

基于超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱和网络药理学探讨通脉颗粒治疗脑卒中的作用机制

庞汉青^{1,2}, 商潇予¹, 魏 晔¹, 丁书文¹, 刘 量^{1,2}

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州, 225000; 2. 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏 扬州, 225000)

摘 要: **目的** 基于超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UHPLC-QTOF-MS)和网络药理学方法,探讨通脉颗粒治疗脑卒中的作用机制。**方法** 采用 UHPLC-QTOF-MS 技术鉴定通脉颗粒的化学成分;通过 TCMSP、TTD 和 PubMed 等数据库检索通脉颗粒活性成分作用靶点和脑卒中相关靶点;采用 STRING 数据库构建关键靶点的蛋白互作网络;采用 DAVID 数据库对关键靶点进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。**结果** 从通脉颗粒中鉴定出丹酚酸 B、葛根素和藜芦内酯等 96 个化学成分,筛选到 38 个活性成分和作用于脑卒中靶点 55 个,核心靶点包括前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、核因子 κ B (NF κ B)和核因子红细胞系 2 相关因子 2 (NRF2)等,关键通路主要涉及缺氧诱导因子 1 (HIF-1)、肿瘤坏死因子 (TNF)和磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt)等。**结论** 通脉颗粒中丹酚酸 B、葛根素和藜芦内酯等主要活性成分,通过作用于 PTGS2、NF κ B 和 NRF2 等靶点,调控 HIF-1、TNF 和 PI3K-Akt 等信号通路发挥抗脑卒中的作用。

关键词: 通脉颗粒; 脑卒中; 超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱; 网络药理学; 药效成分; 作用机制

中图分类号: R 743; R 285 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2022)24-013-07 DOI: 10.7619/jcmp.20223482

Mechanism of Tongmai granules in treatment of stroke based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry and network pharmacology

PANG Hanqing^{1,2}, SHANG Xiaoyu¹, WEI Ye¹, DING Shuwen¹, LIU Liang^{1,2}

(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225001; 2. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Disease, Yangzhou, Jiangsu, 225000)

Abstract: **Objective** To explore the mechanisms of Tongmai granules in treatment of stroke based on ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-QTOF-MS) and network pharmacology technology. **Methods** The chemical compounds of Tongmai granules were identified by UHPLC-QTOF-MS approach. The compounds' targets and stroke-related targets were screened via TCMSP, TTD and PubMed databases. STRING database was used to construct the protein interaction network of key targets. DAVID database was used for Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis for key targets. **Results** A total of 96 chemical components, such as salvianolic acid B, puerarin and ligustilide were identified from Tongmai granules. A total of 38 active compounds and 55 targets of Tongmai granules for stroke treatment were obtained. The core targets included prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), nuclear factor kappa B (NF κ B) as well as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and so on, and the key pathways mainly involved hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), tumor necrosis factor (TNF) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt and so on. **Conclusion** Major active components such as salvianolic acid B, puerarin and ligustilide in Tongmai granules regulate HIF-1, TNF and PI3K-Akt signaling pathways by acting on PTGS2, NF κ B

and NRF2 and other targets to play an anti-stroke role.

Key words: Tongmai granules; stroke; ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry; network pharmacology; effective compounds; action mechanism

脑卒中是一种急性脑血管疾病,具有发病率高、致残率高、复发率高和病死率高等临床特征^[1]。中国人群的脑卒中发病率排在全球首位,其是导致居民死亡的首位病因^[2]。《中国卒中中心报告 2020》^[3]揭示,脑卒中的发病率居高不下,且发病呈年轻化趋势。临床证据^[4]表明,与西药治疗相比,中医药在脑卒中防治中具有独特优势。通脉颗粒由丹参、川芎和葛根共 3 味中药组成,具有活血通脉之功效,临床主要用于脑卒中、动脉硬化、心绞痛和冠心病等心脑血管疾病治疗^[5]。通脉颗粒具有抑制神经炎症、抗氧化应激和改善血液流变学等多重药理作用^[6-8]。通脉颗粒是治疗脑卒中的核心中药制剂,临床疗效确切,不良反应较小^[9]。但通脉颗粒治疗脑卒中的药效成分和潜在作用机制尚不清楚,制约了其临床应用。本研究拟采用超高效液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UHPLC-QTOF-MS)技术对通脉颗粒的化学成分进行系统表征,并借助网络药理学对其抗脑卒中的作用途径进行初步探讨,以期更好地指导临床用药。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

