



三色片醇提取物抗补体活性物质的UPLC-Q-TOF-MS/MS研究

秦艳, 陶佳佳, 沈贇, 陈喆, 叶岩荣

Study on components with anti-complement activity from ethanol extract of Sanse tablets by UPLC-Q-TOF-MS/MS

QIN Yan, TAO Jiajia, SHEN Yun, CHEN Zhe, YE Yanrong

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202101036>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于UPLC-Q-TOF-MS技术鉴定防风在大鼠体内的入血成分及代谢产物

Identification of components and metabolites of *Saposhnikovia Radix* decoction in rats' plasma by UPLC-Q-TOF-MS
药学实践杂志. 2019, 37(6): 512-517 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.06.008

基于UPLC-Q-TOF/MS平台的结晶肾损伤小鼠的尿液代谢组学研究

Urinary metabolomics study on mice renal injury caused by calcium oxalate crystal based on UPLC-Q-TOF/MS platform
药学实践杂志. 2019, 37(2): 126-134 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.02.006

基于UHPLC-Q-TOF/MS技术对扶正化瘀胶囊入血成分的快速鉴别

Rapid identification of chemical constituents in serum and plasma of Fuzheng Huayu capsules by UHPLC-Q-TOF/MS
药学实践杂志. 2020, 38(3): 250-254, 267 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.201906027

高效液相-高分辨飞行时间质谱对复方夏枯草消瘤方化学成分的鉴别

Identification of chemical constituents of Xiakucao Xiaoliu mixture by HPLC-Q-TOF/MS
药学实践杂志. 2020, 38(2): 138-142, 155 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201907116

红色诺卡菌细胞壁骨架中化学成分的鉴别与单糖含量测定

Identification of chemical components and monosaccharide assay in *Nocardia rubra* cell wall skeleton
药学实践杂志. 2020, 38(5): 423-430 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003073

联用超高效液相色谱-高分辨飞行时间质谱技术对扶正化瘀胶囊化学成分快速鉴别

Rapid identification of chemical constituents of Fuzheng Huayu capsules by UHPLC-Q-TOF/MS
药学实践杂志. 2019, 37(5): 406-415 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.05.005



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 论著 ·

三色片醇提物抗补体活性物质的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 研究

秦 艳, 陶佳佳, 沈 贇, 陈 喆, 叶岩荣 (复旦大学附属中山医院药剂科, 上海 200032)

[摘要] 目的 分析三色片醇提物抗补体活性部分的化学成分, 为阐明其药效物质基础提供参考依据。方法 通过经典抗补体途径对不同极性部位三色片醇提物进行活性测定, 确定其具有抗补体活性的部位, 采用超高效液相色谱-电喷雾电离-四级杆-飞行时间质谱联用 (UPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS) 法对活性部位进行成分分析。通过与对照品的保留时间, 精确分子量和参考文献中质谱裂解碎片比对, 对其中的化学成分进行鉴定。结果 三色片醇提物的乙酸乙酯部位具有较强的抗补体活性, 应用质谱分析, 鉴定出 42 个化合物, 化合物的类型包括: 生物碱类 16 个, 萜类 15 个, 黄酮 6 个和酚酸类 5 个。结论 通过对三色片中抗补体活性部位化学成分特征的分析, 为阐明其药效物质基础提供一定的科学依据, 有助于院内中药复方制剂的二次开发。

[关键词] 三色片; 抗补体活性; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 化学成分

[中图分类号] R284.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)04-0322-09

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202101036

Study on components with anti-complement activity from ethanol extract of Sanshe tablets by UPLC-Q-TOF-MS/MS

QIN Yan, TAO Jiajia, SHEN Yun, CHEN Zhe, YE Yanrong (Department of Pharmacy, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032)

[Abstract] **Objective** To analyze the chemical components in the ethanol extract of Sanshe tablets with anti-complement activity, and to provide scientific basis for its therapeutic effects. **Methods** The classical anti-complement pathway was used to compare the activity of different portions of Sanshe tablet alcohol extract, and to identify the fraction with anti-complement activity. The chemical composition in active fraction was analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS. The chemical components were identified by comparing the retention time, exact molecular weight and mass spectrum information with the standard chemicals. **Results** The ethyl acetate fraction of the Sanshe tablet ethanol extract had the best anti-complement activity. 42 chemicals were identified, including 16 alkaloids, 15 terpenoids, 6 flavonoids and 5 phenolic acids. **Conclusion** The characterization of the chemical components in the anti-complement active fraction of Sanshe tablets provides a scientific basis for the therapeutic effects of Sanshe tablets, which will help the future development of the compound preparations of Chinese medicine in our hospital.

[Key words] Sanshe tablets; anti-complement activity; UPLC-Q-TOF-MS/MS; chemical components

补体系统是人体重要的免疫防御系统之一, 是由 30 多种广泛存在于血清、组织液和细胞膜表面的蛋白质组成的, 具有精密调控机制的蛋白质反应系统, 其主要通过 3 种途径激活: 经典途径、旁路途径和甘露糖结合凝集素途径。补体系统正常激活, 可在靶细胞上形成膜攻击复合物, 导致靶细胞的溶解, 补体的这一功能在机体的免疫系统中起重要的防御和免疫监视作用, 对抵御外来微生物的入侵和维持机体平衡有重要的作用。然而该系统的过度

激活将释放炎性过敏毒素 C3a 和 C5a, 具有化学诱导作用的 C5a 能趋化嗜中性粒细胞、中核细胞和嗜酸性粒细胞, 这些细胞释放蛋白酶和具有趋化作用细胞因子, 进一步聚集 T、B 淋巴细胞和其他炎性细胞, 从而促进炎症反应的发生, 引起系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、动脉粥样硬化、肾小球肾炎等^[1-2]。近年来已有研究表明^[3], 补体系统的激活是类风湿性关节炎中慢性滑膜炎的发病因素之一。因此, 抑制补体系统的过度激活可能是治疗类风湿性关节炎的重要机制之一。

三色片为复旦大学附属中山医院的院内制剂, 由雷公藤、黄芪和丹参三味药材按 1:1:1 的比例配伍组成, 在临床上用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病和湿疹等结缔组织疾病。我

[基金项目] 复旦大学附属中山医院青年基金项目(2018ZSQN27)

[作者简介] 秦 艳, 主管药师, 研究方向: 中药药效物质基础研究
与医院药学, Email: celeryan@163.com

[通信作者] 叶岩荣, 副主任药师, 研究方向: 医院药学, Email: ye.yanrong@zs-hospital.sh.cn

院临床医生在长期的医疗实践中总结出来的经验方,效果显著^[4]。组方中雷公藤,性味辛寒,有大毒,归肝、肾经,具有清热解毒、活血化瘀、通络止痛、杀虫止痒等功效。现代研究表明,雷公藤内酯醇对大鼠脑皮质内注射 β -淀粉酶后补体C1q和C3的表达有抑制作用,表明雷公藤对补体系统有抑制作用,目前临床上广泛用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、银屑病和湿疹等结缔组织疾病^[5]。组方中的黄芪用于脾肺气血或中气下陷之症、卫气虚所致表虚自汗、气虚血滞导致的肢体麻木、关节痹痛等症,可联合治疗类风湿性关节炎^[6]。黄芪在治疗2型糖尿病大鼠的研究中发现其能降低补体C3的水平,表明其对补体系统具有一定的调节作用^[7-8]。丹参是最常用的活血化瘀中药之一,具有祛瘀止痛,养血安神的功效,现代药理学研究表明其还具有保护肝脏的功能^[9],可拮抗雷公藤的肝毒性。本研究通过经典途径抗补体活性测定方法筛选出三色片醇提物的乙酸乙酯部位抗补体活性最佳,并采用UPLC-Q-TOF-MS法对该部位的化学成分进行结构表征,为三色片抗补体活性药效物质基础及治疗补体过度激活相关疾病提供科学依据。

