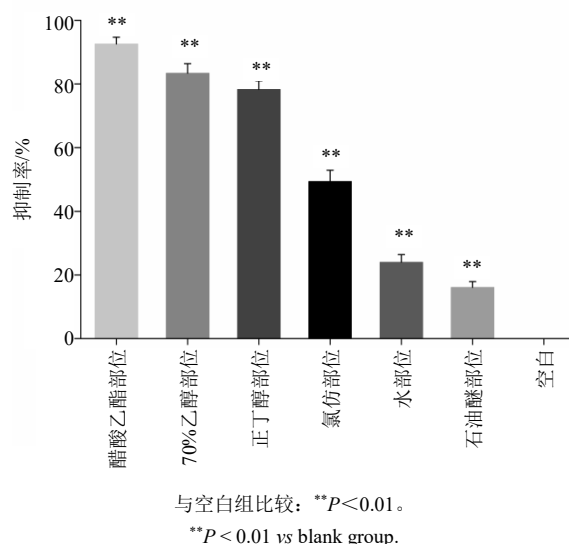


图 2 核桃楸皮各极性部位对人肝癌 HepG2 细胞的抑制率
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Inhibitory effects of different polarity fractions of Cortex Juglandis Mandshuricae on proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Transwell 实验进一步证实, 醋酸乙酯部位可显著减少穿膜细胞数量, 对 HepG2 细胞侵袭具有最强抑制作用 ($P<0.01$) (图 3-B)。综合 3 项实验结果, 醋酸乙酯部位在抑制 HepG2 细胞增殖、迁移及侵袭方面均表现出最佳活性, 因此确定其为核桃楸皮主要抗肝细胞癌药效部位, 并用于后续 Q-Marker 筛选及质量评价研究。

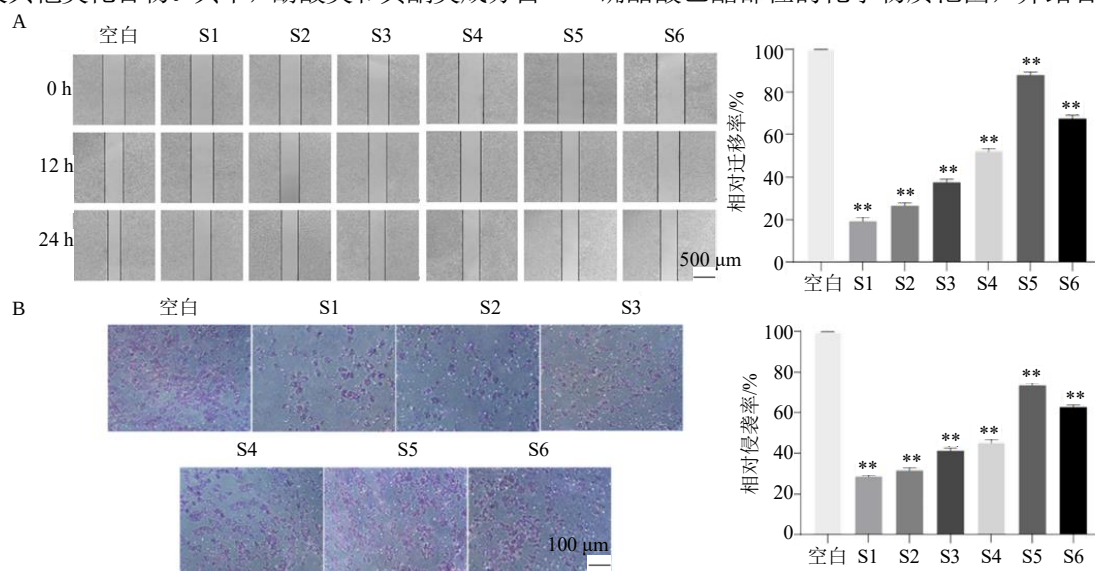
3.2 物质基础解析与候选 Q-Marker 库构建

3.2.1 核桃楸皮醋酸乙酯部位化学成分分析 为明确核桃楸皮抗肝细胞癌药效部位的物质基础, 采

用 UPLC-Q-TOF-MS 对醋酸乙酯部位进行体外化学成分分析。在 ESI 正、负离子模式下采集数据, 获得基峰离子流图, 结果见图 4。通过 MassHunter Qualitative Analysis 软件对色谱数据进行处理, 结合保留时间、精确分子质量、MS/MS 裂解规律、对照品比对及 MassBank、PubChem 数据库和相关文献报道^[7,13-14], 共鉴定出 17 种化学成分(表 1)。根据化学结构特征, 可分为酚酸类、黄酮类、萘醌类、三萜类及其他类化合物。其中, 酚酸类和黄酮类成分占

比较高, 是醋酸乙酯部位的主要化学组成。酚酸类代表性成分包括咖啡酸、丁香酸和鞣花酸; 黄酮类代表性成分包括槲皮苷、槲皮素、山柰酚及柚皮素; 此外, 还鉴定出熊果酸等三萜类成分及少量木脂素类化合物。上述结果表明, 核桃楸皮醋酸乙酯部位具有丰富的化学组成, 为后续 Q-Marker 筛选提供物质基础。

3.2.2 核桃楸皮候选 Q-Marker 物质库构建 根据该模块的筛选原则, 首先以 17 种体外鉴定成分明确醋酸乙酯部位的化学物质范围, 并结合结构明确



S1-醋酸乙酯部位; S2-70%乙醇部位; S3-正丁醇部位; S4-氯仿部位; S5-石油醚部位; S6-水部位, 下同; 与空白组比较: ** $P < 0.01$ 。

S1-ethyl acetate fraction; S2-70% ethanol fraction; S3-*n*-butanol fraction; S4-chloroform fraction; S5-petroleum ether fraction; S6-aqueous fraction, same as below. The same abbreviations are used hereafter; ** $P < 0.01$ vs the blank group.