通脉颗粒(批号 2110009)购自葵花药业集团(唐山)生物制药有限公司。甲醇、乙腈均为色谱纯,由美国 TEDIA 公司提供。超纯水由 Mill-Q 去离子水系统(美国密理博公司)自制,其他试剂为分析纯。

1.2 主要仪器

Waters Acquity 超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),含在线真空脱气机、柱温箱、自动进样器、四元泵和 WAD 检测器。SCIEX 4600 高分辨四极杆飞行时间质谱仪(美国 AB 公司)。KH-500DB 型数控超声仪, Centrifuge 5425R 低温高速离心机(德国艾本德公司)。

1.3 样品溶液制备

精密称取 1.0 g 样品至 100.0 mL 锥形瓶中,加入 30.0 mL 的 75% 甲醇水溶液,100 Hz 下超声提取 60 min;冷却至室温,75% 的甲醇水溶液

补足失重;将提取液于 13 000 转/min 离心 10 min,取上清转移至 1.5 mL 离心管,于 -20 ℃ 保存待用。

1.4 UHPLC-QTOF-MS 分析

液相色谱条件:色谱柱,Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 色谱柱(2.1 mm × 100.0 mm, 1.8 μm);流动相:A 为乙腈,B 为 0.1% 甲酸水溶液;进样量为 2.0 μL;流速为 0.4 mL/min;柱温为 40 ℃;梯度洗脱程序如下:0 ~ 1 min, 5% A;1 ~ 5 min, 5% ~ 12% A;5 ~ 15 min, 12% ~ 22% A;15 ~ 22 min, 22% ~ 38% A;22 ~ 30 min, 38% ~ 95% A;30 ~ 32 min, 95% A;32 ~ 32.1 min, 95% ~ 5% A;32.1 ~ 35 min, 5% A。

质谱条件:采用 DIA 采集模式获得 MS 和 MS/MS 数据,正、负离子模式扫描。离子化电压为(+)5 000/(-)4 500 V;离子源温度(+)500/(-)450 ℃,接簇电压(DP)为(+)80/(-)80 V,碰撞能(CE)为(+)35/(-)35 V;喷雾气(Gas 1)为 55 psi,辅助加热气(Gas 2)为 55 psi,气帘气为 35 psi。一级质谱母离子和二级质谱子离子扫描范围均为 m/z 50 ~ 1 500。

1.5 通脉颗粒活性成分的筛选

将从通脉颗粒鉴定的化学成分导入中药系统药理学数据库(TCMSP, <http://tcmsp.w.com/tcm-sp.php>)。以口服生物利用度(OB)和分子类药性(DL)为标准,筛选出 $OB \geq 30.00\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 的化学成分作为通脉颗粒的活性成分。此外,通过文献检索的方法,考虑化合物在通脉颗粒中的含量及其生物活性,筛选通脉颗粒活性成分。

1.6 通脉颗粒关键靶点获取

将通脉颗粒活性成分导入 TCMSP、PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 等数据库进行靶点挖掘。以“Stroke”“Cerebral ischemia”“Cerebral hemorrhage”为关键词,分别通过 PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、Comparative Toxicogenomics Database(CTD, <http://ctdbase.org/>) 和 Therapeutic Target Database(TTD, <http://db.idrblab.net/ttd/>) 等数据库

筛选脑卒中相关靶点。将化合物和脑卒中靶点导入 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库对基因名称规范处理。基于 Venny 2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es>) 平台绘制化合物靶点和疾病靶点的韦恩图,获得通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点。为表征通脉颗粒治疗脑卒中的关键功效,将通脉颗粒治疗脑卒中的交集靶点导入 CTD 数据库,汇总靶点对应的功效。

1.7 蛋白与蛋白交互 (PPI) 网络建立和关键靶标分析

采用 STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org/>) 分析关键靶点的 PPI 网络,物种设置为 “Homo Sapiens”,其他参数采用默认设置。基于 Cytoscape 3.7.1 软件构建通脉颗粒治疗脑卒中的 PPI 网络,并采用软件中自带的 NetworkAnalyzer 工具包对 PPI 网络的拓扑异构参数 (degree、betweenness、closeness) 进行分析,确定 PPI 网络的核心靶点。