1 仪器、试剂与材料

Triple TOF5600⁺型四级杆-飞行时间串联质谱仪,配备电喷雾电离源和CDS自动校正系统(美国Applied Biosystems公司);Peak view2.2和Master view1.1数据处理系统(美国Applied Biosystems公司);LC-30A超高效液相色谱仪,包括高压输液泵,自动进样器,柱温箱和在线脱气机(日本岛津公司);KQ5200E型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(色谱纯,美国Sigma-Aldrich公司);蒸馏水(娃哈哈集团);三色片提取物由作者自制,现样品存放于复旦大学附属中山医院药剂科(SSP2018);补体、溶血素(自制);毛蕊异黄酮(批号:ST088101),雷公藤甲素(批号:ST020501),雷公藤内酯酮(批号:ST049901),丹参酮II A(ST014601)、黄芪甲苷(ST001601)(纯度 $\geq 98\%$,均购自上海斯丹德生物技术有限公司)。

2 方法

2.1 三色片醇提物及各极性部位的制备

雷公藤、黄芪和丹参三味药材按1:1:1配伍,其中,黄芪和丹参加6倍量的水浸泡2h后,煎煮2次,第一次1.5h,第二次加水4倍量煎煮1h,煎液滤过,合并滤液并浓缩至相对密度为1.10~1.20

(70℃),加入2倍量的乙醇,静置沉淀24h,取上清液备用。雷公藤分别加4倍量的乙醇加热回流2次,每次1.5h,合并提取液,滤过,加入上述备用液,混匀,回收乙醇至无醇味,浓缩后即得三色片醇提物,经现有的质量标准检验为制备三色片制剂合格的提取物。精密称取三色片醇提物2.0g,置于100ml萃取瓶中,加25ml蒸馏水溶解后,用等量的石油醚、乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,浓缩干燥后,放冷至室温,得到三色片醇提物的石油醚部位0.36g,乙酸乙酯部位0.42g,正丁醇部位0.56g和水溶性部位。

2.2 经典途径的抗补体活性测定

取各极性部位样品2mg溶于DMSO,采用BBS缓冲液稀释成不同浓度的样品,并加入临界浓度的补体(1:80稀释的豚鼠血清),溶血素和2%绵羊红细胞(SRBC)。37℃水浴30min,离心后取上清液在405nm波长下测定吸光度(A)值。同时设置中药对照组(将等量的中药提取物加入BBS缓冲液中,用于测定中药本底A值)、补体组(取临界浓度的补体直接加入适量的BBS缓冲液、溶血素和2%SRBC,用于测定临界浓度补体所造成红细胞溶血的A值)和全溶血组(将2%SRBC加入水中使之全溶血,用于观察补体组是否达到或接近全溶血水平),并以肝素作为阳性对照组,计算溶血抑制率。以供试品浓度为横坐标(X),溶血抑制率为纵坐标(Y),计算 CH_{50} (经典途径50%抑制溶血所需供试品浓度)。溶血抑制率=1-($A_{\text{中药}}-A_{\text{中药对照}}$)/ $A_{\text{全溶血}}$ 。

2.3 不同浓度的样品色谱与质谱条件

2.3.1 色谱条件

色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1mm×100mm,1.7 μ m);流动相0.1%甲酸和水溶液(A)-乙腈(B);梯度洗脱:0~9min,10%~23%B;9~13min,23%B;13~28min,23%~40%B;28~32min,40%~50%B;32~37min,50%~100%B;37~42min,100%B;42~42.1min,10%B;42.1~50min,10%B;流速为0.25ml/min,柱温为35℃;进样量为2 μ l。

2.3.2 质谱条件

在正/负离子模式,离子源选择电喷雾离子化源(ESI);使用 m/z 50~1250扫描范围;碰撞能量35eV,碰撞能量叠加(35 \pm 15)eV;喷雾电压5500V;雾化气温度550℃;去簇电压100V;雾化气和辅助气均为50psi;气帘气25psi;数据采集时间50min;采用母离子触发的子离子(TOF-MS-IDA-MS/MS)扫描方式;多重质量亏损和动态背景扣除为触发二级的条件,满足该条件进行二级扫描。

2.4 对照品溶液的制备

精密称取毛蕊异黄酮、雷公藤甲素、雷公藤内

酯酮、丹参酮Ⅱ A 和黄芪甲苷对照品 1.0 mg, 加甲醇 2 ml, 溶解, 摇匀, 即得各对照品溶液。

2.5 供试品溶液的制备

取三色片醇提物的乙酸乙酯部位样品 0.2 g, 置于 10 ml 量瓶中, 加入 70% 甲醇 5 ml, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz) 30 min, 放冷至室温, 70% 甲醇定容至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得供试品溶液。

2.6 三色片中化学成分数据库的建立

根据三色片中各药材化学成分研究文献, 收集 3 种药材所含化合物成分的基本信息, 包括化合物名称、分子式、精确分子量、准分子离子峰和碎片离子峰。通过精确分子量匹配, 对照品的保留时间, 二级谱所得到的离子碎片与文献报道进行比对, 最终确定化合物的结构。

3 结果与分析

3.1 三色片醇提物各极性部位的抗补体活性

分别对三色片醇提物的石油醚部位、乙酸乙酯

部位和正丁醇部位进行经典途径的抗补体活性测定, 以肝素为对照品, 结果发现乙酸乙酯部位的抗补体活性最好, 其抗补体活性略低于肝素钠, 其次是正丁醇部位, 结果见表 1。

表 1 三色片提取物不同部位抗补体活性测定

编号	研究对象	抗补体活性(CH ₅₀ , μg/ml)
1	肝素	14.4±1.2
2	三色片-石油醚部位	-
3	三色片-乙酸乙酯部位	233.9±10.1
4	三色片-正丁醇部位	344.0±14.5

注: “-”表示该部位无抗补体活性。

3.2 三色片醇提物乙酸乙酯部位的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

精密吸取对照品溶液和供试品溶液 2 μl, 采用“2.1”项下的色谱与质谱条件对样品进行分析, 通过正、负离子全扫描, 获得正、负离子模式下的总离子流图, 见图 1。

