

· 药 学 基 础 ·

基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS和整合网络药理学的 川芎酒制后增强抗脑缺血损伤作用机制分析

裴科¹, 宁燕², 蔡皓^{3*}, 曹丽琰¹, 赵婷婷¹, 于子涵¹, 曹岗², 王颖莉¹, 张朔生^{1*}

(1. 山西中医药大学 中药与食品工程学院, 山西省现代中药工程实验室, 山西 晋中 030619;

2. 浙江中医药大学 药学院, 中药炮制研究中心, 杭州 310053;

3. 南京中医药大学 药学院, 国家教育部中药炮制规范化及标准化工程研究中心, 南京 210023)

[摘要] 目的:分析川芎酒制前后水提物中差异性成分,探讨川芎酒制增强抗脑缺血损伤的分子作用机制。方法:采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS),基于化合物质谱信息并结合对照品、参考文献比对,定性分析川芎水提物的主要化学成分,采用化学模式识别方法筛选川芎酒制前后的差异性成分。基于此,通过在线数据库对差异化合物的潜在靶点进行预测,搜索脑缺血疾病相关靶点。运用Cytoscape 3.6.0建立川芎酒制前后差异成分-作用靶点-疾病网络图;使用STRING 11.5构建交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;通过DAVID 6.8对差异性成分抗脑缺血的潜在靶点进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;同时,将相对含量较高且酒制后峰面积升高的化合物与其对应靶点进行分子对接,以验证酒制增效机制。结果:从川芎中共鉴定出71个化学成分,筛选出34个差异性成分,对应潜在靶点603个,与769个疾病靶点做交集后共得到60个交集靶点。通过PPI网络分析得到7个关键靶点,包括JUN、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、胱天蛋白酶-3(CASP3)、基质金属蛋白酶9(MMP9);肿瘤坏死因子(TNF)信号通路为主要的差异信号通路。分子对接结果显示,各差异成分(洋川芎内酯K、洋川芎内酯F、3-正丁基苯酞、Z,Z'-6,8',7,3'-双藁本内酯、阿魏酸、Z-藁本内酯)和其对应靶点均具有较好的结合活性。结论:川芎酒制增效机制可能与抑制炎症反应的作用增强有关。

[关键词] 川芎; 酒制; 脑缺血; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS); 网络药理学; 分子对接

[中图分类号] R22;R943.1;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)12-0164-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220146 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211216.1553.001.html>

[网络出版日期] 2021-12-17 12:11

Mechanism Analysis of Strengthening Anti-cerebral Ischemia Injury of Chuanxiong Rhizoma Processed with Wine Based on UHPLC-Q-Orbitrap HRMS and Integrated Network Pharmacology

PEI Ke¹, NING Yan², CAI Hao^{3*}, CAO Li-long¹, ZHAO Ting-ting¹, YU Zi-han¹,

CAO Gang², WANG Ying-li¹, ZHANG Shuo-sheng^{1*}

(1. Shanxi Modern Chinese Medicine Engineering Laboratory, College of Traditional Chinese Medicine

[收稿日期] 2021-09-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703704);山西省重点研发计划项目(201903D421018);中医脑病学山西省重点实验室课题(202105D121012);浙江省重点建设高校优势特色学科(中药学)开放基金项目(ZYAOX2018023);山西省应用基础研究项目(201801D221436);山西省脑病重点实验室开放课题(CME-OP-201003);山西省教育厅科技创新计划项目(2019L0720);山西省中医药管理局项目(2019ZYCY016);山西药茶的研制和开发项目(2020PY-YC-20)

[第一作者] 裴科,博士,讲师,从事中药炮制及中药分析,Tel:0351-3179909,E-mail:peike_pk@126.com

[通信作者] *蔡皓,硕士,副教授,从事炮制机制及炮制配伍研究,E-mail:haocai_98@126.com;

*张朔生,硕士,教授,从事中药炮制及物质基础研究,E-mail:zhangshuosheng@aliyun.com

(TCM) and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China;

2. Research Center of TCM Processing, College of Pharmacy,

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

3. Engineering Research Center for Standardization and Normalization of TCM Processing, Ministry of Education, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the differential components in water extract of Chuanxiong Rhizoma before and after processing with wine, and to explore the molecular mechanism of Chuanxiong Rhizoma processed with wine in enhancing anti-cerebral ischemia injury. **Method:** Ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS) was used to qualitatively analyze the main chemical components in water extract of Chuanxiong Rhizoma based on the spectral information of compound, comparison of reference substance and references. The chemical pattern recognition method was used to screen the differential components of Chuanxiong Rhizoma before and after processing. Based on these differential components, the potential targets of differential components were predicted by online databases, and the related targets of cerebral ischemia were searched. Cytoscape 3.6.0 was used to establish the network diagram of differential components-action targets-diseases of Chuanxiong Rhizoma processed with wine. The protein-protein interaction (PPI) network of intersection targets was constructed by STRING 11.5. The potential targets of differential components against cerebral ischemia were analyzed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis through DAVID 6.8. At the same time, the chemical compounds with high relative content and increased peak area after wine processing were docked with their corresponding targets to verify the mechanism of enhanced effect after wine processing. **Result:** A total of 71 chemical components were identified from Chuanxiong Rhizoma, 34 differential components and 603 potential targets were screened out. At the same time, a total of 769 disease targets and 60 intersection targets were obtained. Seven key targets were identified through PPI network analysis, including JUN, signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), interleukin-1 β (IL-1 β), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), Caspase-3 (CASP3) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9). Tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway was the main differential signaling pathway. The results of molecular docking showed that differential components (senkyunolide K, senkyunolide F, 3-*n*-butylphthalide, Z, Z'-6, 8', 7, 3'-diligustilide, ferulic acid and Z-ligustilide) and corresponding targets had good binding activities. **Conclusion:** The synergistic mechanism of Chuanxiong Rhizoma processed with wine may be related to the enhanced inhibitory effect of inflammatory reaction.