1.8 “化合物-靶点”和“靶点-功效”网络构建

采用 Cytoscape 3.7.1 软件分别构建“化合物-靶点”和“靶点-功效”互作网络。通过分析“化合物-靶点”和“靶点-功效”网络的拓扑异构

参数,筛选通脉颗粒治疗脑卒中的关键药效成分、作用靶点和药效。

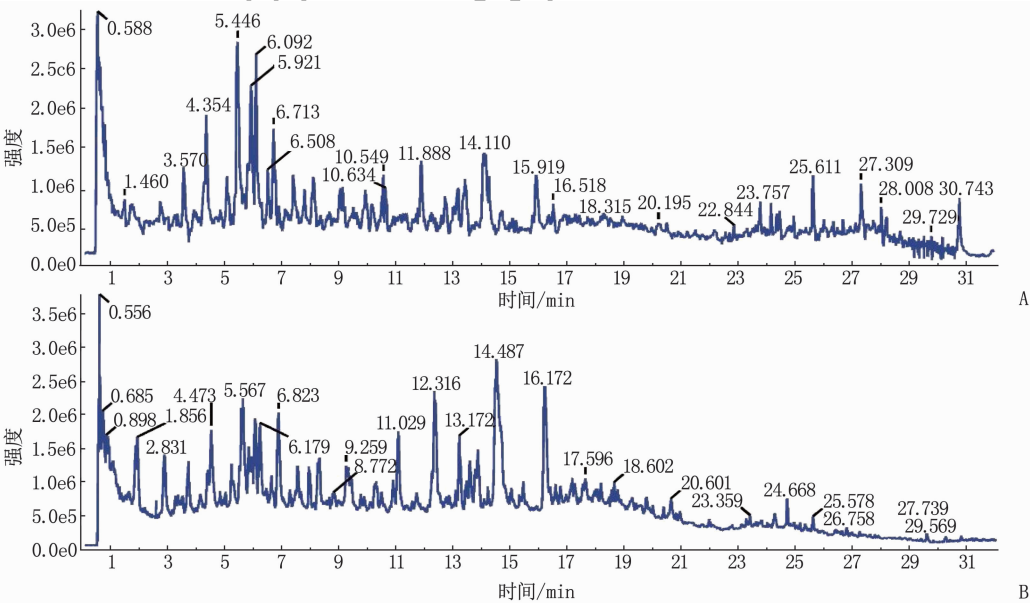
1.9 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析和基因本体论 (GO) 生物功能注释

将上述筛选到的交集基因导入 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库,对通脉颗粒治疗脑卒中的作用靶点进行 KEGG 通路分析和 GO 功能富集分析。利用 RStudio 软件以气泡图和条形图的形式可视化处理通脉颗粒治疗脑卒中的作用通路和涉及的生物功能。

2 结果

2.1 通脉颗粒的化学成分鉴定

采用 UHPLC-QTOF-MS 方法,通过文献查询^[10-12]、数据库匹配和标准品比对,共从通脉颗粒中鉴定出 96 个化合物,正离子模式下鉴定 38 个,负离子模式下鉴定 58 个。UHPLC-QTOF-MS 的总离子流图见图 1。通脉颗粒的化学成分以黄酮类、酚酸类、丹参酮类和苯酞类为主,其中黄酮类成分 39 个,酚酸类成分 26 个,丹参酮类成分 17 个,苯酞类成分 9 个和其他类成分 5 个。



A: 正离子模式; B: 负离子模式。

图 1 通脉颗粒的 UHPLC-QTOF-MS 的总离子流图

2.2 通脉颗粒治疗脑卒中的活性成分

通脉颗粒中活性化合物的筛选不仅根据化学成分的吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 行为 ($OB \geq 30\%$; $DL \geq 0.18$),也综合考虑化合物在通脉颗粒中含量高低及其生物活性。以葛根中葛根

素、大豆苷和染料木素为例,尽管这 3 个化合物的 OB 值均低于 30%,但葛根素、大豆苷和染料木素是葛根指标性成分,且有明显抗脑缺血活性^[13],因而也被确定为通脉颗粒活性成分。最终筛选到通脉颗粒中 38 个活性成分,其中丹参 16 种,葛根