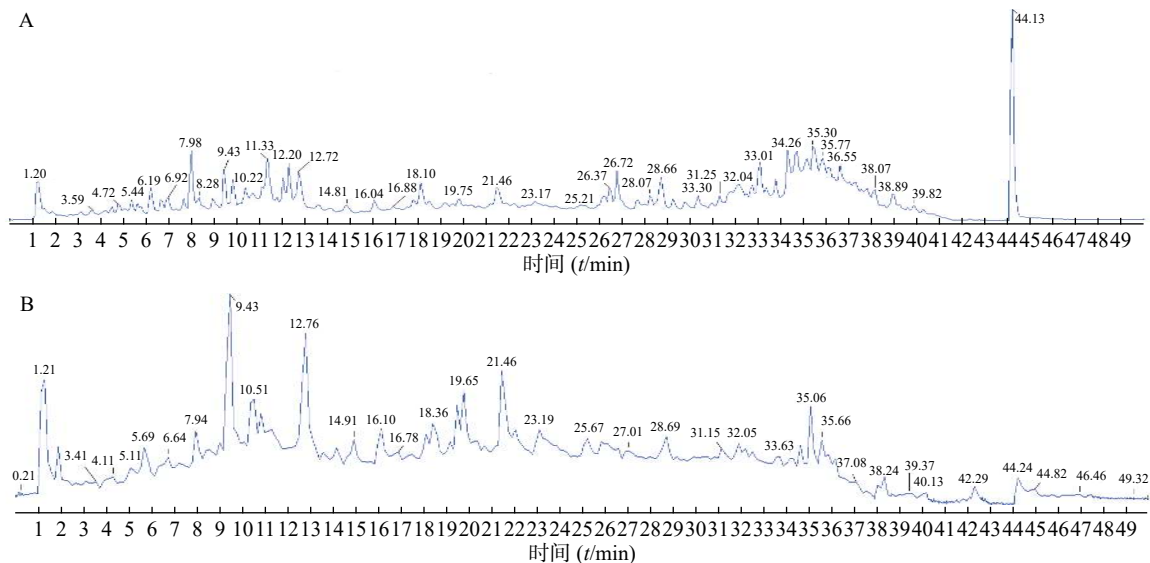


图 1 三色片提取物 UPLC-Q-TOF-MS 正和负离子模式下的总离子流图

A. 正离子模式; B. 负离子模式。

通过与对照品比对, 分子离子峰质谱数据解析, 与参考文献比对, 共鉴定出三色片醇提物乙酸乙酯部位 42 个化合物, 结果见表 2。

3.2.1 黄酮类化合物结构解析

在乙酸乙酯部位中共鉴定出 6 个黄酮类化合物, 其中 4 个黄酮苷元和 2 个黄酮苷, 苷元为黄酮、异黄酮和紫檀烷, 该类化合物在正离子模式下具有较好的响应。二级质谱中黄酮苷元易发生中性丢失, 形成 $[M+H-H_2O]^+$ 、 $[M+H-CO]^+$ 、 $[M+H-CH_3]^+$ 等碎片离子, 如在化合物 8 的二级质谱中可见 m/z

270.053 4 和 m/z 253.050 3, 则为 m/z 285.077 4 分别脱去 $-CH_3$ 和 CH_3OH 形成的 $[M+H-CH_3]^+$ 和 $[M+H-CH_3OH]^+$ 碎片离子峰, m/z 225.055 3 是 m/z 253.050 3 脱去 1 分子的 CO 形成的碎片离子峰, 通过对照品的保留时间和参考文献^[12] 质谱数据比对确定化合物 8 为毛蕊异黄酮, m/z 137.023 5 的碎片离子峰为异黄酮母核 C 环发生 RDA 裂解所产生。黄酮苷类易脱去糖基形成较强的分子离子峰, 如化合物 3 (m/z 447.130 4) 的二级质谱脱去糖基形成 m/z 285.077 5 的分子离子峰, 并与化合物 8 (m/z