[Keywords] Chuanxiong Rhizoma; wine-processed; cerebral ischemia; ultra high performance liquid chromatography tandem quadrupole orbitrap high resolution mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap HRMS); network pharmacology; molecular docking

脑卒中俗称中风,是一种常见的脑血管疾病,具有高发病率、高死亡率、高致残率、高复发率的特点^[1]。其可分为缺血性脑卒中和出血性脑卒中两大类,其中缺血性脑卒中患者约占所有脑卒中患者的85%,是由于脑的供血动脉狭窄或闭塞导致脑供血不足,脑组织缺血缺氧,造成大量神经元坏死,最终神经功能严重受损^[2]。其发病机制复杂,主要涉及自由基损伤、炎症反应、兴奋毒性、细胞凋亡、钙超载等方面,进而影响神经功能并造成机体损伤^[3]。

脑卒中的治疗和预后一直是临床一大难题,而中药具有多成分、多靶点、多效应的特点,可在脑卒中的治疗中发挥重要作用。

中医认为活血化瘀是治疗脑卒中的有效方法之一^[4]。川芎作为一种常用的活血化瘀药,具有活血行气、散瘀止痛的功效。据报道,川芎具有保护心脑血管^[5]、抗炎^[6]、抗氧化^[7]、保护神经系统^[8]等活性,临床上常用于脑卒中的治疗^[9-10]。目前,川芎治疗脑卒中的研究多从化学成分、药对或者复方制剂

3个层面进行^[11]。其作用机制包括扩张血管、改善微循环^[12]、清除和抑制氧自由基、抗脂质过氧化^[13]、神经保护^[14]、促进血管新生^[15]等。据考证,酒川芎自宋代开始使用,一直沿用至今,酒制能引药上行,可增强川芎活血行气、散瘀止痛的作用^[16-17]。然而,2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)尚未收载酒川芎,同时缺乏川芎酒制品和生品的功效对比研究,相较于生品,酒制品的流通和临床使用也较少。因此,亟需探究川芎酒制的增效机制,以期为酒川芎的临床应用提供依据。

网络药理学主要通过数据挖掘方式对药物进行系统分析,筛选中药有效成分及对应靶点,从整体角度出发揭示中药与疾病之间的关联性,为深入研究其药效物质基础及分子作用机制提供参考^[18]。在前期优选的川芎酒制工艺条件^[19]基础上,本研究拟采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法(UHPLC-Q-Orbitrap HRMS)对川芎酒制前后的化学成分进行快速分析与鉴定,并结合化学模式识别方法筛选出川芎酒制前后的差异成分。基于差异性成分,运用网络药理学进行靶点预测,探讨导致川芎酒制前后药效存在差异的可能靶点和生物学途径,并通过分子对接技术对关键靶点和相应成分的结合活性进行验证,为川芎的酒制增效作用机制阐释及临床合理用药提供实验依据。

1 材料

UltiMate 3000型超高效液相色谱仪和Q-Exactive型四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),TGL-20B型高速离心机(上海安亭科学仪器厂),EX225D型1/10万电子天平[奥豪斯仪器(上海)有限公司],ASE-12型固相萃取仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

Cleanert S C₁₈固相萃取小柱(天津博纳艾杰尔科技有限公司),丁烯基苯胺、Z-藁本内酯、洋川芎内酯A对照品(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号分别为D-057-180321、G-010-171216、Y-083-181011,纯度均>98.0%),阿魏酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110773-201614,纯度99.0%),雕王黄酒(绍兴吴越酿酒有限公司,批号GBIT13662,乙醇体积分数12%),水为超纯水,甲醇、乙腈为质谱纯,甲酸为色谱纯,其余试剂均为分析纯。6批川芎饮片购自安国市万顺达药材行,产地四川,批号分别为20190516、20190522、20190613、20190715、20190803、20190814,经山西中医药大学中药与食品工程学院张朔生教授鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum*

chuanxiong 的干燥根茎;取川芎饮片约200 g,加入适量黄酒拌匀,闷润至黄酒被吸尽,置100℃炒制容器中,炒制20 min,取出放凉,得酒川芎饮片^[19],通过指纹图谱结合化学模式识别方法对制备的酒川芎进行评价^[19],符合要求后用于实验。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 取各批川芎生品和酒制品约10 g,分别加6倍量水浸泡20 min,回流提取30 min,提取2次,第2次加4倍量水。提取液经4层纱布过滤后合并,减压浓缩至生药质量浓度1.20 g·mL⁻¹。取浓缩液200 μL转移至已活化的反相C₁₈固相萃取小柱,用甲醇洗脱并定容于10 mL量瓶中,于转速13 000 r·min⁻¹离心20 min(离心半径5 cm),取上清液,得供试品溶液,即生川芎1~6和酒川芎1~6。

2.1.2 对照品溶液 取各对照品适量,精密称定并置于10 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制备成质量浓度均约200 mg·L⁻¹的单一对照品储备液。分别取上述储备液适量,混匀,加甲醇稀释,得混合对照品溶液。

2.2 检测条件

2.2.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm),流动相选择乙腈(A)-0.01%甲酸水溶液(B)进行梯度洗脱(0~0.5 min, 5%A; 0.5~1.5 min, 5%~15%A; 1.5~4.5 min, 15%~30%A; 4.5~7 min, 30%~60%A; 7~11 min, 60%~70%A; 11~12 min, 70%~100%A; 12~13 min, 100%A; 13~13.5 min, 100%~5%A; 13.5~16 min, 5%A),流速0.3 mL·min⁻¹,进样量5 μL,柱温40℃。

2.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI),正、负离子同时扫描模式。正离子模式下的喷雾电压3.2 kV,鞘气流速40 arb,辅助气流速5 arb,辅助气加热温度350℃;负离子模式下的喷雾电压2.5 kV,鞘气流速38 arb,辅助气流速10 arb,辅助气加热温度300℃。离子传输管温度320℃,透镜电压(S-Lens RF Level)50 V,全扫描/数据依赖的二级扫描(Full MS/dd-MS²),扫描范围 *m/z* 100~1 000;一级质量分辨率7万半高宽(FWHM),二级分辨率17 500 FWHM,碰撞能量30 eV。

