

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

高雅^{1,2}, 王云², 郑颖豪², 夏梦雨^{2,3}, 张村^{1,2,3*}, 王成永^{1*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 河南中医药大学药学院, 郑州 450008)

[摘要] 目的:结合高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(HPLC-Q-TOF-MS/MS)和网络药理学方法预测栀子治疗脑缺血的作用靶点及潜在的作用机制,为深入揭示栀子治疗脑缺血的药效物质及作用机制奠定基础。方法:根据色谱峰保留时间、精确相对分子质量、二级质谱裂解碎片等质谱信息,并结合文献数据,对栀子化学成分进行鉴定。通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)数据库和SwissTargetPrediction数据库预测栀子活性成分的潜在靶点;通过在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM),GeneCards数据库,京都基因与基因组百科全书(KEGG)等数据库筛选栀子预防或治疗脑缺血相关的靶标。利用DAVID 6.8对潜在靶点进行基因本体(GO)注释和KEGG通路富集分析,应用Cytoscape 3.6.0软件构建“活性成分-靶点-通路”网络,并通过Discovery Studio 2016软件对栀子的关键活性成分与作用靶点进行分子对接验证。结果:从栀子中鉴定了40个成分,包括环烯醚萜类、二萜色素类、有机酸类、单萜类等;根据活性成分预测出208个潜在的作用靶点,检索到560个与脑缺血相关的疾病靶点,将成分靶点与疾病靶点相映射得到交集靶点59个,包括肿瘤坏死因子(TNF),半胱氨酸蛋白酶3(CASP3)和CASP8等;涉及通路包括TNF信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路等。分子对接结果表明栀子苷可与靶点前列腺素G/H合成酶2(PTGS2),TNF和细胞核转录因子- κ B p65(RELA)发生相互作用,西红花苷I可与白细胞介素-2(IL-2)发生相互作用。结论:栀子的活性成分栀子苷、西红花苷I等可能通过上调RELA,IL-2蛋白的表达,下调TNF,CASP8,CASP3,基质金属蛋白酶2(MMP2)蛋白的表达,调控TNF,PI3K/Akt,HIF-1等信号通路,发挥抗炎、抑制细胞凋亡等作用预防或治疗脑缺血性疾病。

[关键词] 栀子; 脑缺血; 网络药理学; 分子对接; 炎症因子; 信号通路

[中图分类号] R22;R743;R857.3;R28;O657 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)14-0119-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210750 **[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.20210127.0938.002.html>

[网络出版日期] 2021-01-27 11:34

Investigation of Potential Pharmacodynamic Substances and Mechanism of Gardeniae Fructus in Treatment of Ischemic Stroke Based on HPLC-Q-TOF-MS/MS and Network Pharmacology

GAO Ya^{1,2}, WANG Yun², ZHENG Ying-hao², XIA Meng-yu^{2,3}, ZHANG Cun^{1,2,3*}, WANG Cheng-yong^{1*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Heifei 230012, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,

China; 3. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

[Abstract] **Objective:** Combined with high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (HPLC-Q-TOF-MS/MS) and network pharmacology, to predict the target and

[收稿日期] 20201119(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703708,81873010,81473356);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(zz13-YQ-050)

[第一作者] 高雅,在读硕士,从事中药炮制学研究,Tel:010-64032658,E-mail:2601804192@qq.com

[通信作者] *张村,研究员,博士生导师,从事中药炮制、中药化学研究,Tel:010-64032658,E-mail:zhe95@163.com;

*王成永,教授,硕士生导师,从事中药制剂研究,Tel:0551-5169237,E-mail:chyw_hf@163.com

potential mechanism of Gardeniae Fructus in the treatment of cerebral ischemia. **Method:** HPLC-Q-TOF-MS/MS was used to identify the chemical constituents of Gardeniae Fructus according to the retention time, relative molecular weight, secondary mass spectrometry fragmentation and other information of chromatographic peaks, and combined with literature data. The targets of main active ingredients in Gardeniae Fructus were predicted by Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and SwissTargetPrediction database. The potential targets of Gardeniae Fructus against cerebral ischemia were obtained through Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), GeneCards and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Gene ontology (GO) function enrichment and KEGG pathway analysis of potential targets were analyzed with the DAVID 6.8. Cytoscape 3.6.0 software was used to construct the network of active components-targets-pathways. At last, Discovery Studio 2016 software was applied in the molecular docking verification between the key active ingredients and potential protein targets. **Result:** A total of 40 chemical constituents in Gardeniae Fructus were identified, including iridoids, diterpenoid pigments, organic acids, monoterpenoids and other components. According to the main active ingredients, 208 potential targets were predicted, 560 disease targets related to cerebral ischemia were retrieved, 59 key targets were selected by mapping component targets with disease targets. These targets could act on key target proteins such as tumor necrosis factor (TNF), Caspase-3 (CASP3) and CASP8, and participate in the regulation of TNF, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and other signal pathways. Molecular docking results showed that geniposide could interact with targets of prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), TNF and nuclear transcription factor- κ B p65 (RELA), crocin I could interact with interleukin-2 (IL-2). **Conclusion:** Geniposide, crocin I and other ingredients in Gardeniae Fructus can play a role of anti-inflammatory and inhibiting apoptosis to prevent or treat cerebral ischemic diseases by up-regulating protein expression level of RELA and IL-2, down-regulating protein expression level of TNF, CASP8, CASP3 and matrix metalloproteinase 2 (MMP2), and regulating TNF, PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathways.

[**Keywords**] Gardeniae Fructus; cerebral ischemia; network pharmacology; molecular docking; inflammatory cytokines; signaling pathways

脑中风又称脑卒中,是威胁人类健康的主要疾病之一。据报道,80%的脑中风是由脑缺血引起的。梔子为茜草科植物梔子的干燥成熟果实,由于其对缺血性脑中风具有较好疗效而广受关注。实验研究发现梔子主要通过保护血管内皮细胞、抑制细胞凋亡、抗炎、抗氧化应激等方式预防或治疗脑缺血和缺血再灌注损伤^[1],但其具体的药效物质及作用机制尚不清楚。

梔子主要药效物质包括环烯醚萜苷类、二萜色素类、有机酸、黄酮等成分。目前文献报道了以各种现代色谱分离技术和液质联用分析技术鉴定梔子的化学成分,例如,李海波等^[2]采用大孔吸附树脂和硅胶柱色谱方法对梔子果实30%大孔吸附树脂乙醇洗脱物进行分离鉴定,经核磁共振技术鉴定,共得到31个化合物。汤丹等^[3]采用高效液相色谱偶联静电场轨道阱高分辨质谱法(HPLC-DAD-Q-Exactive)从梔子的甲醇提取物中鉴定了13个成分;叶日贵等^[4]通过液相色谱/离子阱质谱法(LC/MSD