表2 三色片提取物中各成分主要碎片离子及谱峰归属

化合物编号	t_R /min	分子式	理论值 (m/z)	模式	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物名称	参考文献
1	3.54	C ₇ H ₆ O ₃	139.039 0	[M+H] ⁺	139.039 4	3.0	121.028 7	原儿茶醛	[10]
2	4.76	C ₂₁ H ₂₇ N ₃ O ₃	370.212 5	[M+H] ⁺	370.214 3	4.8	249.124 6,160.112 6,95.013 3,166.086 6,100.076 2,91.054 8	南蛇藤糠酰胺碱	[11]
3	6.63	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	447.128 6	[M+H] ⁺	447.130 4	4.2	285.077 5,270.053 5,253.050 8,225.055 6,137.023 5	毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷	[12]
4	7.04	C ₂₃ H ₂₉ N ₃ O ₂	380.233 3	[M+H] ⁺	380.235 1	4.8	176.106 9,160.112 6,105.033 8,100.076 5	苯代南蛇碱	[11]
5	9.41	C ₉ H ₁₀ O ₅	197.045 6	[M-H] ⁻	197.044 7	-4.2	179.038 3,135.044 3	丹参素	[10]
6	9.42	C ₉ H ₈ O ₄	179.035 0	[M-H] ⁻	179.034 2	4.7	135.044 8	咖啡酸	[13]
7	11.16	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	431.133 7	[M+H] ⁺	431.136 3	6.1	269.082 6,253.050 3,225.055 5,213.091 7,197.060 2,136.014 6,118.041 7	芒柄花苷	[12]
8	12.71	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.075 8	[M+H] ⁺	285.077 4	5.7	270.053 4,253.050 3,225.055 3,137.023 5	毛蕊异黄酮*	[12]
9	12.76	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	301.107 1	[M+H] ⁺	301.109 0	6.4	167.070 8,152.047 3,147.043 2,105.034 0,123.043 3	astrapterocarpan	[12]
10	13.06	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	361.164 6	[M+H] ⁺	361.166 5	5.5	269.154 3,227.108 3,185.096 9,157.101 7,129.070 3,91.054 9	雷公藤甲素*	[14-15]
11	13.92	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	315.086 3	[M+H] ⁺	315.088 1	5.6	300.064 7,243.065 5,167.034 2	熊竹素	[16]
12	18.21	C ₁₈ H ₁₂ O ₇	341.065 6	[M+H] ⁺	341.066 9	3.9	295.060 7,277.050 9,249.056 0	丹酚酸G	[17]
13	19.76	C ₂₆ H ₂₀ O ₁₀	491.098 4	[M-H] ⁻	491.097 0	-2.9	311.054 9,293.044 6,267.064 6,135.044 7	丹酚酸C	[18]
14	21.46	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	269.080 8	[M+H] ⁺	269.082 7	4.1	253.015 3,237.052 6,225.055 5,213.092 3,136.015 9,118.041 7,197.060 2	芒柄花素	[12]
15	22.57	C ₃₆ H ₄₅ NO ₁₇	764.276 0	[M+H] ⁺	764.278 3	2.9	746.276 1,686.246 3,644.235 1,206.081 7,188.070 9,178.086 5	aquifoliunine E-III	[14]
16	23.45	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	359.148 9	[M+H] ⁺	359.150 7	4.9	267.138 0, 225.019 5, 183.079 9,128.061 8,91.054 3	雷公藤内酯酮*	[19]
17	24.01	C ₃₈ H ₄₇ NO ₁₉	822.281 5	[M+H] ⁺	822.284 1	3.2	804.275 8,204.066 2,176.071 4	alatusinnine	[20]
18	25.01	C ₃₉ H ₄₅ NO ₁₉	832.265 9	[M+H] ⁺	832.269 0	3.8	804.273 3,194.081 9,176.071 2	hypoglaunine E	[11]
19	26.14	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄	829.458 0	[M+COOH] ⁻	829.460 7	3.3	783.457 9,621.404 3,489.357 2	黄芪甲苷*	[14]
20	28.19	C ₃₈ H ₄₇ NO ₁₈	806.286 6	[M+H] ⁺	806.290 3	3.8	788.279 5,686.247 0,206.082 1, 178.086 5	雷公藤定宁 E	[20]
21	28.65	C ₃₉ H ₄₅ NO ₁₈	816.271 0	[M+H] ⁺	816.273 9	3.6	798.261 9,756.250 9,206.081 3,178.086 1,160.075 2	1-去乙酰基雷公藤吉碱	[11]
22	28.70	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	871.468 6	[M+COOH] ⁻	871.470 8	2.5	825.470 2,765.448 2,489.356 8	黄芪皂苷 II	[13]
23	29.09	C ₄₁ H ₄₇ NO ₂₀	874.276 4	[M+H] ⁺	874.278 5	2.3	856.269 2,846.282 9,828.272 3,674.245 1,204.065 6,176.070 7	雷公藤春碱	[11]
24	29.72	C ₃₈ H ₄₇ NO ₁₈	806.286 6	[M+H] ⁺	806.291 2	3.8	788.280 4,686.247 4,206.082 4	peritassine A	[20]
25	30.24	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	871.468 6	[M+COOH] ⁻	871.470 3	2.5	825.464 1,765.440 5	异黄芪皂苷 II (异构体1)	[16]
26	30.89	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	309.112 1	[M+H] ⁺	309.114 2	6.7	281.667 0,263.106 0,235.076 7	丹参醛	[21]
27	31.58	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₅	871.468 6	[M+COOH] ⁻	871.470 8	2.5	825.470 2,765.448 0	异黄芪皂苷 II (异构体2)	[13]
28	32.12	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	337.143 4	[M+H] ⁺	337.142 5	-2.7	309.686 6	丹参新醌丁	[10]
29	32.16	C ₄₃ H ₄₉ NO ₁₉	884.297 2	[M+H] ⁺	884.299 7	2.8	856.304 5,674.246 0,204.663 0,176.071 2	雷公藤定碱	[14]
30	32.96	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	913.479 1	[M+COOH] ⁻	913.482 4	3.5	867.481 7,825.469 8,807.464 3,765.450 6	黄芪皂苷 I	[16]
31	32.99	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₉	858.281 5	[M+H] ⁺	858.285 4	4.6	840.275 7,798.263 8,746.269 1,738.243 5,686.248 0,206.082 5,178.087 1	雷公藤晋碱	[20]
32	33.04	C ₃₈ H ₄₇ NO ₁₈	806.286 6	[M+H] ⁺	806.289 7	3.8	788.278 3,686.244 4,206.082 1,728.257 0	卫矛碱	[20]
33	33.70	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₆	913.479 1	[M+COOH] ⁻	913.484 7	3.8	867.478 5,825.283 5,807.458 4,765.432 6	异黄芪皂苷 I (异构体1)	[16]

(续表 2)

化合物编号	t_R/min	分子式	理论值 (m/z)	模式	实测值 (m/z)	误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	化合物名称	参考文献
34	34.60	$C_{45}H_{72}O_{16}$	913.479 1	$[M+COOH]^-$	913.483 3	3.8	867.477 8, 825.282 1, 807.456 4, 765.443 2	异黄芪皂苷 I (异构体2)	[16]
35	34.92	$C_{46}H_{49}NO_{22}$	968.281 9	$[M+H]^+$	968.286 3	4.5	856.677 0, 838.257 4, 684.228 8, 204.065 6, 178.070 8	雷公藤素B	[20]
36	35.01	$C_{43}H_{49}NO_{18}$	868.302 2	$[M+H]^+$	868.304 6	2.7	868.364 0, 850.295 8, 746.268 9, 686.247 6, 206.082 4, 178.087 1	雷公藤次碱	[20]
37	35.02	$C_{41}H_{47}NO_{17}$	826.291 7	$[M+H]^+$	826.295 1	4.2	808.285 3, 748.264 0, 206.082 2, 178.086 8	tripterygiumine I	[20]
38	35.49	$C_{19}H_{20}O_3$	297.148 5	$[M+H]^+$	297.145 0	4.8	251.144 0, 279.139 3, 254.054 9, 268.110 5, 282.126 3	隐丹参酮	[10,17]
39	35.70	$C_{20}H_{28}O_2$	299.201 7	$[M-H]^-$	299.199 6	-6.7	283.168 2, 213.090 8, 201.916 0,	雷酚萜	[22]
40	35.86	$C_{48}H_{51}NO_{18}$	930.317 9	$[M+H]^+$	930.321 3	3.7	912.308 7, 310.111 0, 206.081 8, 188.071 2, 178.086 5, 105.033 6	ebenifoline E- II	[20]
41	36.81	$C_{19}H_{18}O_3$	295.132 9	$[M+H]^+$	295.134 9	4.0	277.124 3, 249.127 5, 266.095 3, 262.097 7, 280.109 9	丹参酮 II A*	[10,18,23]
42	37.49	$C_{19}H_{22}O_2$	283.169 3	$[M+H]^+$	283.169 3	0	265.098 1, 240.032 2, 223.106 7, 195.095 8, 181.101 1	丹参新酮	[17,21,24]

注: *表示与对照品鉴定的化合物。

285.077 4)的二级质谱图非常相似,说明化合物 3 和化合物 8 在结构上是相似的,但化合物 3 的分子量多了 162($C_6H_{10}O_5$),通过数据库比对和参考文献^[12]推测化合物 3 则为毛蕊异黄酮-7-O- β -D-葡萄糖苷。化合物 9(m/z 301.109 0)通过数据库比对发现两种候选化合物分别为 astrapterocarpan 和 astraisoflavan,二级质谱中主要碎片离子峰为 C 环裂解产生的含 A 环和 B 环片段的碎片离子,其中, m/z 167.070 8 为含 B 环的碎片离子峰且为基峰,进一步脱甲基形成 m/z 152.047 3, m/z 123.043 3 为含 A 环的碎片离子峰,进一步脱水形成 m/z 105.034 0, m/z 147.043 2 为母离子 m/z 301.109 0 脱去 B 环形成的碎片离子峰,根据 m/z 167.070 8 的碎片离子峰为基峰和含有 m/z 147.043 2 的碎片离子峰这两个特征,结合参考文献^[12]的质谱数据,推测该化合物为 astrapterocarpan,其相关裂解途径见图 2。