图3 核桃楸皮不同极性部位对人肝癌 HepG2 细胞迁移 (A) 和侵袭 (B) 影响图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of different polarity fractions of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on migration (A) and invasion (B) of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

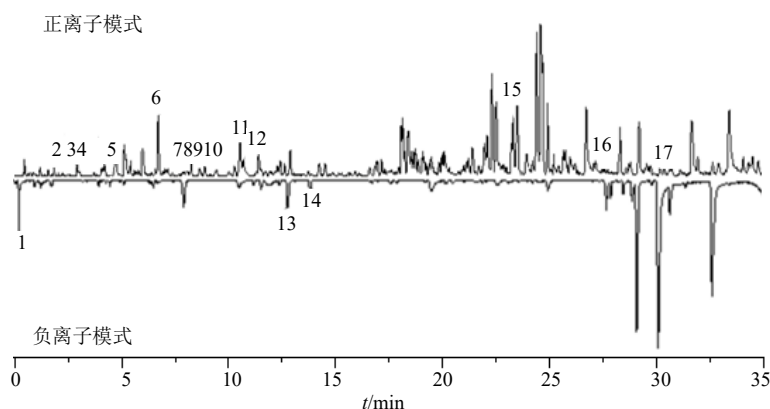


图4 核桃楸皮醋酸乙酯部位正、负离子下的总离子流图

Fig. 4 Total ion chromatograms of the ethyl acetate fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* in positive and negative ion modes

表 1 核桃楸皮醋酸乙酯部位成分分析
Table 1 Chemical composition analysis of ethyl acetate fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae*

序号	tr/min	分子式	离子模式	理论值 (m/z)	实际值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物名称
1*	1.215	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	169.014 3	169.014 2	3.15	125	没食子酸
2	3.492	C ₁₅ H ₁₂ O ₈	[M+H] ⁺	321.060 5	321.058 8	5.32	219, 149, 139	二氢杨梅素
3*	4.738	C ₉ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	199.060 1	199.057 0	15.53	155	丁香酸
4*	5.299	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	195.065 2	195.062 1	15.68	117	阿魏酸
5	7.542	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M+Na] ⁺	473.105 4	473.103 6	3.86	243, 149	落新妇苷
6*	11.867	C ₁₄ H ₆ O ₈	[M+H] ⁺	303.013 6	303.013 5	2.65	303	鞣花酸
7	12.837	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	[M+H] ⁺	319.044 8	319.043 3	4.88	319, 273	杨梅素
8	12.962	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.056 1	287.055 3	2.95	151, 135	香橙素
9	13.087	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M+Na] ⁺	457.110 5	457.108 4	4.64	231, 189	柚皮素-7-O-葡萄糖苷
10	14.083	C ₉ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	181.049 5	181.048 6	5.04	107	咖啡酸
11*	16.887	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+Na] ⁺	471.089 8	471.088 2	3.36	303	槲皮苷
12*	16.949	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺	303.049 9	303.048 5	4.63	257, 137	槲皮素
13*	20.563	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.061 2	271.060 8	1.57	177, 151	柚皮素
14*	22.065	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	285.041 2	285.040 5	2.54	229	山柰酚
15	36.324	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	[M+Na] ⁺	315.193 1	315.193 4	-1.22	107	十八碳三烯-4-酮酸
16	43.926	C ₁₈ H ₂₀ O ₄	[M+H] ⁺	301.143 4	301.139 9	11.77	245	4,4,9-三羟基-7,9-环氧-8,8-木酚素
17	47.352	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M+H] ⁺	457.367 6	457.363 3	9.45	457, 439	熊果酸

*经对照品比对。
*Compounds were identified by comparison with reference standards.