Trap)检测出梔子中13个成分。但这些文献分析鉴定的化学成分数目较少,尚不能全面反映梔子的整体化学成分特征。网络药理学已被应用于中药复方的配伍规律、复方优化、中药活性成分筛选及辨识等方面,通过分析中药成分-靶点-疾病的相关性,可进一步阐明中药复杂体系的科学内涵,为“多成分、多靶点”的中药物质基础和作用机制研究提供了重要手段^[5]。

基于此,本研究拟采用高效液相色谱-四极杆飞行时间串联质谱法(HPLC-Q-TOF-MS/MS)分析梔子提取物中的主要化学成分,并以鉴定得到的化学成分为切入点,利用网络药理学方法预测其预防或治疗脑缺血疾病的活性成分和作用靶点,通过基因本体(GO)数据库和京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库分析其作用特点,进一步采用分子对接技术对活性成分和关键靶点进行验证,为深入阐明梔子主要活性成分预防或治疗脑缺血的药效物质及作用机制研究提供数据支撑。

1 材料

1260 Infinity II型高效液相色谱仪和6520 Q-TOF型四极杆飞行时间串联质谱仪(美国Agilent公司),XS105DU型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司),FA2204B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。梔子饮片(批号20191019)采自福建,经中国中医科学院中药研究所张村研究员鉴定为茜草科植物梔子 *Gardenia jasminoides* 的干燥成熟果实;绿原酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号110753-201314,纯度 $\geq 98\%$),山梔苷、鸡屎藤次苷甲酯、梔子苷酸对照品(成都克洛玛生物科技有限公司,批号分别为CHB170224, CHB151118, CHB171229,纯度均 $\geq 98\%$),梔子苷、羟异梔子苷、梔子新苷、去乙酰车叶草苷酸甲酯、龙船花苷、京尼平-1-*O*- β -D-龙胆双糖苷对照品[自制,经核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$),核磁共振碳谱($^{13}\text{C-NMR}$),质谱法(MS)鉴定结构,纯度经高效液相色谱法(HPLC)面积归一化法测定均 $> 98\%$],水为娃哈哈纯净水,甲醇、乙腈和甲酸为色谱纯,其他试剂均为分析纯。

中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <https://tcmssp.com/index.php>), PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org/>), GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>), KEGG 数据库(<http://www.kegg.jp/>), UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>), DAVID 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>), imageGP 平台(<http://www.ehbio.com/ImageGP/>), 蛋白结构数据库(PDB, <http://www.rcsb.org/>), Cytoscape 3.6.0 和 Discovery Studio 2016。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

2.1.1 梔子样品溶液 取梔子样品适量,粉碎(过四号筛),精密称取0.5 g,置锥形瓶中,精密加入50%甲醇25 mL,密塞,称定质量,超声30 min,放冷,称定质量,用50%甲醇补足减失的质量,摇匀,滤过,取续滤液,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.1.2 对照品溶液 精密称取各对照品适量,置于10 mL量瓶中,加50%甲醇使溶解并定容,制成适宜质量浓度的混合对照品溶液,经0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

2.2 色谱条件 Phenomenex Luna C_{18} (2) 100A 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm),流速1.0 mL \cdot min $^{-1}$,

柱温35 $^{\circ}\text{C}$,进样量2 μL ,流动相乙腈(A)-0.5%甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 6%A; 10~18 min, 6%~12%A; 18~25 min, 12%~17%A; 25~35 min, 17%~20%A; 35~45 min, 20%~27%A; 45~65 min, 27%~32%A; 65~70 min, 32%~36%A; 70~72 min, 36%~55%A; 72~77 min, 55%~100%A)。

2.3 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),负离子检测模式,氮气作为去溶剂化气体。干燥气温度350 $^{\circ}\text{C}$,干燥气流速8 L \cdot min $^{-1}$,毛细管电压3.0 kV,锥形电压30 kV,碰撞能量15~45 V,扫描模式为全扫描,质量扫描范围 m/z 50~1 500。

2.4 梔子化学成分的鉴定 采用上述色谱和质谱条件对梔子样品溶液和混合对照品溶液进行分析。根据文献[6-15]建立梔子化学成分数据库,数据采集和分析采用 MassHunter B.06.00 软件。通过 Agilent MassHunter Qualitative Analysis 软件的分子特征提取功能查找化合物;根据查找到的化合物,选择精确相对分子质量在 ± 10 ppm范围内的,生成可能的分子式,与化学成分数据库比对,对梔子样品溶液的总离子流色谱图(TIC)匹配出的化学成分进行鉴定,见表1和图1。结果通过保留时间(t_{R}),裂解规律和文献信息共鉴定了40个化学成分,包括16个环烯醚萜类,9个有机酸类,7个单萜类,5个二萜色素类和3个类黄酮类成分。

2.5 网络药理学分析

2.5.1 梔子成分选择及其作用靶点预测 由表1可知,梔子的主要成分包括环烯醚萜苷、二萜色素类、有机酸类等,基本反映了梔子的化学物质组成。选取鉴定的全部梔子活性成分作为目标成分,利用 PubChem 数据库获得成分的分子式和 SMILES 格式,进一步将其分别输入 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库,选择物种为“Homo sapiens”,获取208个成分的相关靶点。

2.5.2 治疗脑缺血疾病靶点的搜集 以“cerebral ischemia”为关键词,检索3个疾病靶点数据库(OMIM, GeneCards, KEGG),得到560个与脑缺血疾病相关的作用靶点,通过 UniProt 数据库将靶点蛋白信息转化为 UniProt ID,合并重复靶点基因,与获得的成分靶点基因进行比对,最终获得59个治疗脑缺血潜在的靶点基因。

2.5.3 生物通路分析 将潜在靶点输入 DAVID 平台,进行 GO 注释分析及 KEGG 通路分析,保存其结果,并通过 imageGP 平台对结果可视化。GO 功能注释是通过生物过程(BP),分子功能(MF)和细胞

表1 栀子中化学成分的高分辨质谱鉴定

Table 1 Identification of chemical components in Gardeniae Fructus by HPLC-Q-TOF-MS/MS