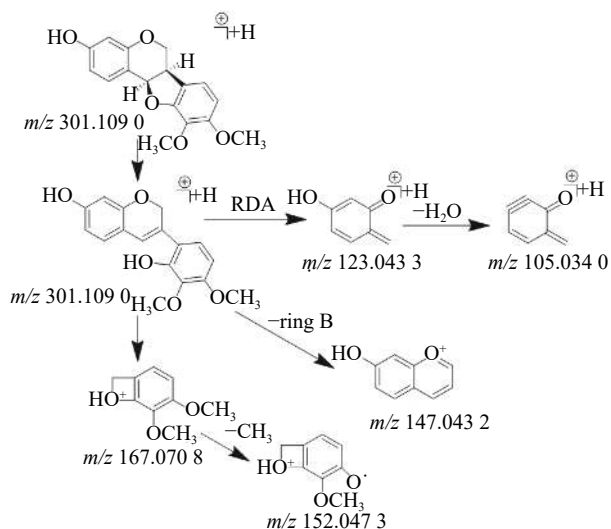


图 2 化合物 astrapterocarpan 的质谱裂解规律

3.2.2 三萜皂苷类化合物结构解析

在乙酸乙酯部位中鉴定出 7 个三萜皂苷类化合物,在负离子模式下均具有较好的响应,一级质谱中产生 $[M+COOH]^-$ 的准分子离子峰,二级质谱中产生较强的 $[M-H]^-$ 碎片离子峰和脱去糖基的较弱的分子离子峰。化合物 19 在负离子模式下产生的准分子离子峰为 $[M+COOH]^-$ (m/z 829.458 0),二级质谱中产生 m/z 783.457 9 $[M-H]^-$ 峰,脱去 1 分子六碳糖 ($C_6H_{10}O_6$) 形成 m/z 621.404 3 的碎片离子峰, m/z 489.357 2 则为 m/z 621.404 3 进一步脱去 1 分子五碳糖 ($C_5H_8O_5$) 后形成的苷元碎片离子峰,推测其苷元为 9,19-环阿尔廷烷,通过对照品的保留时间,参考文献^[13]的离子碎片比对确定该化合物为黄芪甲苷。

3.2.3 生物碱类化合物结构解析

三色片提取物中共鉴定出 16 个生物碱类化合物,均来自雷公藤药材,在正离子模式下具有较好的响应,一级质谱中产生 $[M+H]^+$ 的准分子离子峰,二级质谱发现该类型的化合物容易脱去 H_2O 、 CO 和 CH_3COOH 等中性小分子而产生碎片离子峰,多数生物碱含有吡啶二羧酸部位的碎片离子峰。如化合物 23 在正离子模式下产生 m/z 874.278 5 的准分子离子峰,二级质谱中产生脱去 1 分子 CO 的 m/z 846.282 9 的基峰,脱去 1 分子 H_2O 的 m/z 856.269 2 的碎片离子峰和脱去 1 分子 $HCOOH$ 的 m/z 828.272 3 的碎片离子峰, m/z 674.245 1 峰为 m/z 846.282 9 脱去 $C_5H_4O_3$ 侧链和 CH_3COOH 形成的碎片离子峰, m/z 204.065 6 峰为大环开裂产生的吡啶二羧酸部分脱水产生的碎片离子,该离子进一步脱羧形成 m/z 176.070 7 的碎片离子,通过数

数据库和参考文献^[11]质谱数据的比对,推测化合物**23**为雷公藤春碱。化合物**31**在正离子模式下产生 m/z 858.285 4的准分子离子峰,二级质谱中产生脱去1分子 H_2O 的 m/z 840.275 7的碎片离子峰,准分子离子峰脱去1分子 CH_3COOH 形成较强的 m/z 798.263 8峰,在进一步脱去1分子 CH_3COOH 形成 738.243 5峰,准分子离子峰 m/z 858.285 4脱去 $FuOH(C_5H_4O_3)$ 侧链形成的 m/z 746.269 1的碎片离子峰,再进一步脱去1分子 CH_3COOH ,形成 m/z 686.248 0的碎片离子, m/z 206.082 5峰为大环开裂产生的吡啶二羧酸部分脱水产生的碎片离子,该离子进一步脱羧形成 m/z 178.087 1的碎片离子,通过数据库和参考文献^[20]质谱数据的比对,推测化合物**31**为雷公藤晋碱。雷公藤晋碱中吡啶二羧酸部分较雷公藤春碱中少一个羟基,故其易产生 m/z 206.0825的碎片离子峰,并通过脱羧产生 m/z 178.087 1峰。两种化合物的质谱图见图3。以雷公藤晋碱为例,解析此类化合物的裂解规律,见图4。因此得出吡啶二羧酸部分含有羟基的生物碱会产生 m/z 204系列的特征碎片离子峰,不含羟基的生物碱则产生 m/z 206系列的特征碎片离子峰。

3.2.4 萜类化合物结构解析

本研究共鉴定出8种萜类化合物,其中源于丹参药材中的5种萜类成分,丹参中的萜类化合物因其结构中主要含有羟基,羰基等取代基,所以质谱碰撞中主要丢失 H_2O , CO 和 $-CH_3$ 等中性分子,产

生一系列的碎片离子峰。化合物**41**在正离子模式下产生 m/z 295.134 9的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰,二级质谱中产生脱去1分子甲基形成的 m/z 280.109 9的碎片离子峰,在此基础上有丢失1分子水形成 m/z 262.097 7峰,准分子离子峰脱去1分子 H_2O 或脱去1个 $-CHO$ 形成 m/z 277.124 3峰或 m/z 266.095 3峰, m/z 249.127 5峰是 m/z 277.124 3脱去1分子 H_2O 形成的碎片峰,通过对照品的保留时间和参考文献^[10,18,23]数据比对,鉴定该化合物为丹参酮II A,其质谱裂解规律见图5。

来源于雷公藤药材中的3种二萜类成分,该类化合物的二级质谱中出现一系列的脱水、脱 CO 和异丙基等碎片离子峰。化合物**11**在正离子模式下产生 m/z 361.166 5的准分子离子峰,脱去2分子 H_2O 和2分子 CO 形成 m/z 269.154 3的碎片离子峰, m/z 227.108 3为 m/z 269.154 3脱去1分子 CH_2CHCH_3 形成的碎片离子,其进一步脱1分子 H_2O 和 $HCHO$ 形成 m/z 185.096 9的碎片离子,通过对照品比对和参考文献^[14-15]的质谱数据,确定化合物**10**为雷公藤甲素。化合物**18**在正离子模式下产生 m/z 359.148 9的准分子离子峰,脱去2分子 H_2O 和2分子 CO 形成 m/z 267.138 0的碎片离子峰, m/z 225.019 5为 m/z 267.138 0脱去1分子 CH_2CHCH_3 形成的碎片离子,其进一步脱1分子 H_2O 和 $HCHO$ 形成 m/z 183.079 9的碎片离子,通过对照品比对和参考文献^[19]的质谱数据,确定化