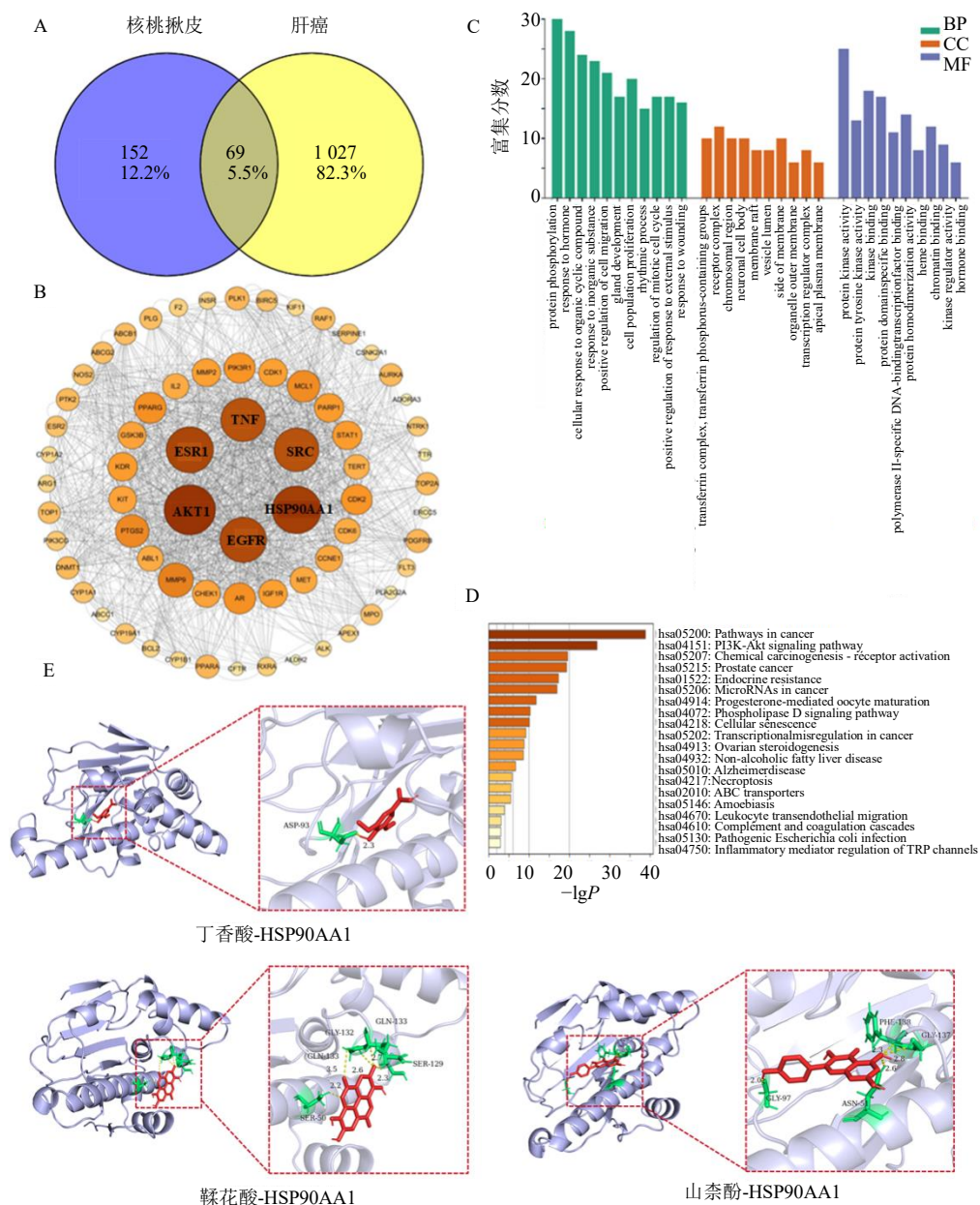
性、质量可测性、前期谱效关系及文献药效证据建立候选 Q-Marker 物质库。综合 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定得到的 17 种醋酸乙酯部位化学成分，逐层收敛候选组分并阐明各成分淘汰依据。一级筛选以“无商品化对照品”为硬性标准，剔除 3 种不达标成分（柚皮素-7-O-葡萄糖苷、十八碳三烯-4-酮酸、4,4,9-三羟基-7,9-环氧-8,8-木酚素），剩余 14 种组分进入二级筛选；二级筛选综合抑瘤活性、药材专属鉴别价值开展综合评分，淘汰没食子酸、熊果酸、槲皮素等 6 种存在体内暴露缺失、药效贡献微弱或植物广谱性缺陷的成分；最终留存丁香酸、鞣花酸、山柰酚。

3.3 候选 Q-Marker 机制可解释性与药效代表性验证

3.3.1 核桃楸皮候选 Q-Marker 潜在靶点筛选 结合文献报道^[15-16]及课题组前期谱效分析^[6,17]表明，丁香酸、鞣花酸及山柰酚不仅具有明确的化学结构和可测性，而且均具有抗肿瘤、抗炎及抗氧化等生物活性。将 3 种化合物导入 SwissTargetPrediction 数据库，共得到 221 个药物靶点。以“liver cancer”为关键词，采用 GeneCards、DrugBank、TTD、OMIM、PharmGKB 数据库收集得到肝癌的潜在靶

点共 1 096 个，通过在线工具绘制韦恩图，如图 5-A 所示，获得核桃楸皮治疗肝癌的 69 个潜在靶点，其中包括蛋白激酶 B1（RAC serine/threonine-protein kinase, AKT1）、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1（heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1）、表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）、雌激素受体 1（estrogen receptor 1, ESR1）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）、SRC 原癌基因非受体型酪氨酸激酶（SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase, SRC）、基质金属蛋白酶 9（matrix metalloproteinase 9, MMP9）、前列腺素内过氧化物合酶 2（prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2）、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶调节亚基 1（phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1）和过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（peroxisome proliferator activated receptor gamma, PPARG）等。

3.3.2 PPI 网络构建与核心靶点筛选 将筛选出的潜在治疗靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 分析，设置种类为“Homo sapiens”，置信度>0.9 构建 PPI 互作网络图，导入 Cytoscape 3.7.2 进行分析，按度



A-潜在靶点与肝癌潜在靶点韦恩图; B-作用靶点蛋白质-蛋白质相互作用网络图; C-排名前 10 的 BP、CC、MF 条目; D-KEGG 富集分析; E-分子对接验证结果。

A-Venn diagram showing the overlap between potential targets of the active constituents and potential therapeutic targets for liver cancer; B-PPI network of the potential therapeutic targets; C-Top 10 enriched terms in BP, CC, and MF; D-KEGG pathway enrichment analysis; E-Molecular docking validation results.