No.	t_R /min	加合离子	m/z 实测值	m/z 理论值	δ /ppm	碎片离子	分子式	化合物	类型
1	5.28	[M-H] ⁻	191.056 0	191.056 1	0.48	173.112 4, 85.932 1	C ₇ H ₁₂ O ₆	奎宁酸 ²⁾	a ^[6]
2	6.00	[M-H] ⁻	389.107 9	389.108 9	2.60	389.116 3, 165.053 7	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	去乙酰车叶草苷酸 ²⁾	b ^[6]
3	7.64	[M-H] ⁻	373.117 3	373.114 0	1.63	167.067 0	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	栀子新苷 ^{1,2)}	b ^[6]
4	7.98	[M-H] ⁻	391.123 4	391.124 6	3.06	229.075 0	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	山栀子苷同分异构体	b ^[7]
5	8.07	[M-H] ⁻	405.141 0	405.140 2	-2.00	225.074 2, 149.684 9	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁	山栀子甲酯 ²⁾	b ^[6]
6	9.87	[M-H] ⁻	391.125 3	391.124 6	-1.93	167.068 8	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₁	山栀子 ^{1,2)}	b ^[7]
7	10.86	[M-H] ⁻	373.114 4	373.114 0	-1.08	149.052 2	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	栀子苷酸 ^{1,2)}	b ^[7]
8	14.28	[M-H] ⁻	375.129 3	375.129 7	0.92	213.772 1	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	mussaenosidic acid ²⁾	b ^[6]
9	15.69	[M+HCOO] ⁻	449.129 6	449.130 1	0.95	403.120 7, 241.084 0, 223.059 0	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	去乙酰车叶草苷酸甲酯 ^{1,2)}	b ^[6]
10	16.17	[M+HCOO] ⁻	449.131 2	449.130 1	-2.62	241.071 0, 101.024 1	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	羟异栀子苷 ^{1,2)}	b ^[8-9]
11	16.68	[M-H] ⁻	345.155 1	345.155 5	1.25	165.092 7	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	苦藏红花酸 ²⁾	c ^[6]
12	17.23	[M+HCOO] ⁻	405.140 1	405.140 2	0.32	451.731 2, 353.175 3	C ₁₆ H ₂₄ O ₉	龙船花苷 ^{1,2)}	b ^[10]
13	17.37	[M-H] ⁻	353.087 7	353.087 8	0.39	191.744 7	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	新绿原酸 ²⁾	a ^[6]
14	20.11	[M+HCOO] ⁻	449.130 2	449.130 1	-0.27	139.275 0	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	鸡屎藤次苷甲酯 ^{1,2)}	b ^[8]
15	20.80	[M+HCOO] ⁻	391.161 6	391.161 0	-1.70	165.095 6, 153.089 7, 89.028 3	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	jasminoside B/D ²⁾	c ^[7,10]
16	23.41	[M-H] ⁻	353.087 2	353.087 8	1.84	191.057 3, 173.043 4	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸 ^{1,2)}	a ^[7-9]
17	23.45	[M+HCOO] ⁻	595.188 7	595.188 0	-1.27	225.076 8, 207.065 3, 123.045 2	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	京尼平-1- <i>O</i> - β -D-龙胆双糖苷 ^{1,2)}	b ^[7,9]
18	24.35	[M-H] ⁻	353.087 8	353.087 8	-0.07	191.054 5, 179.032 0	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	(-)-隐绿原酸 ²⁾	a ^[6]
19	26.45	[M+HCOO] ⁻	433.135 3	433.135 1	-0.37	433.142 0, 207.065 7, 123.044 5, 101.024 3	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	栀子苷 ^{1,2)}	b ^[8]
20	27.52	[M-H] ⁻	345.155 3	345.155 5	0.54	165.092 8, 121.102 3	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	jasminoside B/D ²⁾	c ^[7,10]
21	29.54	[M+HCOO] ⁻	375.164 8	375.166 1	3.38	161.895 9, 89.018 9	C ₁₆ H ₂₆ O ₇	藏红花苦素 ²⁾	c ^[6]
22	34.68	[M-H] ⁻	609.145 3	609.146 1	1.36	301.036 6, 300.026 1, 271.014 0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	芦丁 ²⁾	d ^[7,11]
23	36.05	[M-H] ⁻	463.090 0	463.088 2	-3.91	301.032 4, 271.025 3, 255.090 7	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	异槲皮素 ²⁾	d ^[11]
24	39.57	[M-H] ⁻	593.152 5	593.151 2	-2.16	325.503 6	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	烟花苷 ²⁾	d ^[6]
25	42.18	[M-H] ⁻	515.118 9	515.119 5	1.25	191.056 9, 179.034 9	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3,4-二咖啡酰奎宁酸 ²⁾	a ^[6]
26	42.87	[M-H] ⁻	515.118 2	515.119 5	2.50	191.048 5, 179.052 0	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	3,5-二咖啡酰奎宁酸 ²⁾	a ^[12]
27	43.30	[M+HCOO] ⁻	537.218 8	537.218 9	0.10	340.092 3, 167.109 4, 119.031 6	C ₂₂ H ₃₆ O ₁₂	jasminoside Q	c ^[6]
28	44.15	[M-H] ⁻	695.220 4	695.219 3	-1.56	663.187 5, 469.134 3, 225.076 5, 145.028 9	C ₃₂ H ₄₀ O ₁₇	6''- <i>O</i> -[(<i>E</i>)- <i>p</i> -香豆酰基]京尼平龙胆二糖苷	b ^[12-13]
29	44.28	[M-H] ⁻	515.120 0	515.119 5	-1.06	353.113 3, 191.052 7, 179.031 1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	4,5-二咖啡酰奎宁酸 ²⁾	a ^[6]
30	45.35	[M-H] ⁻	725.229 5	725.229 8	0.48	225.414 4, 193.050 3, 123.042 3	C ₃₃ H ₄₂ O ₁₈	6''- <i>O</i> - <i>trans</i> -feruloyl genipin gentiobioside	b ^[12]
31	45.83	[M-H] ⁻	975.371 9	975.371 5	-0.45	651.265 3, 327.159 3, 179.053 0	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	西红花苷 I ²⁾	e ^[9]
32	46.00	[M-H] ⁻	659.614 0	659.161 8	0.47	497.126 7, 353.087 8, 191.055 9	C ₃₁ H ₃₂ O ₁₆	3,5-二- <i>O</i> -咖啡酰基-4- <i>O</i> -(3-羟基-3-甲基)戊二酰基奎宁酸	a ^[13]
33	47.11	[M-H] ⁻	551.213 0	551.213 4	0.73	521.207 6, 367.099 0, 165.089 0	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₂	6'- <i>O</i> - <i>trans</i> -sinapoyl jasminoside L	c ^[6]
34	49.30	[M-H] ⁻	559.143 2	559.145 7	3.97	223.060 4, 191.056 1	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃	3- <i>O</i> -sinapoyl-5- <i>O</i> -caffeoylquinic acid	a ^[6]
35	49.43	[M+HCOO] ⁻	859.325 2	859.324 1	-1.29	651.285 8, 327.157 2, 179.045 8	C ₃₈ H ₅₄ O ₁₉	西红花苷 II ²⁾	e ^[8-9]
36	56.75	[M-H] ⁻	535.217 9	535.218 5	1.02	345.441 3	C ₂₇ H ₃₆ O ₁₁	6'- <i>O</i> - <i>trans</i> -sinapoyl jasminoside A	c ^[10]
37	60.44	[M-H] ⁻	593.185 3	593.187 6	3.78	282.076 7	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	6'- <i>O</i> -sinapoyl geniposide	b ^[10]
38	65.46	[M-H] ⁻	975.372 4	975.374 9	-1.48	651.262 0, 327.161 1, 179.053 5	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	西红花苷 I 同分异构体	e ^[7,9]
39	65.50	[M-H] ⁻	651.263 7	651.265 8	3.22	327.150 7, 283.165 7, 239.178 3	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	all- <i>trans</i> -crocetin di(β -D-glucosyl)ester	e ^[9]
40	72.91	[M-H] ⁻	651.266 3	651.265 8	-0.65	327.157 0, 283.267 4, 239.180 0	C ₃₂ H ₄₄ O ₁₄	crocetin-mono-(β -D-gentiobiosyl)-ester	e ^[6]