2.3 化合物鉴定 通过检索CNKI、SciFinder、PubMed等数据库,建立川芎及黄酒的化学成分库,包含化合物名称、分子式、相对分子质量等信息。按2.2项下条件进样分析,根据Xcalibur 4.0软件提供的准确相对分子质量、相对保留时间(*t_R*)、准分子

离子峰及二级碎片离子信息,实际测得的相对分子质量与理论相对分子质量偏差(δ) <5 ppm($1\text{ ppm}=1\times 10^{-6}$,下同),再依据文献[20-49]和部分对照品的

t_{R} 进行二级碎片离子及成分结构的匹配,鉴定生川芎和酒川芎中的化学成分。总离子流图见增强出版附加材料,鉴定出的71个成分的具体信息见表1。

表1 川芎水提物中化学成分的UHPLC-Q-Orbitrap HRMS鉴定

Table 1 Identification of chemical components in water extract of Chuanxiong Rhizoma by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS

No.	t_{R}/min	化合物	CAS号	分子式	离子模式	m/z 理论值	m/z 实际值	δ/ppm	碎片离子 m/z
1	0.66	腺嘌呤 ^[20]	73-24-5	C ₅ H ₅ N ₅	[M+H] ⁺	136.061 8	136.061 9	0.88	119.049 3
2	0.81	腺苷 ^[20-21]	58-61-7	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	[M+H] ⁺	268.104 0	268.104 0	-0.11	136.061 9
3	2.17	水杨酸 ^[22-23]	69-72-7	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	137.024 2	137.023 2	-7.30	93.033 0
4	2.32	香草酸 ^[24-27]	121-34-6	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	167.035 0	167.033 9	-6.65	167.033 9, 123.043 7
5	3.04	咖啡酸 ^[27-29]	331-39-5	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	179.035 0	179.033 9	-5.92	135.043 8, 107.048 9
6	3.14	绿原酸 ^[21, 26, 30-31]	327-97-9	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	353.087 8	353.088 1	0.74	191.055 2, 179.034 1, 173.044 5, 161.023 6, 135.043 8
7	3.67	异黄樟脑	120-58-1	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	[M+H] ⁺	163.075 4	163.075 5	0.61	
8	3.85	氧化前胡素 ^[32]	737-52-0	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	287.091 4	287.089 5	-6.55	203.030 1, 187.035 1
9	3.88	洋川芎内酯L	114586-51-5	C ₁₂ H ₁₅ ClO ₃	[M-H] ⁻	241.063 7	241.063 8	0.46	241.107 8, 141.090 8
10	4.05	阿魏酸 ^{1)[27, 33]}	1135-24-6	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	193.050 6	193.049 8	-4.45	134.036 4
11	4.17	肉桂酸 ^[34]	621-82-9	C ₉ H ₈ O ₂	[M+H] ⁺	149.059 7	149.059 8	0.54	131.055 4, 103.054 0
12	4.21	洋川芎内酯R	172549-37-0	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	[M-H] ⁻	239.092 5	239.092 3	-0.84	
13	4.44	洋川芎内酯N ^[35]	140694-58-2	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	[M+Na] ⁺	249.109 7	249.109 7	-0.32	209.118 3, 191.106 8, 153.055 1
14	4.51	芥子酸 ^[22]	530-59-6	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	223.061 2	223.061 1	-0.54	205.056 1, 179.033 0, 153.023 7
15	4.54	洋川芎内酯S	172723-28-3	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	[M-H] ⁻	239.092 5	239.092 2	-1.25	
16	4.79	洋川芎内酯J ^[35]	94530-86-6	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	[M+Na] ⁺	249.109 7	249.109 6	-0.52	249.110 0, 209.118 3, 191.106 8, 153.055 1
17	5.05	洋川芎内酯F ^[35-36]	-	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	207.101 6	207.101 6	0.34	207.101 7, 189.091 1, 179.106 8, 165.091 7, 161.096 0, 147.080 6, 151.112 4, 133.101 5, 119.086 1, 105.070 4
18	5.08	异茴芹内酯 ^[37-38]	482-27-9	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	247.060 1	247.058 6	-6.23	189.091 2, 161.095 8,
19	5.10	川芎醇内酯R ₂ ^[35]	-	C ₁₂ H ₁₈ O ₄	[M+Na] ⁺	249.109 7	249.109 6	-0.40	
20	5.11	川芎醇内酯R ₁	-	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	[M+H] ⁺	225.112 1	225.112 2	0.44	
21	5.22	川芎噻 ^[23, 33]	29700-20-7	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	265.097 2	265.097 1	-0.26	247.086 9, 219.090 9
22	5.48	川芎蔡呋内酯 ^[39]	-	C ₂₅ H ₃₂ O ₅	[M+H] ⁺	413.232 3	413.234 1	4.38	353.174 6, 191.105 7
23	5.78	洋川芎内酯H ^[29, 40]	94596-27-7	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	[M+H] ⁺	225.112 1	225.112 2	0.18	225.112 7, 207.102 7, 165.097 2
24	5.86	洋川芎内酯D ^[36]	94530-82-2	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	221.081 9	221.081 4	-2.44	221.081 6, 177.091 2
25	6.19	迪拉皮奥 ^[41]	484-31-1	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	221.081 9	221.081 4	-2.31	221.081 5, 177.091 2
26	6.27	丁烯基苯酚 ^{1)[22, 24, 26-27]}	551-08-6	C ₁₂ H ₁₂ O ₂	[M+H] ⁺	189.091 0	189.091 0	-0.21	171.080 1, 143.085 6, 128.062 3, 117.070 5, 115.054 0, 91.055 0
27	6.34	大黄酸 ^[22]	478-43-3	C ₁₅ H ₈ O ₆	[M-H] ⁻	283.024 8	283.024 1	-2.37	239.031 3, 227.032 3
28	6.41	2-甲氧基-4-(3-甲氧基-1-丙烯基)-苯酚	63644-71-3	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	[M-H] ⁻	193.087 0	193.086 2	-4.45	193.086 1
29	6.43	4,7-二羟基-3-丁基苯酚 ^[36]	-	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	221.081 9	221.081 4	-2.35	221.081 4, 177.091 1
30	6.44	匙叶桉油烯醇 ^[42]	6750-60-3	C ₁₅ H ₂₄ O	[M+H] ⁺	221.190 0	221.190 2	1.09	203.182 3
31	6.62	花椒毒素 ^[37]	298-81-7	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	217.049 5	217.049 3	-0.92	217.104 7, 202.025 3
32	6.64	洋川芎内酯K ^[25]	114569-33-4	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	[M-H] ⁻	207.102 7	207.101 9	-3.81	207.102 4, 163.111 8
33	6.88	洋川芎内酯I ^[22, 24-26]	94596-28-8	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	[M+H] ⁺	225.112 1	225.112 2	0.36	207.102 9
34	6.91	川芎噻 ^[29]	1124-11-4	C ₈ H ₁₂ N ₂	[M+H] ⁺	137.107 3	137.107 5	0.95	122.081 5, 80.053 2