14 种和川芎 8 种。见表 2。

表 2 通脉颗粒中活性成分

编号	化合物	OB/%	DL	化合物归属
P5	丹参素	36.91	0.06	丹参
P8	原儿茶醛	38.35	0.03	丹参
P14	大豆苷元-4',7-二葡萄糖苷	47.27	0.67	葛根
P17	染料木甙	13.35	0.75	葛根
P18	绿原酸	11.93	0.33	川芎
P19	咖啡酸	54.97	0.05	川芎
P20	夏佛塔苷	22.96	0.82	葛根
P23	葛根素	24.03	0.69	葛根
P25	葛根素-7-O-木糖苷	32.15	0.31	葛根
P26	大豆苷	14.32	0.73	葛根
P30	3'-甲氧基大豆苷	27.13	0.84	葛根
P32	阿魏酸	39.56	0.06	川芎
P48	芒柄花苷	69.67	0.21	葛根
P51	洋川芎内酯 I	46.80	0.08	川芎
P53	迷迭香酸	1.38	0.35	丹参
P57	紫草酸	2.67	0.76	丹参
P59	大豆黄素	19.44	0.19	葛根
P60	丹酚酸 B	3.01	0.41	丹参
P61	黄豆黄素	50.48	0.24	葛根
P63	3'-甲氧基大豆黄素	30.12	0.21	葛根
P65	丁烯基苯酚	42.44	0.07	川芎
P66	尼泊尔鸢尾异黄酮	37.78	0.30	葛根
P68	丹酚酸 A	2.96	0.70	丹参
P69	染料木素	17.93	0.21	葛根
P71	丹参二醇 A	75.39	0.46	丹参
P73	正丁烯基苯酚	42.44	0.07	川芎
P75	藜本内酯	23.50	0.07	川芎
P76	丹参酚醌 I	49.68	0.32	丹参
P78	芒柄花黄素	66.39	0.21	葛根
P80	降丹参酮	34.72	0.37	丹参
P81	紫丹参甲素	21.91	0.45	丹参
P82	洋川芎内酯 A	32.12	0.19	川芎
P85	紫丹参素 C	55.74	0.40	丹参
P87	二氢丹参酮 I	43.76	0.39	丹参
P90	隐丹参酮	52.34	0.40	丹参
P91	丹参酮 I	29.27	0.36	丹参
P94	丹参酮 II A	49.89	0.40	丹参
P95	丹参新酮	38.76	0.25	丹参

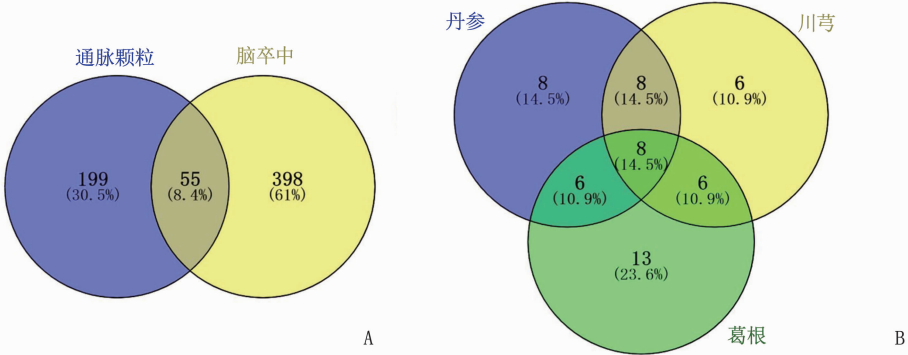
2.3 通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点

将筛选到的 38 个活性成分导入 PubMed、PharmMapper 和 TCMSP 数据库,共检索到通脉颗

粒化学成分靶点 254 个。PharmGKB、CTD、TTD 和 DrugBank 数据库共查询到脑卒中相关靶点 453 个。采用 VENNY 2.1 构建通脉颗粒化学成分和脑卒中靶点的韦恩图,共得到 55 个通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点(图 2A)。分别对丹参、川芎和葛根的作用靶点取交集,得到 3 味药的交集靶点 8 个(图 2B),分别为核因子 κ B(NF κ B)、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)、Toll 样受体 4(TLR4)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(BCL2)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)、血红素加氧酶 1(HMOX1)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)。