图 5 核桃楸皮活性成分治疗肝癌的网络药理学研究

Fig. 5 Network pharmacology analysis of active constituents of *Cortex Juglandis Mandshuricae* in the treatment of liver cancer

(degree) 值对蛋白网络节点相互作用大小进行排序, 得到核桃楸皮治疗肝癌的关键作用靶点, 见图 5-B。其中, 排名前 10 的靶点有 AKT1、HSP90AA1、EGFR、ESR1、TNF、SRC、MMP9、PTGS2、PIK3R1、PPARG。

3.3.3 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 将核桃楸

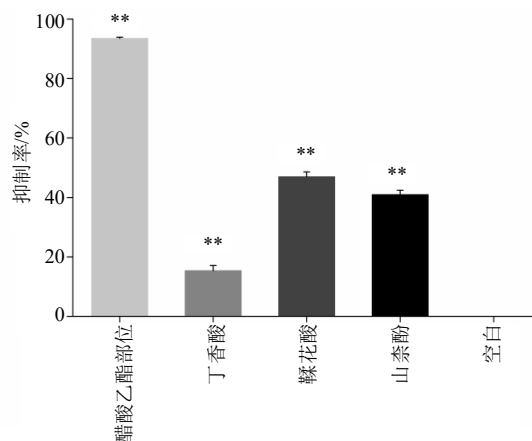
皮疾病与活性成分的交集靶点输入 Metascape 数据库中进行 GO 生物功能分析和 KEGG 通路富集分析。GO 功能分析共得到 4 888 个条目, 其中生物过程有 3 913 个, 细胞组成有 351 个, 分子功能有 624 个。生物过程主要涉及到蛋白质磷酸化、对激素的反应、细胞对有机环化合物的反应等; 分子功能主

要富集在蛋白激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、激酶结合等；细胞组分主要富集在受体复合体、染色体区域、神经元细胞体等。取排名前 10 的生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 条目绘制柱状图, 如图 5-C 所示。KEGG 通路富集分析结果显示, 主要涉及的通路有: 癌症通路 (pathways in cancer, hsa05200)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway, hsa04151)、前列腺癌通路 (prostate cancer, hsa05215) 等, 见图 5-D。

3.3.4 分子对接验证结果 选取排名前 3 的靶点, AKT1 (1UNQ, 0.098 nm)、HSP90AA1 (5J80, 0.117 nm)、EGFR (3G5Y, 0.159 nm) 与候选 Q-Marker 进行分子对接验证。结果显示, 丁香酸、鞣花酸、山柰酚与肝癌核心靶点 AKT1、HSP90AA1、EGFR 的结合能均小于 -4.5 kJ/mol; 其中丁香酸三者结合能依次为 -4.5、-6.2、-5.4 kJ/mol, 鞣花酸为 -6.4、-6.2、-7.2 kJ/mol, 山柰酚为 -5.6、-7.3、-6.8 kJ/mol。三者均显示出与上述靶蛋白较好的结合亲和力, 鞣花酸-EGFR、山柰酚-HSP90AA1 结合亲和力最为突出, 提示三者与肝癌关键靶点存在潜在结合作用, 可为后续机制实验研究提供参考, 为丁香酸、鞣花酸、山柰酚作为核桃楸皮抗肝细胞癌候选 Q-Marker 提供理论支撑。以 3 种成分与 HSP90AA1 的对接结果为例, 进行可视化, 见图 5-E。

3.3.5 候选 Q-Marker 单体对 HepG2 细胞增殖的影响 以丁香酸、鞣花酸和山柰酚 3 种 Q-Marker 为研究对象, 采用 CCK-8 法评价其对 HepG2 细胞增殖的影响, 结果见图 6。与空白组相比, 3 种单体成分均能够不同程度抑制 HepG2 细胞增殖 ($P < 0.01$), 但不同化合物之间药效存在一定差异。其中, 鞣花酸和山柰酚表现出较强的抗肿瘤活性。

3.3.6 候选 Q-Marker 配伍组分体外活性评价 中药药效通常来源于多种活性成分协同作用。为评价候选 Q-Marker 对整体药效的代表性, 根据前期研究中核桃楸皮醋酸乙酯部位中丁香酸、鞣花酸和山柰酚的实际含量确定配伍比例 (丁香酸、鞣花酸和山柰酚 = 2.11 : 0.95 : 1.97)。称取相应质量的丁香酸、鞣花酸和山柰酚, 混合后配制成供试液, 用于后续 CCK-8 法体外抗 HepG2 细胞活性评价。结果显示, 混合组分能够显著抑制 HepG2 细胞增殖, 其抑制率达到 71.3%, 约占醋酸乙酯部位整体抗肿瘤活性的 76.3%。尽管混合组分的活性略低于醋酸乙



与空白组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs the blank group.