注: ¹⁾经对照品比对后确定; ²⁾PubChem数据库收录成分; a. 有机酸; b. 环烯醚萜; c. 单萜; d. 类黄酮; e. 二萜色素。

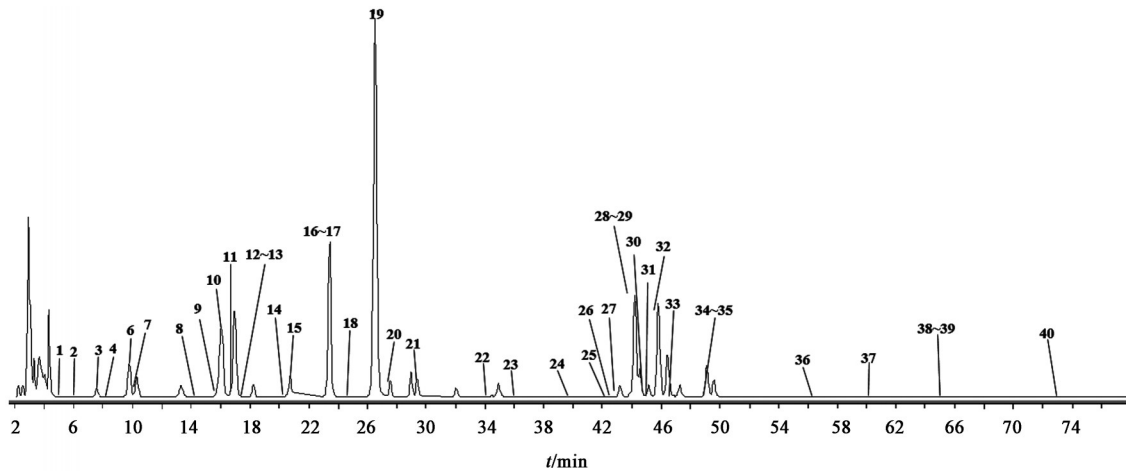


图1 栀子 HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析的 TIC

Fig. 1 Total ion chromatogram (TIC) of Gardeniae Fructus by HPLC-Q-TOF-MS/MS

组分(CC)对基因进行注释和分类。结果发现在BP中细胞增殖的正、负调控,炎症反应所占比例较高;在MF中蛋白结合、酶结合影响相对靠前;在CC中细胞浆、细胞质、细胞外空隙相关性最大。为进一步明确靶点的生物学功能,对其进行KEGG通路分析,选取有统计学意义($P < 0.05$)的所有通路,并根据相关文献筛选得到13条直接或间接与脑缺血相关的通路,如肿瘤坏死因子(TNF)信号通路和Toll样受体信号通路、细胞凋亡等。

2.5.4 “活性成分-靶点-通路”网络构建与分析 将栀子的活性成分、脑缺血的靶点数据导入Cytoscape 3.6.0软件,构建栀子治疗脑缺血的“活性成分-靶点-通路”网络,采用Network Analysis计算网络拓扑参数。在输出的网络中,以不同颜色的节点表示活性

成分、靶点及作用通路,黄色菱形节点代表栀子活性成分,红色圆形节点代表作用通路,而蓝色方形节点代表作用靶点。节点大小与连接度(degree)呈正相关,边的粗细与中介中心性呈正相关。对网络进行拓扑分析,以节点中介中心性大于中位数0.004,节点紧密度大于中位数0.312,degree大于2倍中位数6,筛选得到半胱氨酸蛋白酶3(CASP3),腺苷A1受体(ADORA1),TNF等11个核心靶点,见表2。对网络中栀子的20个活性成分根据degree排序,其中degree较高的活性成分为芦丁、藏红花苦素等,见表3。对网络中栀子的13个通路节点根据degree排序,其中degree较高的通路为TNF信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路和缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路,见表4。

表2 栀子治疗脑缺血的核心靶点

Table 2 Key targets of Gardeniae Fructus against cerebral ischemia

UniProt ID	基因名称	蛋白名称	中介中心性	紧密度	degree
P42574	CASP3	Caspase-3	0.121	0.411	11
P30542	ADORA1	adenosine A1 receptor	0.115	0.365	11
Q04206	RELA	细胞核转录因子- κ B p65(nuclear transcription factor- κ B p65)	0.040	0.383	10
P01375	TNF	肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor)	0.039	0.362	10
P35968	KDR	血管内皮生长因子受体-2(vascular endothelial growth factor receptor 2)	0.086	0.387	9
P48736	PIK3CG	磷酸肌醇-3-激酶催化亚基G肽(phosphoinositide-3-kinase catalytic G polypeptide)	0.045	0.371	9
Q14790	CASP8	Caspase-8	0.043	0.346	9
P60568	IL-2	白细胞介素(interleukin)-2	0.046	0.380	7
P08253	MMP2	基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2)	0.045	0.338	7
P35354	PTGS2	前列腺素G/H合成酶2(prostaglandin G/H synthase 2)	0.036	0.351	7
P05231	IL-6	interleukin-6	0.025	0.368	7