续表 1

No.	t _R /min	化合物	CAS 号	分子式	离子模式	m/z 理论值	m/z 实际值	δ/ppm	碎片离子 m/z
35	6.95	Z-6,7-环氧藁本内酯 ^[25,35]	—	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	[M-H] ⁻	205.087 0	205.086 3	-3.61	161.096 2
36	6.98	4-羟基-3-丁基苯酚 ^[43]	74459-23-7	C ₁₂ H ₁₄ O ₃	[M+H] ⁺	207.101 6	207.101 7	0.53	207.101 7, 189.091 1, 161.096 0, 151.112 4, 133.101 5
37	7.04	洋川芎内酯 G ^[25]	94530-85-5	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	[M-H] ⁻	207.102 7	207.101 9	-3.91	207.102 4, 163.111 8
38	7.12	佛手柑内酯 ^[37,44]	484-20-8	C ₁₂ H ₈ O ₄	[M+H] ⁺	217.049 5	217.049 6	0.09	217.104 7, 202.025 3
39	7.27	2-辛基苯酚	949-13-3	C ₁₄ H ₂₂ O	[M-H] ⁻	205.159 8	205.159 0	-3.95	205.086 3, 161.096 3, 106.040 8
40	7.30	瑟丹酸	6697-07-0	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	[M-H] ⁻	209.118 3	209.117 7	-3.01	209.948 5, 164.835 3
41	7.40	洋川芎内酯 E ^[25]	94530-83-3	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	[M-H] ⁻	203.071 4	203.071 0	-1.77	203.070 6, 174.031 4, 160.015 4, 116.927 0
42	7.55	7-羟基-3-丁烯基苯酚 ^[25]	—	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	[M-H] ⁻	203.071 4	203.070 5	-4.04	203.070 7, 174.031 2, 116.927 2
43	7.57	洋川芎内酯 B ^[26]	93236-67-0	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	[M-H] ⁻	203.071 4	203.070 5	-4.04	203.070 7, 174.031 2, 173.023 7, 160.015 5
44	7.79	洋川芎内酯 C ^[26]	91652-78-7	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	[M-H] ⁻	203.071 4	203.070 6	-3.59	203.070 7, 174.031 3, 159.080 5, 131.048 9, 117.927 1
45	7.83	Z, Z'-6, 8', 7, 3'-双藁本内酯 ^[36,45]	—	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.206 9	2.20	191.117 3, 173.097 9, 145.101 2, 105.076 9
46	7.89	洋川芎内酯 A ^{1)[21,32,24-27]}	63038-10-8	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	[M+H] ⁺	193.122 3	193.122 3	0.05	193.122 5, 175.111 9, 147.117 0, 137.059 9, 119.085 9, 109.065 4, 93.070 5, 91.054 8
47	7.91	肉豆蔻醚 ^[46]	607-91-0	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	[M+H] ⁺	193.085 9	193.086 2	1.50	193.122 5
48	8.05	Z-藁本内酯二聚体 ^[35]	—	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.206 9	2.36	191.107 5, 189.092 6
49	8.28	3-正丁基苯酚 ^[22,25,27]	6066-49-5	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.106 7	191.106 6	-0.10	117.070 3, 91.054 8
50	8.29	川芎醇内酯 A	—	C ₂₄ H ₂₈ O ₅	[M+H] ⁺	397.201 0	397.200 4	-1.36	
51	8.41	新蛇床内酯 ^[34,47]	4567-33-3	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	[M+H] ⁺	195.138 0	195.138 0	0.10	195.123 1, 177.113 5, 149.059 8
52	8.44	Z-藁本内酯 ^{1)[12,21,24-27]}	4431-01-0	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	[M+H] ⁺	191.106 7	191.106 8	0.52	145.064 6, 117.070 2, 105.070 4, 91.054 9
53	8.53	3', 6, 8', 3a-二聚藁本内酯 ^[36]	—	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.205 8	-0.50	381.205 7, 191.117 3, 173.097 9
54	8.57	川芎醇内酯 B	—	C ₂₄ H ₂₈ O ₅	[M+H] ⁺	397.201 0	397.200 4	-1.28	
55	8.63	新当归内酯 ^[25,47]	92935-94-9	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.205 7	-0.94	283.029 9
56	9.27	洋川芎内酯 O ^[25,35]	142797-35-1	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.205 6	-1.05	353.211 1, 191.117 6
57	9.45	Z, Z'-3, 3', 8, 8'-双藁本内酯 ^[45]	—	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	[M+H] ⁺	383.221 7	383.221 6	-0.23	
58	9.69	Z'-3, 8-二氢-6, 6', 7, 3'a-二聚藁本内酯 ^[45]	—	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	[M+H] ⁺	383.221 7	383.221 9	0.63	191.112 8, 149.524 2
59	9.80	洋川芎内酯 P ^[36,38]	—	C ₂₄ H ₃₀ O ₄	[M+H] ⁺	383.221 7	383.223 3	4.25	191.113 0
60	9.99	二聚藁本内酯 ^[25]	89354-45-0	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.205 9	-0.42	347.167 5, 287.109 5, 191.106 9
61	10.03	欧当归内酯 A ^[34,36]	88182-33-6	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.205 7	-0.89	191.117 4, 149.062 6
62	10.87	东当归内酯 B ^[36]	112966-16-2	C ₂₄ H ₂₈ O ₄	[M+H] ⁺	381.206 0	381.205 7	-0.81	381.207 0
63	12.75	亚油酸 ^[22]	2197-37-7	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	279.233 0	279.233 1	0.50	193.162 1
64	13.00	chuanxionglin B	—	C ₂₈ H ₄₆ O ₅	[M+H] ⁺	463.341 8	463.344 1	4.86	
65	13.11	亚油酸甲酯	112-63-0	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	293.248 6	293.249 0	1.43	
66	13.23	十五烷酸甲酯 ^[48]	7132-64-1	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	255.233 0	255.232 9	-0.04	229.110 5
67	13.33	棕榈酸 ^[49]	57-10-3	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	[M-H] ⁻	255.233 0	255.233 0	0.04	255.232 9, 237.082 6
68	13.38	油酸 ^[48]	112-80-1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	281.248 6	281.248 7	0.43	281.248 9
69	13.61	十五烷酸乙酯	41114-00-5	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	[M-H] ⁻	269.248 6	269.248 8	0.67	269.248 8
70	13.85	异十七烷酸甲酯	6929-04-0	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	[M-H] ⁻	283.264 3	283.264 4	0.64	283.264 5
71	14.03	棕榈酸乙酯 ^[49]	628-97-7	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	[M-H] ⁻	283.264 3	283.264 7	1.59	283.264 5