图 6 不同组分对 HepG2 细胞的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Inhibitory effects of different fractions and compounds on proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

酯部位, 但已能够较好地代表药效部位的大部分抗肝细胞癌作用, 提示丁香酸、鞣花酸和山柰酚是醋酸乙酯部位的重要药效贡献成分。Q-Marker 不仅应具备明确的化学结构和可测性, 还应具有明确的药效相关性。本研究通过单体药效验证及配伍组分评价, 进一步验证了候选 Q-Marker 的药效代表性。3 种单体均具有一定的抗肝细胞癌活性, 而按原药材比例配伍后能够重现醋酸乙酯部位约四分之三的整体药效, 说明核桃楸皮抗肝细胞癌作用并非依赖单一化学成分, 而是多种活性物质协同作用的结果。

3.4 体内安全性与有效性验证

3.4.1 核桃楸皮醋酸乙酯部位急性毒性评价 对小鼠连续给药 14 d 过程中, 观察到各给药组小鼠精神状态良好, 活动、饮食及饮水正常, 实验期间未见明显中毒症状及死亡现象。实验结束后, 各组小鼠体质量均呈正常增长趋势, 与空白组比较差异无统计学意义, 结果见表 2~4。小鼠主要脏器指数及肝、肾组织 HE 病理学变化结果见表 5、图 7, 各给药组心、肝、脾、肺、肾等主要脏器未见明显异常, 肝细胞排列完整, 肾小球及肾小管结构清晰, 未观察到明显炎症浸润、坏死或组织损伤。综上, 在本实验给药剂量范围内, 核桃楸皮醋酸乙酯部位具有较好的安全性, 可满足后续药效学研究需求。

3.4.2 核桃楸皮醋酸乙酯部位对 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 对 H22 荷瘤小鼠连续给予不同剂量核桃楸皮醋酸乙酯部位干预期间, 模型组小鼠逐渐出现精神萎靡、活动减少、毛发粗乱及体质量增

表 2 核桃楸皮药效部位对小鼠体质量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effects of active fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on body weight in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	性别	体质量/g			
		0 d	5 d	9 d	14 d
空白	雌	20.29±0.47	24.58±0.98	27.30±0.95	29.89±0.76
	雄	18.94±0.34	25.16±0.59	28.07±0.84	31.77±1.27
给药	雌	20.14±0.35	24.81±0.88	27.13±1.18	31.39±1.18
	雄	18.58±0.34	26.05±0.26	29.12±0.99	32.70±1.20

表 3 核桃楸皮药效部位对小鼠摄食量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effects of active fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on food intake in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	性别	摄食量/(g·d ⁻¹)			
		0 d	5 d	9 d	14 d
空白	雌	4.92±0.11	6.80±0.23	7.02±0.27	7.22±0.30
	雄	5.45±0.24	7.28±0.17	7.61±0.23	7.99±0.32
给药	雌	4.99±0.09	6.57±0.23	6.72±0.29	6.98±0.26
	雄	5.10±0.20	7.44±0.07	7.75±0.26	8.09±0.30

表 4 核桃楸皮药效部位对小鼠饮水量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 Effects of active fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on water intake in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	性别	饮水量/(mL·d ⁻¹)			
		0 d	5 d	9 d	14 d
空白	雌	4.77±0.11	6.31±0.25	6.57±0.23	6.84±0.18
	雄	5.68±0.10	7.31±0.17	7.71±0.23	8.01±0.32
给药	雌	4.76±0.08	6.22±0.22	6.50±0.28	6.62±0.25
	雄	5.51±0.10	7.58±0.08	7.79±0.26	8.22±0.30

表 5 核桃楸皮药效部位对小鼠脏器指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 5 Effects of active fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on organ indices in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	性别	心脏指数	肝脏指数	脾脏指数	肺脏指数	肾脏指数
空白	雌	0.54±0.04	4.87±0.30	0.34±0.01	0.71±0.06	1.19±0.02
	雄	0.51±0.01	5.25±0.05	0.29±0.01	0.72±0.01	1.43±0.01
给药	雌	0.49±0.02	4.88±0.33	0.28±0.01	0.51±0.10	1.14±0.04
	雄	0.74±0.14	6.03±0.22	0.37±0.05	0.65±0.05	1.39±0.05

长缓慢等表现,而给药组小鼠整体状态明显改善,活动能力增强,饮食及饮水恢复正常,其中高剂量组改善最为明显。给药结束后剥离瘤体并称定质量,结果见图 7、表 6。模型组瘤体生长迅速,而核桃楸皮醋酸乙酯部位能够抑制肿瘤生长,中、高剂量组显著性差异 ($P < 0.01$),呈一定剂量相关性。高剂量组抑瘤率达到 60.42%,与阳性药组作用趋势一致。瘤体外观观察结果显示,模型组瘤体体积较大,血供丰富;给药组瘤体体积明显缩小,颜色变浅,局部可见不同程度坏死,与抑瘤率结果相一致。

3.4.3 核桃楸皮醋酸乙酯部位对机体免疫功能的影响

为进一步评价核桃楸皮醋酸乙酯部位对荷

瘤小鼠免疫功能的调节作用,测定各组小鼠脾脏指数、胸腺指数及血清炎症因子水平。与空白组相比,模型组脾脏指数及胸腺指数明显降低 ($P < 0.01$),提示荷瘤状态导致机体免疫功能受损。经核桃楸皮醋酸乙酯部位干预后,各剂量组均可不同程度提高脾脏指数和胸腺指数,其中高剂量组改善最为明显 ($P < 0.01$),结果见表 7。ELISA 检测结果显示,与模型组相比,给药组 IL-2 水平明显升高,而 IL-6 和 TNF- α 水平均明显降低,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),结果见表 8。上述结果表明,核桃楸皮醋酸乙酯部位不仅能够抑制肿瘤生长,还可改善荷瘤小鼠免疫抑制状态,减轻炎症反应。