表3 栀子调控脑缺血相关成分的网络参数

Table 3 Network parameter of related components in *Gardeniae Fructus* against cerebral ischemia

MOL. ID	成分	degree	口服生物利用度/%	类药性
MOL000415	芦丁	19	3.20	0.68
MOL001408	藏红花苦素	18	33.71	0.04
MOL001878	4,5-二咖啡酰奎宁酸	15	1.78	0.69
MOL004557	栀子苷	11	14.64	0.44
MOL003067	3,4-二咖啡酰奎宁酸	10	1.71	0.69
MOL000222	新绿原酸	8	11.93	0.33
MOL006503	(-)-隐绿原酸	7	24.50	0.33
MOL002693	烟花苷	6	3.64	0.73
MOL000437	异槲皮素	6	0.86	0.77
MOL007316	3,5-二咖啡酰奎宁酸	5	1.79	0.68
MOL001955	绿原酸	5	11.93	0.33
MOL004556	西红花苷 I	5	7.06	0.12
MOL004554	羟异栀子苷	3	10.55	0.49
MOL001668	栀子苷酸	3	19.59	0.41
MOL004556	西红花苷 II	2	7.06	0.12
MOL004554	栀子新苷	2	10.55	0.49
MOL009038	京尼平-1-O-β-D-龙胆双糖苷	2	45.58	0.83
MOL004544	奎宁酸	2	65.53	0.06
MOL004559	山栀子苷	2	2.20	0.44
MOL007147	山栀子甲酯	2	6.46	0.47

2.6 分子对接验证 选取活性成分中 degree≥5(中位数)且口服生物利用度(OB)较高(OB≥5%)的6个成分依次与9个核心治疗靶点对接(其中ADORA1和KDR参与脑缺血相关通路较少,不对其进行进一步分析),采用Discovery Studio 2016软件进行分子结构常规预处理,去除所有水分子,加氢后进行力场优化。导入成分配体选择LibDock对接模式,记录受体与配体的对接分数,见表5。由于9个核心靶点中PIK3CG和IL-6的对接成分较少且对接分数低,故选取其余7个靶点与打分最高的成分进行分析。结果表明栀子苷可与靶点PTGS2, TNF和RELA发生相互作用,作用于其残基天冬酰胺(ASN)375,精氨酸(ARG)376,缬氨酸(VAL)538,谷氨酰胺(GLN)374,天冬氨酸(ASP)10,亮氨酸(LEU)157,丝氨酸(SER)52, ASN39, ASP126;(-)-隐绿原酸可与靶点CASP3, MMP2发生相互作用,作用于其残基甘氨酸(GLY)75,丙氨酸(ALA)46, GLN 480, SER 575, ASP 622, 谷氨酸(GLU)525, VAL 523, GLY 627, ALA 571;藏红花苦素可与靶点

表4 栀子调控的脑缺血相关信号通路

Table 4 Signaling pathways related with cerebral ischemia regulated by *Gardeniae Fructus*

ID	通路	degree
hsa04668	TNF 信号通路	12
hsa04151	PI3K/Akt 信号通路	12
hsa04066	HIF-1 信号通路	10
hsa04620	Toll样受体信号通路(Toll-like receptor signaling pathway)	8
hsa04010	丝裂原活化蛋白激酶信号通路(MAPK signaling pathway)	8
hsa04621	核苷酸结合寡聚化结构域(NOD)样受体信号通路(NOD-like receptor signaling pathway)	7
hsa04210	细胞凋亡(apoptosis)	7
hsa04064	核转录因子-κB 信号通路(NF-κB signaling pathway)	7
hsa04660	T细胞受体信号通路(T cell receptor signaling pathway)	5
hsa04068	叉头框蛋白O(FoxO)信号通路(FoxO signaling pathway)	5
hsa04022	环鸟苷单磷酸-蛋白激酶G信号通路(cGMP-PKG signaling pathway)	5
hsa04370	血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)	4
hsa04115	p53 线粒体凋亡通路(p53 signaling pathway)	4

CASP8 发生相互作用,作用于其残基 GLN 374, ASN 392, GLN 450;西红花苷 I 可与靶点 IL-2 发生相互作用,作用于其残基氨基酸 GLN 74, ARG 83。

3 讨论

脑缺血属于中医“中风”范畴,中医认为中风多因气血逆乱,产生风、火、痰、瘀,导致脑脉痹所致。中风的病机较为复杂,历代医家对其论述较为丰富,主要包括虚(阴、气虚),火(肝、心),风(肝、外),痰(风、湿),气(气逆),血(血瘀)6种。中风在急性期以血瘀证、风证、痰证居多;恢复期以血瘀证、痰证为主;后遗症以血瘀、气虚和痰证为主。血瘀证和痰证在每个时期占比均很高。痰瘀并存在每个病期表现也非常突出。临床研究发现,在中风诸多病理因素中,以瘀、痰最为常见,并且贯穿该病始终。痰、瘀之生成,均生于气,气虚表现火热较多,发病时一般表现为痰浊不化、瘀血阻滞、痰瘀化热,痰、瘀、热交阻关系密切,最终导致气血逆乱^[16-17]。

近年来,针对脑缺血性疾病,王永炎院士提出了“毒损脑络”学说,“瘀、热、痰三毒互结,导致邪毒内生、毒生络损、神机失用”的变化过程基本契合了该病的发生、发展及临床表现^[18],在治疗上宜解毒

表5 栀子活性成分与关键靶点蛋白的分子对接打分

Table 5 Molecular docking scores between key targets and active components in *Gardeniae Fructus* 分

化合物	核心靶点								
	CASP3 (6C10)	RELA (6QHL)	TNF (2AZ5)	PIK3CG (4FJZ)	CASP8 (3H11)	IL-2 (1M48)	MMP2 (1RTG)	PTGS2 (5KIR)	IL-6 (1ALU)
藏红花苦素	103.811	107.142	95.505	67.846	125.400	102.853	132.412	-	74.254
栀子苷	119.175	110.487	98.807	-	-	108.935	147.460	129.489	-
新绿原酸	121.862	99.427	74.349	-	107.874	114.403	150.675	-	-
(-)-隐绿原酸	121.890	110.096	88.429	-	-	109.008	154.887	-	-
绿原酸	119.588	98.3977	-	-	101.334	118.749	147.187	-	-
西红花苷 I	-	-	-	-	-	185.360	-	-	-