注: ¹⁾与对照品比对后鉴定的成分

2.4 酒制前后差异化合物的筛选 以川芎生品和酒制品中所鉴定化学成分的相对峰面积为变量,导入SIMCA 14.1进行有监督模式的最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)。结果表明累积解释能力参数 R^2X 和 R^2Y 分别为0.807、0.999,预测能力参数 Q^2 为0.924,均 >0.5 ,表明该模型稳定可靠、预测能力强,可用于区别生川芎与酒川芎。OPLS-DA得分图、S-plot图见增强出版附加材料。结果表明酒制对川芎化学成分的影响显著。根据OPLS-DA模型中变量重要性投影(VIP)值,以VIP值 >1.0 为标准共筛选出酒制前后差异性成分34个,其中酒制之后含量上升的成分19个、含量下降的成分15个,具体信息见增强出版附加材料。

2.5 网络药理学分析

2.5.1 差异化合物潜在靶标预测 以UHPLC-Q-Orbitrap HRMS结合化学模式识别方法鉴定出的川芎酒制前后差异性成分为研究对象,采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、中医药百科全书数据库(ETCM)、中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)、SwissTargetPrediction和TargetNet数据库查找各个差异成分对应的靶点蛋白,通过UniProt数据库将靶点蛋白统一为人类基因名称,整合后去除重复值得到603个差异化合物的潜在作用靶点,见增强出版附加材料。

2.5.2 疾病靶点预测 以“Cerebral ischemia”为关键词在GeneCards、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)、DisGeNET数据库中检索得到与脑缺血相关的基因,通过UniProt数据库将靶点蛋白信息转化为UniProt ID,整合后去除重复基因得到769个疾病靶点,见增强出版附加材料。

2.5.3 “化合物-靶点-疾病”网络的建立 将差异化合物作用靶点和疾病靶点导入Venny 2.1.0进行韦恩分析,得到60个交集靶点,即川芎酒制前后的差异化合物抗脑缺血的潜在靶点。基于交集靶点,利用Cytoscape 3.6.0建立川芎酒制前后差异化合物-作用靶点-疾病网络,见图1。结果发现同一差异化合物可作用于多个靶点,同时不同化合物也可能作用于同一靶点,说明川芎酒制增效是多个差异成分对相关蛋白或通路综合效应的结果。

2.5.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与分析 将交集靶点导入STRING 11.5,选择物种为“Homo sapiens”,设定最低相互作用阈值为高等置信度(high confidence)0.7,其余参数保持默认不变,得到差异成分抗脑缺血作用相关靶点的互作关系,

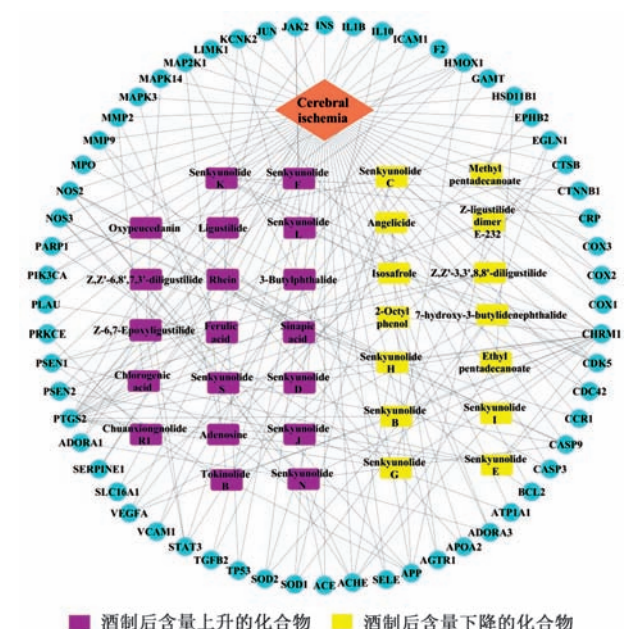


图1 川芎酒制前后治疗脑缺血的差异化合物-作用靶点-疾病网络
Fig. 1 Network of differential compound-target-disease for treating cerebral ischemia before and after processing of Chuanxiong Rhizoma

将结果导出为TSV格式文件,导入Cytoscape 3.6.0进行可视化处理,删除无关联节点,构建PPI网络,采用NetworkAnalyzer插件计算网络拓扑参数,通过对网络进行拓扑分析,以度值 >2 倍平均度值为标准筛选关键蛋白。PPI网络见图2,图中共涉及53个节点,472条边,其中节点的颜色和大小表示度值的大小,颜色越深、节点越大说明度值越大;边表示功能相关性,边的粗细代表combined score的大小。最终筛选的关键蛋白包括JUN、信号转导和转录激活因子3(STAT3)、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、血管内皮生长因子A(VEGFA)、胱天蛋白酶-3(CASP3)、基质金属蛋白酶9(MMP9)。提示这些靶点是整个网络中的枢纽蛋白,起较为关键的作用,可能是川芎酒制前后差异化合物作用的关键靶点。