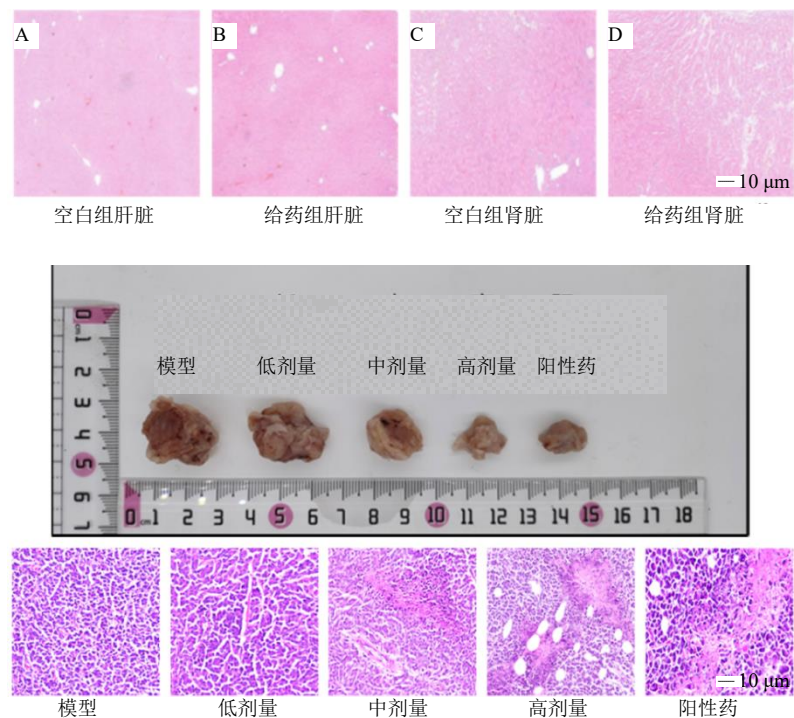


图 7 小鼠主要脏器 HE 染色图 (×10)、各组实体瘤大体表现及肿瘤组织病理学改变 (×200)
Fig. 7 HE staining of major organs in mice (×10), gross appearance of solid tumors in each group, and histopathological changes in tumor tissues (×200)

表 6 核桃楸皮药效部位对 H22 荷瘤小鼠瘤质量的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 6 Effects of active fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on tumor weight in H22 tumor-bearing mice
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	瘤质量/g	抑瘤 率/%
空白	—	—	—
模型	—	3.230 2±0.059 3 ^{ΔΔ}	—
阳性药	0.02	1.155 5±0.192 3 ^{**}	64.23
醋酸乙酯部位	1.17	2.980 8±0.127 5	7.72
	3.51	2.438 6±0.006 3 ^{**}	24.51
	10.53	1.278 4±0.072 9 ^{**}	60.42

与模型组相比, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与空白组相比, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。
下表同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs blank group. Same as table below.

3.4.4 肿瘤组织病理学观察 HE 染色结果见图 7。模型组肿瘤细胞排列致密, 细胞核深染, 核分裂象明显, 提示肿瘤细胞增殖活跃。经核桃楸皮醋酸乙酯部位干预后, 肿瘤组织细胞排列逐渐疏松, 可见不同程度的细胞固缩、碎裂及坏死区域, 且随给药剂量增加, 坏死面积逐渐增大; 高剂量组组织学改

变最为明显, 与抑瘤率变化趋势一致。

3.4.5 候选 Q-Marker 体内药效证据整合 评价方法的最终环节是将候选 Q-Marker 的体外药效证据与核心药效部位的体内有效性和安全性证据进行整合。前期谱效关系分析和单体、配伍实验优选出丁香酸、鞣花酸和山柰酚 3 种候选 Q-Marker; H22 荷瘤小鼠实验进一步证实, 富含上述成分的醋酸乙酯部位能够显著抑制肿瘤生长, 改善免疫功能并减轻肿瘤组织损伤, 且在本研究剂量范围内未见明显急性毒性。上述结果从整体药效层面支持 3 种候选成分用于表征核桃楸皮抗肝细胞癌质量, 但其体内暴露及直接靶点仍需进一步验证。

3.4.6 核桃楸皮抗肝细胞癌 Q-Marker 定量分析结果 色谱图见图 8。3 批核桃楸皮样品中丁香酸、鞣花酸和山柰酚的质量分数分别为 (0.1172±0.0106)、(0.5566±0.0244) 和 (0.0312±0.0017) mg/g。

4 讨论

4.1 基于 Q-Marker 理论的满药质量评价方法构建逻辑

满药质量评价的核心难点不仅在于化学成分复杂, 更在于如何证明所测成分能够代表传统功效和实际药效。Q-Marker 理论强调质量控制指标应兼

表 7 核桃楸皮药效部位对 H22 荷瘤小鼠免疫器官指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effects of active fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on immune organ indices in H22 tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	脾脏指数/(mg·g ⁻¹)	胸腺指数/(mg·g ⁻¹)
空白	—	2.821 ± 1.628	2.426 ± 2.623
模型	—	2.344 ± 1.016 ^{AA}	1.793 ± 0.842 ^{AA}
阳性药	0.02	1.678 ± 1.300 ^{**}	1.202 ± 1.094 ^{**}
醋酸乙酯部位	1.17	2.557 ± 1.012	1.861 ± 0.923
	3.51	3.367 ± 0.993 ^{**}	2.776 ± 1.209 ^{**}
	10.53	3.965 ± 1.594 ^{**}	3.079 ± 1.366 ^{**}