注:括号内为核心靶点的PDB编号。

通络、通腑化痰泄热、调和营卫。栀子具有泻火、除烦、清热利湿、凉血解毒的功效^[19],可清三焦郁火,偏清血分热,凉血,清心,治疗痰热蕴结之心烦懊恼,常被用来和各种饮片配伍治疗脑中风。已有研究表明,栀子苷可以干预炎症反应过程,保护血管内皮细胞,拮抗脑缺血损伤的级联反应,从而起到抑制神经元损伤的作用^[20]。栀子王永炎院士结合药性理论和临床实践经验研究所得解毒通络方剂的主要药物之一^[21],也是清开灵制剂的主要成分之一^[22],因此,有必要对栀子进行深入、系统的研究,为开发治疗脑缺血的产品奠定基础^[23]。

3.1 栀子治疗脑缺血的活性成分 栀子的主要活性成分为环烯醚萜苷类和二萜色素类成分,这两类化合物在负离子模式下响应值要强于正离子模式;此外,还有黄酮类和有机酚酸类成分,这些成分在正、负离子模式下均有较好响应;栀子正、负离子模式下色谱峰基本上是一致的,因此,本文只选择了在负离子模式下的TIC进行分析。

本文采用HPLC-Q-TOF-MS/MS技术从栀子的提取物中鉴定了40个成分,包括16个环烯醚萜类,9个有机酸类,7个单萜类,5个二萜色素类,3个类黄酮类成分,其中经对照品确认的有10个成分。这与文献报道栀子的主要药效物质基础相一致^[24]。选取鉴定的全部成分作为目标成分,其中28个成分被PubChem数据库收录,另外12个成分如3-O-sinapoyl-5-O-caffeoylquinic acid, jasminoside D, jasminoside Q, 6'-O-trans-sinapoyl jasminoside L等由于在栀子中含量较低、市场上无相应对照品,相关研究较少涉及,未找到其作用靶点。构建“活性成分-靶点-通路”网络,结果表明有20个成分参与调控脑缺血的分子网络,其中芦丁、藏红花苦素等在调控网络中影响程度较大。现有文献报道栀子治

疗脑缺血以栀子苷、西红花苷较为多见,(-)-隐绿原酸、藏红花苦素等较少,可为栀子预防或治疗脑缺血提供新的活性成分。

3.2 栀子治疗脑缺血的潜在作用靶点 本研究根据“活性成分-靶点-通路”网络拓扑分析,得到栀子治疗脑缺血疾病的11个核心基因为TNF, IL-6, RELA, PTGS2, CASP8, CASP3, IL-2, MMP2, PIK3CG, ADORA1和KDR。脑缺血早期会产生TNF- α 和IL-6等炎性因子,可激活白细胞(特别是多核白细胞和单核巨噬细胞)黏附到脑缺血区微血管内皮细胞上,引起内皮细胞皱缩、破裂和坏死,破坏血脑屏障,并可在细胞因子作用下进入脑缺血区,导致严重的炎症反应,从而加重脑组织损伤^[25]。RELA是NF- κ B通路的主要功能亚基,其翻译后修饰能够有效调控NF- κ B的转录激活,进而在炎症反应及相关疾病的发生和发展中发挥重要作用,局灶性脑缺血可导致RELA的表达下调^[26]。PTGS2又称环氧合酶-2(COX-2),作为重要炎性介质存在于炎症初期到炎症形成的全过程,PTGS2过表达可破坏内环境平衡,参与脑损伤后的炎症反应,并促进脑梗死面积的扩大^[27]。PIK3CG是肌醇磷脂的磷酸化产物,该基因编码的蛋白是PI3K的I类催化亚单位PI3K γ ,研究证明在脑损伤后PI3K γ 的表达增加,抑制PIK3CG的活性有利于减少PI3K γ 在脑缺血损伤组织中的表达^[28]。

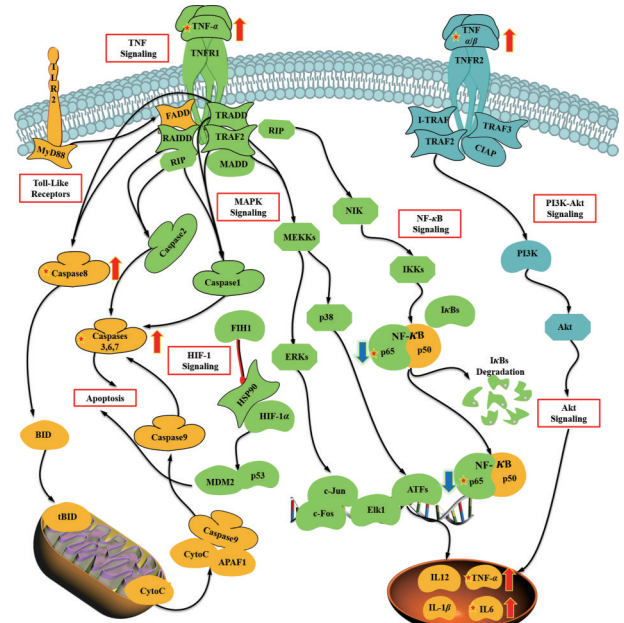
脑缺血可造成血脑屏障通透性增加,从而形成脑水肿。MMP是破坏基底膜的一种重要蛋白水解酶,其中MMP2可通过破坏血脑屏障^[29]、改变血管通透性^[30]参与脑水肿形成。IL-2是具有淋巴因子样免疫调节作用的细胞因子,有研究发现急性脑卒中时,大脑局部缺氧、缺血导致脑内的IL-2合成减少^[31]。此外,神经细胞凋亡是脑缺血疾病造成神经

系统损伤的重要机制。其中 Caspase 家族(天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶)是脑缺血损伤中研究较多的凋亡相关蛋白之一, CASP8 是关键的启动型 Caspase, 活化后能够引发蛋白酶解级联反应, 从而水解激活下游的同源酶^[32]。CASP3 是细胞凋亡过程的主要效应因子, 其活化可以进一步激活下游信号通路引起细胞凋亡^[33]。总体而言, 本文筛选得到的核心靶点和文献报道的脑缺血重要靶标较为一致。