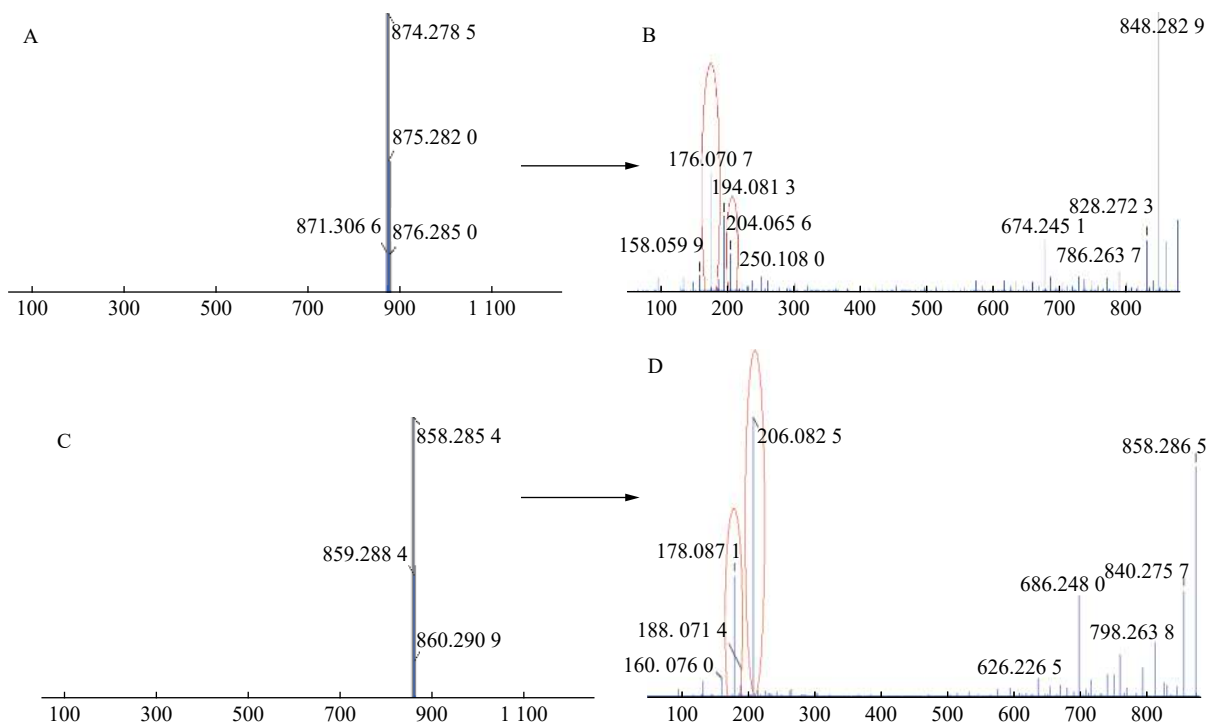


图3 雷公藤春碱和雷公藤晋碱质谱图

A. 雷公藤春碱的一级质谱; B. 雷公藤春碱的二级质谱; C. 雷公藤晋碱的一级质谱; D. 雷公藤晋碱的二级质谱。

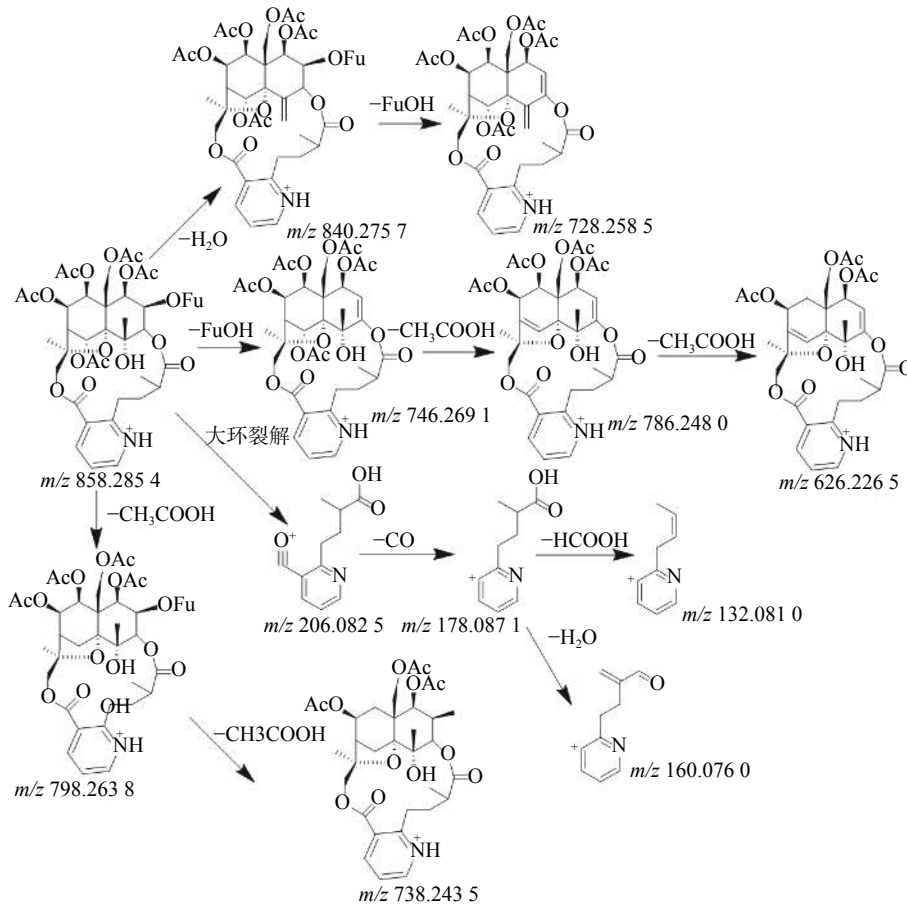


图4 化合物雷公藤晋碱的质谱裂解规律

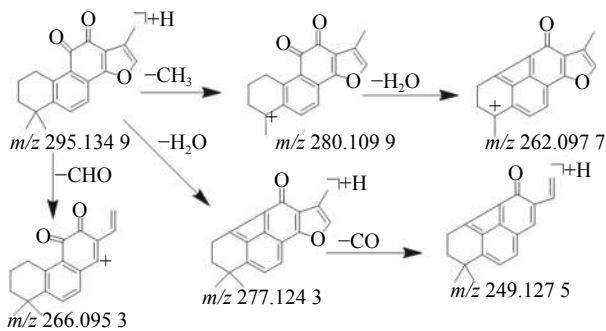


图5 化合物丹参酮 II A 的质谱裂解规律

合物 **16** 为雷公藤内酯酮。化合物 **39** 在负离子模式下产生 m/z 299.199 6 的准分子离子峰, 二级质谱中产生 m/z 283.168 2 的碎片离子, 提示为丢失 1 个 $-CH_3$ 后形成双键产生的碎片离子峰, A 环发生 RDA 裂解产生 m/z 213.090 8 的碎片离子峰, 通过数据库比对和参考文献^[22] 的质谱数据, 推测化合物 **39** 为雷公藤素。