表 8 核桃楸皮药效部位对 H22 荷瘤小鼠 IL-2、IL-6、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effects of active fraction of *Cortex Juglandis Mandshuricae* on IL-2, IL-6, and TNF-α levels in H22 tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

分组	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-2/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
空白	—	277.40 ± 11.37	59.40 ± 0.37	336.69 ± 3.62
模型	—	148.81 ± 1.56 ^{AA}	93.64 ± 5.82 ^{AA}	570.83 ± 2.62 ^{AA}
阳性药	0.02	220.66 ± 5.38 ^{**}	62.56 ± 1.71 ^{**}	376.60 ± 6.50 ^{**}
醋酸乙酯部位	1.17	172.14 ± 7.76 [*]	83.18 ± 0.81 ^{**}	455.34 ± 9.50 ^{**}
	3.51	177.44 ± 0.78 ^{**}	78.04 ± 1.72 ^{**}	454.24 ± 9.69 ^{**}
	10.53	227.85 ± 1.92 ^{**}	71.76 ± 2.86 ^{**}	384.19 ± 4.74 ^{**}

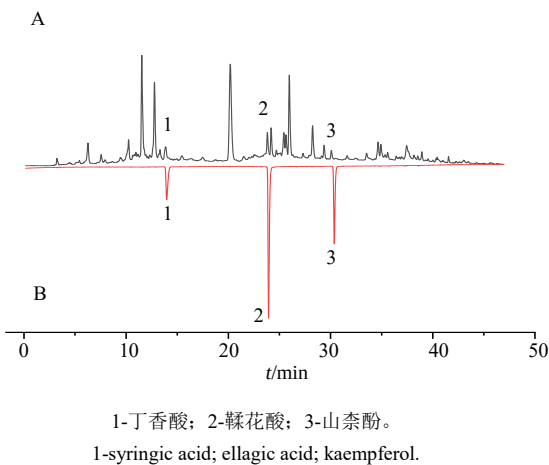


图 8 核桃楸皮色谱图 (A) 和混合对照品色谱图 (B)
Fig. 8 Chromatogram of *Cortex Juglandis Mandshuricae* (A)
and chromatogram of mixed reference standards (B)

具来源属性、可测性、体内相关性、药效相关性和机制可解释性^[1-3]。据此，本研究构建了由核心药效部位界定、物质基础解析、候选成分药效与机制验证以及体内有效性和安全性评价组成的 4 模块方法。

与传统单一成分控制相比，该方法将质量评价重点由“是否检出某一成分”转向“所测成分能否表征整体功效”，使满药质量研究形成从药效定位

到体内确证的连续证据链。

4.2 评价方法的分层筛选策略及其在核桃楸皮中的应用

该方法遵循“先整体定位、再成分收敛、后功效验证”的分层筛选逻辑。核桃楸皮现有质量控制主要依赖没食子酸等单一指标，难以全面反映其多成分协同抗肿瘤作用^[18]。在模块 1 中，本研究通过增殖、迁移和侵袭 3 类指标确定醋酸乙酯部位为核心抗肝细胞癌药效部位；模块 2 共鉴定 17 种成分，建立了候选物质库；模块 3 结合前期谱效关系、网络药理学、分子对接以及单体和配伍实验，优选丁香酸、鞣花酸和山柰酚；模块 4 进一步证实醋酸乙酯部位具有体内抑瘤、免疫调节和较好安全性。上述逐级收敛过程避免了仅依据含量高低或单一数据库结果确定 Q-Marker 的局限。

4.3 候选 Q-Marker 的药效贡献与机制关联

在本评价方法中，候选 Q-Marker 不仅需要结构明确和质量可测，还应对整体功效具有可解释的贡献。丁香酸具有抗氧化、抗炎及调节细胞凋亡等活性，并可抑制部分肿瘤细胞增殖^[19-20]；鞣花酸可通过调控细胞周期、诱导凋亡及抑制肿瘤血管生成发挥抗癌作用^[21-22]；山柰酚在多种肿瘤模型中可通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路

(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt) 信号、促进凋亡和调节炎症反应发挥作用^[23-24]。本研究网络药理学结果同样提示 PI3K-Akt 等通路可能参与核桃楸皮抗肝细胞癌作用; 3 种成分按药材实际比例配伍后可表征醋酸乙酯部位 76.3% 的体外抗肿瘤活性, 说明其具有较好的药效代表性, 也支持核桃楸皮抗肝细胞癌作用来源于多成分协同而非单一成分。

4.4 评价方法的推广价值

本研究的主要价值在于提出了一条可复制的模块化满药质量评价路径: 以明确功效限定物质范围, 以成分证据构建候选库, 以单体和配伍实验验证药效代表性, 再以动物实验补充整体有效性与安全性证据。核桃楸皮实例表明, 该路径可将化学分析、血清药物化学、谱效关系、网络药理学和药效学研究整合为同一证据链。该方法不仅可用于核桃楸皮药材, 也可为含核桃楸皮的木鸡系列制剂及其他满药品种的质量评价提供参考。但实际推广应用时仍需根据不同药材的传统功效、体内暴露特征和制剂工艺调整具体指标。