2.5.5 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将含量增加和减少的差异性成分对应靶点分别与疾病靶点求交集,将交集靶点导入DAVID 6.8,对交集靶点分别进行GO功能和KEGG通路富集分析。GO功能富集分析包括生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC)。通过在线作图平台微生信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对富集分析结果进行可视化处理。

含量增加的差异性成分GO功能富集分析共得到GO条目280个($P<0.05$),其中与BP有关的条目



Fig. 2 PPI network of potential targets for treating cerebral ischemia before and after processing of Chuanxiong Rhizoma

综上所述,提示 TNF 信号通路是主要的差异信号通路,是含量升高的化学成分所调节的信号通路,说明酒川芎可能通过抑制炎症反应发挥增效作用。升高的成分和降低的成分均参与了 HIF-1 信号通路和 VEGF 信号通路的调节,最终能否通过这些通路发挥酒制增效的作用,还需要综合升高成分和降低成分的量变情况,以及在通路中调节的蛋白的重要性等因素来决定。

酒制增效与化学成分变化密切相关,特别是在酒制之后含量增加的化学成分。为了对酒制增效机制进行验证,选择相对含量较大、酒制之后含量增加且对酒制前后 OPLS-DA 分组贡献较大的成分与其对应靶点进行半柔性分子对接验证,相关结果见增强出版附加材料。结果发现 STAT3 和 MMP9 是 PPI 网络筛选出的关键靶点。结合蛋白配体非共价相互作用分析工具 (PLIP) 和 PyMOL 2.3.4 作图,见增强出版附加材料。其中,洋川芎内酯 K 与胰岛素 (INS) 在半胱氨酸 (CYS)-11 处形成氢键,在组氨酸 (HIS)-10、亮氨酸 (LEU)-11、丙氨酸 (ALA)-14 处形成疏水相互作用;洋川芎内酯 F 与前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 在苏氨酸 (THR)-212、天冬酰胺 (ASN)-382、谷氨酰胺 (GLN)-454 处形成氢键,在苯丙氨酸 (PHE)-200、ALA-202、GLN-203、PHE-210、缬氨酸 (VAL)-295、酪氨酸 (TYR)-385、LEU-391、VAL-447 处形成疏水相互作用,与 HIS-207 形成 pi-stacking 键;3-正丁基苯酚与细胞间黏附分子 1 (ICAM1) 在 TYR-880、GLN-883 处形成氢键;Z,Z'-6,8',7,3'-双藁本内酯与 STAT3 在 TYR-27 处形成氢键,在 TYR-27、VAL-30、ALA-43、赖氨酸 (LYS)-45、GLN-96、LEU-147 处形成疏水相互作用;阿魏酸与 MMP9 在天冬氨酸 (ASP)-182、甘氨酸 (GLY)-183、ASP-185、LEU-187、ASP-205、谷氨酸 (GLU)-208 处形成金属配合物;此外,Z-藁本内酯与 PTGS2 在 THR-212、ASN-382、GLN-454 处形成氢键,在 PHE-200、ALA-202、GLN-203、PHE-210、VAL-295、TYR-385、LEU-391、VAL-447 处形成疏水相互作用,与 HIS-207 形成 pi-stacking 键,与 HIS-388、羟基 (COH)-602 处形成金属配合物。综上分析,说明各活性成分与蛋白靶点主要通过氢键和疏水相互作用结合,酒川芎可能通过这些靶点及其相关通路发挥增效作用。

3 讨论

本研究针对川芎酒制增效机制尚不明确的现状,采用UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术对川芎生品和酒制品进行定性分析,同时结合化学模式识别方法筛选得到差异性成分,针对其中VIP值>1且含量增加的成分,阿魏酸、绿原酸为川芎和黄酒中共有成分,酒制之后有量的叠加,含量明显升高。其他成分含量增加可能为酒制增溶的效应。多种化合物在酒制过程中含量降低,可能原因是炮制过程中发生结构的破坏。这些差异性成分大多具有显著的生物活性,可能会导致川芎酒制前后药效的差异。例如,阿魏酸在抗血小板聚集、抗血栓形成过程中发挥着重要作用^[50];洋川芎内酯A对大鼠局灶性脑缺血损伤的保护作用机制与其减轻脑组织的氧化应激反应、缓解炎症反应有关^[51];藁本内酯、二氢藁本内酯、丁烯基苯酞为川芎挥发油的主要化学成分,川芎挥发油能改善脑缺血损伤大鼠的神经功能,减轻梗死程度,可保护脑缺血大鼠脑组织^[52]。

JUN、STAT3、MAPK3、IL-1 β 、VEGFA、CASP3、MMP9为川芎酒制差异成分抗脑缺血损伤的关键靶点。据报道,神经元凋亡是造成脑缺血损伤的关键因素,核转录因子c-Jun及其编码的JUN蛋白在凋亡过程中起着重要作用,可导致大量神经元凋亡,诱发神经功能障碍^[53];STAT3通过调控下游基因的转录和表达发挥抗凋亡的作用,从而减轻脑损伤^[54];MAPK3又称细胞外信号调节激酶1(ERK1),可提高HIF-1的活性,产生大量促炎因子,在脑缺血损伤中发挥重要的作用^[55];IL-1 β 是趋化因子家族的1种细胞因子,脑缺血损伤后IL-1 β 分泌增加,同时刺激TNF- α 和IL-6等细胞因子的产生,会进一步加重局部炎症反应^[56-57];VEGFA是血管再生的1个重要调节因子,可增加脑血流量,促进神经功能的恢复^[58];CASP3是介导细胞凋亡过程的关键环节,其活化可以引起脑缺血受损神经元凋亡^[59];MMP9的升高可引起神经细胞损伤,进而导致脑水肿,故可通过抑制MMP9活性来改善脑缺血损伤^[60]。JUN、MAPK3、IL-1 β 、CASP3等关键蛋白可以富集于TNF信号通路,是含量升高化学成分所调节的差异信号通路,其中大黄酸可能是通过其影响JUN、IL-1 β 的表达,阿魏酸可能通过其影响MMP9的表达,腺苷可能影响MAPK3的作用。此外,洋川芎内酯F、川芎醇内酯R₁、洋川芎内酯J、洋川芎内酯D、Z,Z'-6,8',7,3'-双藁本内酯、阿魏酸、大黄酸、Z-藁本内酯、芥子酸、绿原酸还可能通过TNF信号通路