3.2.5 酚酸类化合物结构解析

在正负离子模式下共鉴定出乙酸乙酯部位中 5 种酚酸类成分, 均来自于丹参药材, 参考文献^[18] 报道的丹参中酚酸类成分的裂解规律发现, 酚酸类化合物主要含有羰基、羧基和羟基, 所以在质谱碰撞中易丢失 CO 、 H_2O 和 CO_2 的中性碎片; 丹参素

和咖啡酸作为基本母核而其他的水溶性酚酸类化合物大多数为这两者的聚合或缩合产物, 主要为缩酚酸类的成分, 在质谱碰撞中易丢失 $[M-H-180]$ 和 $[M-H-198]$ 中性碎片; 含有羧基的单体化合物在负离子模式下会产生 $135[C_8H_7O_2]^-$ 和 $179[C_9H_7O_4]^-$ 的特征性碎片。化合物 **5** 中, 在负离子模式下产生 m/z 197.044 7 的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, 二级质谱进一步产生丢失 1 分子 H_2O 和 1 分子 CO_2 , 形成的 m/z 179.038 3 和 m/z 135.044 3 的碎片离子峰, 推测出结构中含有羧基, 结合其精确分子量和参考文献^[10] 质谱数据, 推测该化合物为丹参素。化合物 **12** 中, 负离子模式下产生 m/z 491.097 0 的 $[M-H]^-$ 准分子离子峰, 二级质谱中产生 m/z 311.054 9 和 m/z 293.044 6 的碎片离子峰, 分别为 $[M-H-180]$ 和 $[M-H-198]$, m/z 267.064 6 峰为 m/z 311.054 9 脱去 1 分子 CO_2 所产生, 根据 m/z 135.044 7 峰推测结构中含有羧基, 结合其精确分子量和参考文献^[18] 质谱数据的比较, 推测该化合物为丹酚酸 C。化合物 **1** 中, 正离子模式下给出 m/z 139.039 4 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 脱去 1 分子 H_2O 形成 m/z 121.028 7 的碎片离子峰, 通过数据库比对和参考文献^[10], 推测该化合物 **1** 为原儿茶醛。化合物 **13** 中, 在正离

子模式下产生 m/z 341.066 9 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰, 脱去 1 分子 CO_2 形成 m/z 295.060 7 的碎片离子峰, m/z 277.050 9 和 m/z 249.056 0 的碎片离子峰是 m/z 295.060 7 峰分别脱去 1 分子 H_2O 和 1 分子 CO_2 形成的, 通过数据库比对和参考文献^[17] 质谱数据, 推测该化合物为丹酚酸 G。

4 讨论

4.1 色谱与质谱条件考察

本实验流动相考察了乙腈-水系统和甲醇-水系统, 结果乙腈-水系统中化合物的分离度较好, 加入甲酸可以改善峰形, 有助于化合物的离子化, 提高质谱的响应, 最终选择乙腈-0.1% 甲酸水系统作为本次研究的流动相。

4.2 化学成分的定性分析

据以往文献中三色片各化学成分的研究报道, 收集各药材的主要化学成分的精确分子量, 碎片离子峰等信息, 建立相应的化学成分数据库。通过数据库比对, 对照品保留时间及参考文献中质谱数据鉴定三色片醇提物乙酸乙酯部位的化学成分。本研究共鉴定出 42 个化合物, 其中 5 个是通过对照品鉴定得出, 对无对照品的化合物, 通过质谱的裂解特征及参考文献进行结构表征, 对同分异构体应结合其在液相色谱中化合物的保留时间及质谱行为, 综合对其定性鉴别。

三色片醇提物的乙酸乙酯部位具有较强的抗补体活性, 本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS 法对其中的化学成分进行结构表征, 结果发现该部位主要含有生物碱类, 萜类, 黄酮和酚酸类等化学成分。其中以来源于雷公藤药材中极性中等的生物碱类成分含量较多, 这与三色片提取物的制备工艺有关, 三色片中雷公藤药材采用乙醇加热回流提取的方式, 而黄芪和丹参药材采用水提取醇沉淀的方式。此外, 先前的研究发现广藿香中的黄酮和萜类化合物对旁途径的补体激活具有明显的抑制作用, 紫花地丁中的生物碱类成分对旁途径也有抑制作用($AP_{50}=0.22\sim 0.50$ g/L), 牡丹皮和毛七公的抗补体活性成分研究中发现酚羟基决定抗补体活性的存在与否, 没食子酰基可改善抗补体活性, 甲基则对抗补体活性不利^[25-27]。通过本次研究对三色片醇提物的乙酸乙酯部位的化学成分进行了初步表征, 为阐明三色片的药效物质基础提供参考依据。研究的不足之处在于, 仍有部分化学成分尚未定性鉴定, 含量较高的单体成分未进行体外抗补体活性的测定, 未来将通过中药化学的方法获得含量较高的单体成分, 并进行结构鉴定和抗补体活性测定。

【参考文献】

- [1] QIN Y, WEN Q, CAO J, et al. Flavonol glycosides and other phenolic compounds from *Viola tianshanica* and their anti-complement activities[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(7): 1140-1147.
- [2] BALLANTI E, PERRICONE C, DI MUZIO G, et al. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors[J]. *Autoimmun Rev*, 2011, 10(10): 617-623.
- [3] GANOVA P, GYURKOVSKA V, BELENSKA-TODOROVA L, et al. Functional complement activity is decisive for the development of chronic synovitis, osteophyte formation and processes of cell senescence in zymosan-induced arthritis[J]. *Immunol Lett*, 2017, 190: 213-220.
- [4] 金岚, 吴惠俐, 秦万章. 三色片治疗80例系统性红斑狼疮临床观察[C]//第四次全国雷公藤学术会议论文集. 上海, 2004: 439-440.
- [5] 吕诚, 胡小令, 杨宝林, 等. 雷公藤内酯醇对大鼠大脑皮质内注射 β -淀粉样蛋白后补体C1q和C3表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(5): 800-803.
- [6] XU T, FENG G, ZHAO B, et al. A non-target urinary and serum metabolomics strategy reveals therapeutical mechanism of *Radix Astragali* on adjuvant-induced arthritis rats[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2017, 1048: 94-101.
- [7] 杨耀芳, 钱巍, 金蕾. 2型糖尿病大鼠应用土鳖虫与黄芪对体液免疫及补体的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2010, 26(12): 1091-1095.
- [8] 雷心雨, 黄怡婷, 朱翠玲, 等. 黄芪总皂苷配伍雷公藤多苷抗炎镇痛作用[J]. *中药与临床*, 2015, 6(6): 29-31.
- [9] JIANG W Y, JEON B H, KIM Y C, et al. PF2401-SF, standardized fraction of *Salvia miltiorrhiza* shows anti-inflammatory activity in macrophages and acute arthritis *in vivo*[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 16(2): 160-164.
- [10] 陈嘉慧, 张雅心, 刘孟华, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术的丹参水提液全成分分析[J]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(1): 1-9.
- [11] 刘建群, 罗素花, 张锐, 等. 基于UPLC-Q-TOF MS研究煨制对雷公藤化学成分的影响[J]. *质谱学报*, 2018, 39(5): 573-582.
- [12] ZHANG X, XIAO H B, XUE X Y, et al. Simultaneous characterization of isoflavonoids and astragalosides in two *Astragalus* species by high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry[J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(13): 2059-2069.
- [13] 孙宁宁, 张可佳, 耿婉丽, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的加参片提取物化学成分分析[J]. *中草药*, 2018, 49(2): 293-304.
- [14] ZHANG D, QU L, WANG Z, et al. Identification of the chemical components and metabolites of tripterygium glycoside tablets in mice by HPLC-Q/TOF MS[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2019, 1125: 121721.
- [15] 张璟, 陈蒙蒙, 蒲时, 等. 雷公藤中雷公藤甲素、雷公藤吉碱和次碱的高效液相色谱-电喷雾串联质谱分析方法[J]. *农药学学报*, 2018, 20(2): 197-203.
- [16] 于泓, 胡青, 孙健, 等. 基于超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱技术的黄芪注射液化学成分分析[J]. *世界中医药*, 2019, 14(4): 809-817.
- [17] 颜晓静, 郑博文, 张毅达, 等. UPLC-Q-TOF/MS分析孟河医派特色猪心丹参炮制前后化学成分的变化[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9): 109-116.
- [18] 杨娜, 黄玮, 单兰兰, 等. UPLC-Q-TOF/MS结合数据后处理快速分类及鉴定丹参成分[J]. *时珍国医国药*, 2019, 30(10):