4.5 局限性与展望

本研究仍存在一定局限性。首先, 目前仅以核桃楸皮及抗肝细胞癌功效验证了所构建方法, 其与其他满药品种和不同功效领域的适用性仍需外部验证。其次, 血清药物化学仅检出部分候选成分的原型入血信号, 丁香酸、鞣花酸和山柰酚的体内暴露、代谢转化及药动学特征仍需采用靶向定量方法进一步确认。再次, 候选 Q-Marker 与核心靶点、通路之间的关系主要来自网络预测和间接药效证据, 尚需结合分子对接、表面等离子体共振技术(surface plasmon resonance, SPR)、基因干预等实验进行验证。最后, 若要进一步转化为可执行的质量标准, 还应建立经过完整方法学验证的多成分定量方法, 并通过多产地、多批次样品确定合理的含量限度和综合评价阈值。另外, 本研究采用脾脏指数、胸腺指数作为免疫评价指标, 该类脏器指数仅为机体免疫状态的间接参考指标, 无法全面真实反映肿瘤微环境内特异性抗肿瘤免疫应答水平; 后续研究可结合肿瘤浸润淋巴细胞分型、细胞因子多维度检测等手段, 更加全面地评价核桃楸皮对荷瘤机体抗肿瘤免疫的调控作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 刘昌孝. 中药质量标志物 (Q-marker): 提高中药质量

标准及质量控制理论和促进中药产业科学发展 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4517-4518.

[2] 刘昌孝. 发展中药质量标志物 (Q-marker) 理论方法和策略, 研究提升中药科学技术水平 [J]. 药学报, 2019, 54(2): 185-186.

[3] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学报, 2019, 54(2): 187-196.

[4] 王中琦, 李胜男, 许亮, 等. 满族医药的历史沿革及传统应用 [J]. 亚太传统医药, 2020, 16 (10): 43-48.

[5] 刘丹. 满药资源挖掘整理分析 [J]. 人参研究, 2024, 36(5): 88-90.

[6] 南京中医药大学. 中药大辞典: 下册 [M]. 第 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2549.

[7] 孙国东, 霍金海, 王改丽, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的核桃楸皮成分分析 [J]. 中草药, 2017, 48(4): 657-667.

[8] Zhao C Y, Qian X J, Qin M N, *et al.* Juglans mandshurica Maximowicz as a traditional medicine: Review of its phytochemistry and pharmacological activity in East Asia [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(1): 33-48.

[9] Zhang Q, Han L Y, Luo X, *et al.* Enhancing inhibitory effect in SMMC-7721 hepatoma cells through combined treatment of gallic acid and hUC-MSCs-Exos [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 144: 113704.

[10] Wang Z X, Qi F H, Cui Y G, *et al.* An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics [J]. *Biosci Trends*, 2018, 12(3): 220-239.

[11] 韦盛伟, 苏明哲, 肖秀琼, 等. 中药单体与化疗药物共载纳米制剂治疗肝癌研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4914-4925.

[12] Yao G D, Cheng Z Y, Shang X Y, *et al.* Coumarins from the bark of Juglans mandshurica exhibited anti-hepatoma activities via inducing apoptosis [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2017, 19(11): 1134-1142.

[13] 霍思奇, 王帅, 杨欣欣, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的复方木鸡合剂化学成分析研究 [J]. 中南药学, 2024, 22(5): 1150-1156.

[14] 门磊, 侯梦阳, 胡文忠. 基于 LC-LTQ-Orbitrap/MS 的复方木鸡颗粒成分分析 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(6): 1048-1057.

[15] 陈政伶, 勾玲, 卢海啸. 鞣花酸药理作用研究进展 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2023, 25(1): 196-202.

[16] 杨琳. 槲皮苷药理活性研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2015, 11(6): 61-63.

[17] 王晓娟, 包永睿, 孟宪生, 等. 基于 DEN 致肝癌模型大鼠的核桃楸皮黄酮成分析解及药理药效研究 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(2): 17-21.

[18] 赵盼. 核桃楸皮质量控制方法和相关成分药效学与药

- 动学研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2017.
- [19] Shakeel I, Khan S, Roy S, *et al.* Investigating potential of cholic acid, syringic acid, and mangiferin as cancer therapeutics through sphingosine kinase 1 inhibition [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 253: 127036.
- [20] Khatun A, Patra S, Chowdhury S, *et al.* Syringic acid suppresses inflammation by upregulation of SOCS3 [J]. *J Neuroimmunol*, 2026, 410: 578813.
- [21] 谭贞菊. 鞣花酸抑制肿瘤生长并增强索拉非尼对肝细胞癌疗效的相关研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2024.
- [22] Park W Y, Kim B, Song G, *et al.* Ellagic acid alleviates abnormal fat reduction by activating the RXR β -PPAR γ pathways in a CT26 tumour-induced Cachexia mouse model [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2026, 17(1): e70176.
- [23] 李媛霞, 刘淑艳. 山奈酚通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路改善冠心病大鼠心肌损伤 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2025, 34(5): 439-445.
- [24] Shi Q M, He Y T, Shen S, *et al.* Single-cell profiling uncovers kaempferol-mediated immunoregulation in the protection against experimental autoimmune hepatitis [J]. *Phytomedicine*, 2026, 156: 158240.

[责任编辑 王文倩]