本研究发现栀子有效成分可与 TNF, CASP3, CASP8, RELA, IL-2, MMP2 等多个靶点形成相互作用, 为了验证网络药理学结果的可靠性, 采用分子对接技术考察了核心成分和关键靶点的结合活性, 选择了 degree>5 和 OB 较高的 6 个成分进行分子对接。结果表明栀子苷, 西红花苷 I, (-)-隐绿原酸, 藏红花苦素与脑缺血疾病的关键靶点对接分数较高, 表明这些成分具有较好的结合活性。栀子苷可下调 TNF- α 表达, 减少缺血区的炎细胞浸润, 减缓血脑屏障的破坏, 从而缓解缺血区损伤^[34-35]。西红花苷可以减少脑缺血再灌注损伤小鼠脑微血管中磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2) 的磷酸化, 同时下调 MMP9 的表达, 保护短暂性缺血大脑免受过氧化应激^[36]。该结果可为阐明栀子主要活性成分预防或治疗脑缺血的作用靶点提供依据。

3.3 栀子治疗脑缺血的分子机制 缺血性脑损伤是由多种分子机制参与的复杂病理、生理过程, 目前公认的发病机制主要包括炎症反应、氧化应激、兴奋性氨基酸毒性、细胞凋亡等, 其中免疫性炎症是脑缺血损伤的重要病理进程, 因此, 抗脑缺血的炎症反应是防治脑缺血的关键^[37]。为了进一步说明上述关键作用靶点在信号通路中的作用, 对其进行了 KEGG 通路富集分析, 结果发现栀子可能通过调控 TNF 信号通路, PI3K/Akt 信号通路, Toll 样受体信号通路, MAPK 信号通路和 HIF-1 信号通路等发挥抗脑缺血损伤的作用。其中 TNF- α , IL-6, PTGS2, RELA, IL-1 β 均为重要的促炎症细胞因子, CASP8 和 CASP3 为介导凋亡的效应因子, PIK3CG 为 PI3K/Akt 信号通路的关键靶点, 介导的信号通路与脑卒中后的炎症反应和细胞凋亡密切相关。炎症反应在脑缺血的发生、发展及后期恢复中均扮演重要的角色, 参与脑缺血病理损伤的全过程, 这些关键蛋白也均显著富集在 TNF 信号通路, PI3K/Akt 信号通路等 5 条信号通路上, 充分表明栀子通过多靶点、多通路发挥预防或治疗脑缺血作用。具体作

用机制示意图见图 2。



红色星号标记表示栀子干预的关键靶点; 红色箭头表示蛋白表达上调, 蓝色箭头表示蛋白表达下调

图 2 脑缺血的关键通路分析

Fig. 2 Key pathways of cerebral ischemia

由图 2 可知, TNF 通路通过 2 个不同的跨膜受体即 TNF 受体 1 (TNFR1) 和 TNFR2 完成的。TNFR1 被激活后, 可激活炎症反应信号转导和细胞凋亡信号转导。当 TNFR1 招募 CASP8 形成复合物, 可介导细胞的凋亡。当 TNFR1 激活 NF- κ B 时, 可通过 NF- κ B 通路介导炎症反应的发生, 其次还可通过 MAPK 通路作用于 ERK 和 p38 影响激活蛋白-1(AP-1) 转录因子的活性, 从而调节相关炎症因子 TNF- α , IL-6, IL-12, IL-1 β 的表达^[38]。TNFR2 被激活后, 可以促进细胞内 Akt 的表达, 通过 PI3K/Akt 信号通路发挥抗炎与神经保护作用^[39]。Toll 样受体 2 是 Toll 样受体信号通路的关键受体, 其通过影响髓样分化因子 88 结构域蛋白 (MyD88DD) 与 Fas 相关死亡结构域蛋白 (FADD) 的表达而导致细胞凋亡^[40]。HIF-1 α 可通过与 p53 结合诱导细胞凋亡, 诱导 HIF-1 信号通路激活凋亡信号^[41], 在缺血、缺氧损伤的病理过程中发挥重要作用。

基于“活性成分-靶点-通路”网络, 发现栀子苷, 西红花苷 I, (-)-隐绿原酸和藏红花苦素等可能通过 RELA, CASP8, CASP3, IL-2, PTGS2, PIK3CG 等关键靶点发挥抗脑缺血损伤的作用。研究表明栀子苷可抑制脑缺血模型大鼠炎症反应上游信号通路, 保护大脑免受继发性损伤; 还可减少局灶性

脑缺血模型大鼠海马CA1区HIF-1 α 表达、抑制缺氧/复氧SHY-5Y细胞蛋白MyD88, NF- κ B, ERK1/2, 抑制蛋白 κ B(I κ B)活化, 抑制Toll样受体4通路, 削弱炎症反应, 共同作用抑制细胞凋亡, 促进脑缺血损伤恢复^[42]。西红花苷可降低脑组织中的炎症因子IL-1, IL-6和TNF- α 的表达, 参与卒中后抗炎作用^[43]。

综上所述, 本研究在分析栀子主要化学成分的基础上, 结合网络药理学和分子对接技术, 对栀子多成分、多靶点、多途径的复杂网络关系进行研究, 发现栀子苷, 西红花苷I, (-)-隐绿原酸、藏红花苦素等活性成分可通过下调TNF, CASP8, CASP3, MMP2蛋白的表达, 上调RELA, IL-2蛋白的表达, 激活TNF, PI3K/Akt, MAPK, HIF-1, Toll样受体等关键信号通路, 通过抗炎、抑制细胞凋亡等过程协同治疗脑缺血。基于网络药理学与分子对接技术预测结果与已有文献结果较为接近, 表明该方法具有一定的科学性, 同时与中药整体观、系统性的理念比较吻合, 可为深入阐释栀子预防或治疗脑缺血的物质基础和作用机制提供依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 王云, 李东影, 林凡凯, 等. 栀子治疗脑缺血的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(24): 226-234.

[2] 李海波, 马金凤, 庞倩倩, 等. 栀子的化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5687-5697.

[3] 汤丹, 曹东敏, 黄广泉, 等. HPLC-DAD-Q-Exactive 静电场轨道阱高分辨质谱快速分析栀子中主要成分[J]. 广东化工, 2019, 46(13): 15-16.

[4] 叶日贵, 白梅荣, 包明兰, 等. 栀子化学成分的LC-MSD Trap与UV分析[J]. 中成药, 2015, 37(7): 1503-1507.