- 2408-2412.
- [19] 刘建群, 舒积成, 张锐, 等. 雷公藤二萜内酯的电喷雾及电子轰击质谱裂解规律研究[J]. 中药材, 2013, 36(5): 759-764.
- [20] 李明扬, 侯继芹, 韦丹丹, 等. HPLC-QTOF-MS法鉴别雷公藤多苷工艺残渣中的化学成分[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(6): 689-695.
- [21] 吴鹏, 李慧芬, 张学兰, 等. HPLC-TOF/MS分析丹参酒炙前后化学成分的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(11): 6-9.
- [22] SU P, CHENG Q Q, WANG X J, et al. Characterization of eight terpenoids from tissue cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii*, by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(9): 1183-1192.
- [23] 张驰, 张彩娟, 邱敏懿, 等. 丹参多化学成分的UPLC-LTQ Orbitrap MS快速表征解析[J]. 中医药学报, 2018, 46(3): 14-21.
- [24] YANG S T, WU X, RUI W, et al. UPLC/Q-TOF-MS analysis for identification of hydrophilic phenolics and lipophilic diterpenoids from *Radix salviae miltiorrhizae* [J]. *Acta Chromatogr*, 2015, 27(4): 711-728.
- [25] 阮姝楠, 卢燕, 陈道峰. 广藿香的抗补体活性成分[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(13): 2129-2135.
- [26] 杜冬生, 程志红, 陈道峰. 紫花地丁中的抗补体生物碱类成分研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4794-4800.
- [27] 宋伟华. 丹皮和毛七公的抗补体活性成分研究[D]. 上海: 复旦大学, 2013.
- [收稿日期] 2021-01-22 [修回日期] 2021-05-18
[本文编辑] 李睿旻

(上接第 316 页)

- [4] 李杰, 詹琤琤, 段时振, 等. 中药玄参研究概况[J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(8): 73-75.
- [5] SHEN X, EICHHORN T, GRETEN H J, et al. Effects of *Scrophularia ningpoensis* hemsl. on inhibition of proliferation, apoptosis induction and NF- κ B signaling of immortalized and cancer cell lines[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2012, 5(2): 189-208.
- [6] CHEN B, LIU Y, LIU H W, et al. Iridoid and aromatic glycosides from *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. and their inhibition of $[Ca^{2+}]_i$ increase induced by KCl[J]. *Chem Biodivers*, 2008, 5(9): 1723-1735.
- [7] HUANG T H, TRAN V H, DUKE R K, et al. Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF-kappa B activation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 104(1-2): 149-155.
- [8] XUE H Y, GAO G Z, LIN Q Y, et al. Protective effects of aucubin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(3): 369-374.
- [9] HUA J, QI J, YU B Y. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. and their α -glucosidase inhibitory activities[J]. *Fitoterapia*, 2014, 93: 67-73.
- [10] 刘青坡, 甄攀, 冯洁. 玄参的化学成分和生物活性研究[J]. 海峡药学, 2018, 30(10): 47-50.
- [11] 刘宾, 梁晨, 徐思思, 等. 不同产地玄参饮片哈巴昔与哈巴俄苷含量比较研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(3): 555-556.
- [12] JEONG E J, LEE K Y, KIM S H, et al. Cognitive-enhancing and antioxidant activities of iridoid glycosides from *Scrophularia buergeriana* in scopolamine-treated mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 588(1): 78-84.
- [13] 崔忠生, 邸科前, 马焕云. 哈巴昔及哈巴俄苷对过氧化氢损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 医学研究与教育, 2009, 26(2): 11-12.
- [14] 丁逸雪, 徐继校, 吴威, 等. HPLC法同时测定白术中4种倍半萜[J]. 中成药, 2020, 42(4): 927-931.
- [收稿日期] 2020-08-26 [修回日期] 2021-05-16
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 321 页)

- [2] FEIGIN V L, FOROUZANFAR M H, KRISHNAMURTHI R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. *Lancet*, 2014, 383(9913): 245-254.
- [3] LIANG H, LIU P, WANG Y S, et al. Protective effects of alkaloid extract from *Leonurus heterophyllus* on cerebral ischemia reperfusion injury by middle cerebral ischemic injury (MCAO) in rats[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(10): 811-818.
- [4] 杜朝, 姜浩, 曹怡, 等. 3D打印 β -TCP多孔复合支架的力学和生物学特性[J]. 医用生物力学, 2018, 33(3): 234-239.
- [5] QI H Y, HAN Y F, RONG J H. Potential roles of PI3K/Akt and Nrf2-Keap1 pathways in regulating hormesis of Z-ligustilide in PC12 cells against oxygen and glucose deprivation[J]. *Neuropharmacology*, 2012, 62(4): 1659-1670.
- [6] SHI J, GU J H, DAI C L, et al. O-GlcNAcylation regulates ischemia-induced neuronal apoptosis through AKT signaling[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14500.
- [7] KHAVINSON V, LINKOVA N, DIATLOVA A, et al. Peptide regulation of cell differentiation[J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2020, 16(1): 118-125.
- [8] LIU J, GINIS I, SPATZ M, et al. Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(1): C144-C153.
- [9] MARIGO I, ZILIO S, DESANTIS G, et al. T cell cancer therapy requires CD40-CD40L activation of tumor necrosis factor and inducible nitric-oxide-synthase-producing dendritic cells[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(4): 651.
- [10] DZIEDZIC T. Systemic inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke[J]. *Expert Rev Neurother*, 2015, 15(5): 523-531.
- [11] NAMURA S, ZHU J, FINK K, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 1998, 18(10): 3659-3668.
- [收稿日期] 2020-07-14 [修回日期] 2021-02-23
[本文编辑] 李睿旻