影响PTGS2的表达,这些化合物共同发挥增强抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡等作用来达到增强抗脑缺血损伤的目的,见增强出版附加材料,但具体作用机制还有待进一步研究。

与关键靶点VEGFA所对应的差异性成分有7-羟基-3-丁烯基苯酞、洋川芎内酯B和洋川芎内酯C,然而,在川芎酒制后这3种成分的含量均降低,因此,虽然川芎可能通过VEGFA蛋白发挥抗脑缺血的功效,但酒制增效的机制可能不是通过作用于此蛋白。选择含量较高且在酒制之后峰面积升高程度较大的6种成分进行分子对接,可进一步验证川芎酒制可能通过这些关键蛋白发挥增效作用。在炮制过程中,成分的变化往往不是单一的,是存在多种成分的同时升高或者降低,升高或降低的成分往往会作用于不同的通路或者靶点,导致炮制机制的研究更为复杂,本研究将实际的差异性成分与网络药理学研究相结合,来筛选炮制增效的通路或者蛋白,可为炮制机制的研究提供有益借鉴。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

【参考文献】

- [1] 孟文婷,李东翔,佟玲.缺血性脑卒中的治疗研究进展[J].中国新药杂志,2016,25(10):1114-1120.
- [2] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019,5(1):70.
- [3] 陈孝男,杨爱琳,赵亚楠,等.缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展[J].中国中药杂志,2019,44(3):422-432.
- [4] 张艾嘉,王爽,王萍,等.缺血性脑卒中的病理机制研究进展及中医药防治[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(5):227-240.
- [5] LIU Z K, NG C F, SHIU H T, et al. A traditional Chinese formula composed of Chuanxiong Rhizoma and Gastrodiae Rhizoma (Da Chuanxiong formula) suppresses inflammatory response in LPS-induced RAW 264.7 cells through inhibition of NF- κ B pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2017,196:20-28.
- [6] HUANG J, LU X Q, ZHANG C, et al. Anti-inflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. [J]. Fitoterapia, 2013,91:21-27.
- [7] HUANG C, CAO X Y, CHEN X F, et al. A pectic polysaccharide from *Ligusticum chuanxiong* promotes intestine antioxidant defense in aged mice [J]. Carbohydr Polym, 2017,174:915-922.
- [8] LU C, ZHANG J, SHI X P, et al. Neuroprotective

- effects of tetramethylpyrazine against dopaminergic neuron injury in a rat model of Parkinson's disease induced by MPTP [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(4): 350-357.
- [9] 陈红阳,刘震,贾壮壮,等. 基于数据挖掘的名老中医治疗缺血性卒中用药规律分析[J]. 云南中医学院学报, 2020, 43(5): 79-84.
- [10] 莫嘉浩,华荣,许洪彬,等. 首批国医大师治疗脑卒中急性期的用药规律分析[J]. 中草药, 2020, 51(16): 4284-4290.
- [11] 蒋希成,李晓莹,陈阳燕,等. 川芎治疗缺血性脑卒中的研究进展[J/OL]. 中华中医药学刊: 1-10[2021-09-02]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20210816.1329.010.html>
- [12] 王成. 活血益气法对气虚血虚型缺血性卒中患者神经功能缺损的影响研究[J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(1): 218-220.
- [13] 迟雪洁,孙蓉. 川芎基于功效物质基础的抗脑缺血药理作用研究进展[J]. 中国药物警戒, 2013, 10(6): 355-357+361.
- [14] 桑纳,王平汉,杜俊蓉. 藁本内酯对小鼠海马区损伤的保护作用及其作用机制[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(3): 245-247.
- [15] 马进,甘雨,袁媛,等. 川芎赤芍干预脑缺血再灌注大鼠血管新生的实验研究[J]. 世界中医药, 2016, 11(6): 1060-1062.
- [16] 谢仲德,易东阳,方应权,等. 川芎炮制历史沿革及现代研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(9): 290-293.
- [17] NING Y, PEI K, CAO G, et al. Comparative study on pharmacokinetics of four active compounds in rat plasma after oral administration of raw and wine processed Chuanxiong Rhizoma [J]. *Molecules*, 2019, 25(1): E93.
- [18] 黄嘉滢,马子霖,程天翊,等. 基于网络药理学的附子-淫羊藿药对治疗慢性心力功能不全的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(10): 142-151.
- [19] 裴科,宁燕,蔡皓,等. 基于HPLC指纹图谱结合化学模式识别的川芎炮制前后对比研究[J]. 中草药, 2021, 52(5): 1274-1283.
- [20] 葛琦,万晶琼,朱益灵,等. 金蝉花核苷类成分的LC-MS定性分析与HPLC含量测定[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(11): 1857-1863, 1927.
- [21] 牛研,王书芳. LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MS²分析当归芍药散中化学成分[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [22] 周霖,李卓伦,牛超,等. 基于超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的妇可靖胶囊化学成分研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(8): 813-821.
- [23] 于舒婷,刘海霞,李昆,等. 采用UHPLC-Q-Exactive轨道阱高分辨质谱快速识别脑震宁颗粒的化学成分[J]. 药学学报, 2018, 53(4): 609-620.
- [24] 杨杰,李卓伦,孟海阳,等. UHPLC-Q-Orbitrap HRMS法分析精制冠心病软胶囊化学成分[J]. 中草药, 2020, 51(13): 3406-3415.
- [25] 张纪红,吴卫东,刘建庭,等. 基于UPLC-Q-TOF/MS技术活血止痛胶囊化学成分的快速分析[J]. 中草药, 2020, 51(12): 3139-3146.
- [26] 李卓伦,左莉华,孙志,等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的天麻首乌胶囊化学成分研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(2): 120-126.
- [27] 孙志,周霖,左莉华,等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的益心颗粒化学成分研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(10): 1197-1204.
- [28] 赵晓梅,程宇欣,梁彩霞,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的吴茱萸化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 113-126.
- [29] 周珮珮,周霖,孙志,等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的丹参川芎嗪注射液主要化学成分识别及含量测定研究[J]. 中国药学杂志, 2019, 54(4): 327-333.
- [30] 刘瑞,泰刚,王瑞,等. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS的羊红膈血清药物化学分析[J]. 中药材, 2021, 40(2): 364-369.
- [31] 朱琳,李永芳,李向阳. 基于UPLC-Q-Exactive技术对藏药八味沉香散血清药物化学的初步研究[J]. 中药材, 2020, 43(1): 88-94.
- [32] 蒋虎刚,赵信科,蔺文燕,等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS定性分析当归中多种香豆素类成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 157-162.
- [33] 李蓉蓉,游蓉丽,秦雪梅,等. 基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS技术快速识别芪蛭通络胶囊化学成分[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(20): 4918-4928.
- [34] 李宁. 基于UHPLC-Q-Orbitrap HRMS技术的参桂胶囊中主要化学成分研究[J]. 中草药, 2019, 50(3): 573-581.
- [35] 王镇方,赵阳,范自全,等. 基于中药成分数据库的四物汤化学成分快速定性分析[J]. 药学学报, 2015, 50(10): 1309-1317.
- [36] 高昕,孙文军,岐琳,等. 基于超高效液相色谱-电喷雾-飞行时间质谱的川芎化学成分的快速分析[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(6): 711-715.
- [37] 张宁,高霞,周宇,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS快速分析杏贝止咳颗粒化学成分[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(22): 4439-4449.