[5] KESHAHA-PRASAD T S, GOEL R, KANDASAMY K, et al. Human protein reference database-2009 update[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(1): 767-772.

[6] ZHOU J, ZHANG Y J, LI N, et al. A systematic metabolic pathway identification of common *Gardenia* fruit (*Gardeniae Fructus*) in mouse bile, plasma, urine and feces by HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. J Chromatogr B, 2020, 1145: 122100.

[7] 雷磊, 王玉, 霍志鹏, 等. LCMS-IT-TOF分析栀子炒焦前后化学成分的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 88-97.

[8] 李玲云, 王云, 刘梦娇, 等. 栀子金花丸化学成分的上PLC-Q-TOF-MS/MS快速鉴定与分析[J]. 中国实

验方剂学杂志, 2017, 23(14): 1-11.

[9] 陈岑. 二维液相色谱-质谱联用技术在栀子豉汤成分分析中的应用研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2014.

[10] 何理想, 王允吉, 张倩倩, 等. UPLC Q-Exactive Orbitrap MS分析栀子水提液中的化学成分[J]. 广州化工, 2020, 48(5): 94-97.

[11] 高凤阳. 基于液质联用技术的清开灵注射液中栀子和金银花色素成分的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2012.

[12] 王晓燕, 张丽, 王添琦, 等. 栀子化学成分的上HPLC-Q-TOFMS分析[J]. 中药材, 2013, 36(3): 407-410.

[13] 姚蓝. 基于栀子炒炭存性的物质基础内涵研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2014.

[14] XIAO W P, LI S M, WANG S Y, et al. Chemistry and bioactivity of *Gardenia jasminoides* [J]. J Food Drug Anal, 2017, 25(1): 43-61.

[15] 孟祥乐, 李红伟, 李颜, 等. 栀子化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(11): 959-967.

[16] 杨利, 黄燕, 蔡业峰, 等. 1418例中风患者痰瘀证候分布和演变规律探析[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 13(6): 459-460.

[17] 卓毓春. 痰淤热论治中风——附37例临床分析[J]. 贵阳中医学院学报, 1992, 14(3): 25-26.

[18] 李澎涛, 王永炎, 黄启福. “毒损脑络”病机假说的形成及其理论与实践意义[J]. 北京中医药大学学报, 2001, 24(1): 1-6, 16.

[19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

[20] 朱晓磊, 张娜, 李澎涛, 等. 栀子苷抑制脑缺血损伤级联反应的作用环节探讨[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11): 43-46.

[21] 蓝毓营, 韦必清. 中风毒邪论与神经保护治疗的研究[J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 6(2): 90-92.

[22] 严华, 杨洪军, 黄璐琦, 等. 清开灵治疗脑血管疾病实验研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(4): 89-90.

[23] 杨军宣, 张海燕, 赵成城, 等. 栀子环烯醚萜苷治疗脑缺血损伤的作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 277-280.

[24] 陈卓. 中药栀子主要药效物质基础及质量评价模式探究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.

[25] 张予阳, 刘岩, 付守廷. 脑缺血与炎症反应[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(1): 5-9.

[26] 陈卫银, 孙承铭, 王会民, 等. 丹参酮II_A预处理对局灶性脑缺血模型大鼠IL-1 β , RelA mRNA表达的影响[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(9): 2115-2118.

[27] CHEN C. COX-2's new role in inflammation [J]. Nat

- Chem Biol, 2010, 6(6):401-402.
- [28] EDUARDO C J, ARMANDO G F, MICHEL G C, et al. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat [J]. Brain Res, 2004, 1007 (1): 98-108.
- [29] 王丽娜,王光,郭晓冲,等. 电针结合康复训练对缺血性脑卒中大鼠 VEGF 与 MMP2 表达的影响[J]. 解剖科学进展, 2018, 24(3):265-267, 271.
- [30] 余锋,胡向阳,任明山,等. 大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤时 MMP-2、MMP-9 的表达及其意义[J]. 立体定向和功能神经外科杂志, 2005, 18(4):221-224.
- [31] 朱华,陶武贤,熊晓星. 白细胞介素在缺血性脑卒中中的抗炎作用及其机制[J]. 医学综述, 2020, 26(20):3976-3980, 3986.
- [32] 毛德文,陈月桥,王丽,等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡[J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(3): 148-150.
- [33] 涂娟娟,叶明阳,焦蓉. 针刺和神经生长因子治疗对脑性瘫痪幼鼠智力及 Casp3、BAX、BCL-2 mRNA 的影响[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(2):42-45.
- [34] 刘振权,张文生,王树强,等. 栀子苷抗大鼠脑缺血再灌注损伤炎症机制研究[C]//中国自然资源学会. 海峡两岸暨 CSNR 全国第七届天然药物资源学术研讨会论文集: 2006 年卷. 武汉: 出版社不祥, 2006: 343-346.
- [35] 张占军,汪丽娅,王忠,等. 黄芩苷、栀子苷及其配伍治疗局灶性脑缺血大鼠药效评价及作用机制研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11):907-910.
- [36] ZHENG Y Q, LIU J X, WANG J N, et al. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia[J]. Brain Res, 2007, 1138:86-94.
- [37] 张迪,任长虹,吉训明,等. 脑缺血-再灌注损伤后的炎症反应过程及机制的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2013, 10(7):383-387.
- [38] 周林,杨慧,艾有生,等. 中药单体抗 TNF- α 介导的炎症反应机制研究进展[J]. 南昌大学学报:医学版, 2013, 53(3):72-75, 78.
- [39] 嵇莹莹,龚国清. PI3K/Akt/mTOR 通路在炎症相关疾病中分子机制研究进展[J]. 药学研究, 2018, 37(4): 226-229.
- [40] 张素君,高保嘉,魏至瑶,等. Toll 样受体与脑缺血[J]. 沈阳医学院学报, 2016, 18(4):305-308.
- [41] 何芳. 基于胶质细胞 HIF-1 α 通路调控细胞凋亡研究清脑滴丸对急性脑缺血再灌注损伤的作用机制[D]. 北京:北京中医药大学, 2017.
- [42] 张会玲,李世英,李峥,等. 缺血预适应对局灶性脑缺血再灌注大鼠海马 CA1 区低氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子表达的影响[J]. 天津医药, 2015, 43(11):1284-1288.
- [43] 陈欣宇,宋本华,于洪,等. 西红花苷在脑卒中后抑郁大鼠中抗炎作用的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017, 51(3):223-227.

[责任编辑 刘德文]