- [38] 游飞祥,袁雪海,许浚,等. 基于HPLC-Q-TOF/MS的六经头痛片化学成分分析[J]. 中草药, 2017, 48(20):4157-4166.
- [39] 秦伟瀚,冉继春,叶良红,等. UPLC-Q/TOF法同时定性定量分析滇芹药材中主要化学成分[J]. 中草药, 2018, 49(15):3576-3582.
- [40] 张梦雅,孙志,周霖,等. 基于超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱技术的活血通脉片化学成分研究[J]. 中国医院药学杂志, 2019, 39(5):455-465.
- [41] 王春国,罗亚敏,宋慧荣,等. 基于超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道质谱研究偏痛汤1号方的入血活性成分[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(11):1547-1549,1570.
- [42] 李卓伦,王振辉,周霖,等. 基于UPLC-Q-Orbitrap HRMS方法的丹黄祛瘀胶囊中多种化学成分研究[J]. 中草药, 2017, 48(18):3705-3713.
- [43] 尹权微,林夏,秦建平,等. UPLC-QTOF/MS法对活血通络粉针化学成分的初步分析[J]. 药学与临床研究, 2016, 24(3):198-200.
- [44] 常冠华,薄颖异,崔洁,等. 基于UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS分析甘草地上部分主要化学成分[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6):1449-1459.
- [45] 胡杨,刘春明,胡蕴梅,等. 川芎化学成分的高效液相色谱-电喷雾质谱研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(8):1868-1869,1872.
- [46] 李晓凤,张少强,刘金彪,等. 基于UPLC/Q-TOF MS/MS的稳心颗粒主要成分分析及鉴定[J]. 天津中医药, 2020, 37(8):943-948.
- [47] 容悦莹,冯素香,刘冬云,等. HPLC-MS/MS法鉴定脑脉通中的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(7):1544-1550.
- [48] 李欣,唐力英,许静,等. 基于UPLC-LTQ-Orbitrap高分辨质谱的中药瓜蒌化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(1):201-210.
- [49] 吴昊,于小红,马光朝,等. 基于LC-MS的甘草炮制雷公藤降低肝毒性的代谢组学研究[J]. 中草药, 2020, 51(21):5501-5508.
- [50] ZHANG L, ZHANG W, CHEN W, et al. Simultaneous determination of five bioactive constituents in Rhizoma Chuanxiong by capillary electrophoresis with a carbon nanotube-polydimethylsiloxane composite electrode [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 131:107-112.
- [51] 林红. 洋川芎内酯A对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 北方药学, 2016, 13(4):114-115.
- [52] 凌婧. 川芎挥发油对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究[D]. 成都:四川大学, 2006.
- [53] 毛晓霞,夏爱华,吴晓光,等. 山楂叶总黄酮对脑缺血再灌注损伤大鼠神经元凋亡和c-Fos, c-Jun表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(2):174-177.
- [54] LIANG Z, WU G, FAN C, et al. The emerging role of signal transducer and activator of transcription 3 in cerebral ischemic and hemorrhagic stroke [J]. Prog Neurobiol, 2016, 137:1-16.
- [55] 赵帅,吴东雪,陈茜,等. 基于网络药理学的豨薟草治疗缺血性脑卒中作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13):2727-2735.
- [56] HOVHANNESYAN R A, HOVHANNISYAN I G. Platelet aggregation and interleukins indicators impacting the outcomes of ischemic stroke [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2019, 28:2038-2044.
- [57] 郭莹,张则一,周展羽. 银杏黄酮、银杏内酯及联合应用对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中成药, 2020, 42(2):497-500.
- [58] 戚明珠,张锐雪,苏晓慧,等. 黄芪甲苷治疗缺血性脑卒中的网络药理学[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(3):163-170.
- [59] 高雅,王云,郑颖豪,等. 基于HPLC-Q-TOF-MS/MS和网络药理学方法探讨栀子治疗缺血性脑中风的潜在药效物质及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(14):119-128.
- [60] 刘茜,罗永杰. 依达拉奉对急性脑缺血/再灌注大鼠AQP4和A β 表达及MMP-2和MMP-9活性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(10):1805-1810.

[责任编辑 刘德文]