2.4 通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点 PPI 网络
关键靶点的 PPI 网络图见图 3,该 PPI 网络共包含 52 个节点(node)和 744 条边(edge)。以 degree 值大小筛选核心靶点,排在前列的靶点如下:白细胞介素-6(IL-6, degree = 38)、TLR4 (degree = 36)、IL-1 β (degree = 35)、肿瘤坏死因子(TNF, degree = 34)、血管内皮生长因子(VEGF, degree = 34)、信号传导与转录激活因子 3(STAT3, degree = 31)和 HIF-1 α (degree = 30)等,这些靶点在 PPI 网络中互作频率较高,提示上述靶点可能是脑卒中治疗的关键靶点。

2.5 通脉颗粒的化学成分-脑卒中靶点网络分析
通脉颗粒化学成分-脑卒中靶点的可视化网络见图 4,该网络共含有 93 个节点(化学成分 38 个,靶点 55 个)和 353 条边。采用“NetworkAnalyzer”插件进行网络分析,degree 值排名前 10 的活性成分为:P60(丹酚酸 B)、P23(葛根素)、P26(大豆苷)、P69(染料木素)、P59(大豆黄素)、P94(丹参酮 II A)、P5(丹参素)、P75(藜本内酯)、P82(洋川芎内酯 A)和 P48(芒柄花苷);前 10 位靶点



A: 通脉颗粒与脑卒中共同靶点; B: 通脉颗粒 3 味中药交集靶点。

图 2 韦恩图

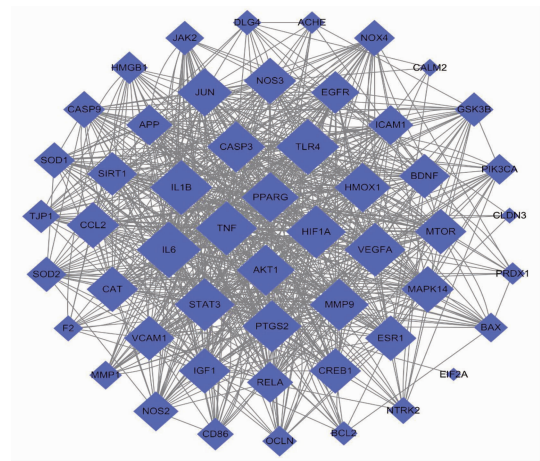


图3 通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点 PPI 网络

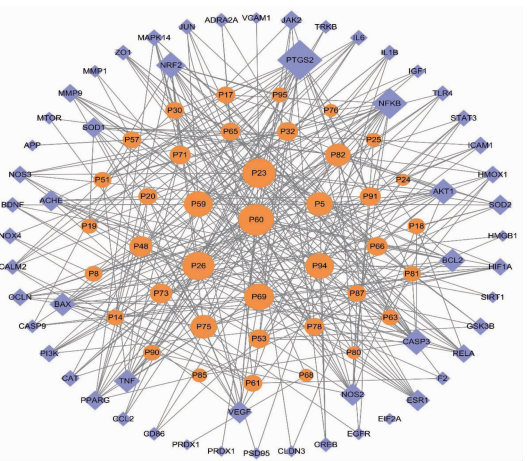


图4 通脉颗粒治疗脑卒中的活性成分-靶点网络

依次为：前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2)、核因子 κ B (NF κ B)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、核因子红红细胞系 2 相关因子 2 (NRF2)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1)、BCL2 相关 X 蛋白 (BAX)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因 (BCL2)、肿瘤坏死因子 (TNF)、诱导型一氧化氮合酶 (NOS2) 和 VEGF (血管内皮生长因子)。以上结果表明,上述 degree 值较高的活性成分和靶点可能是通脉颗粒治疗脑卒中的关键药效成分和作用靶点。

2.6 通脉颗粒靶点-功效网络分析

脑卒中的病理特征主要有神经炎症、神经毒性、细胞凋亡、氧化应激、血脑屏障损伤、能量代谢紊乱等^[14], 依次将这些靶点的功效归为这些病理特征。通脉颗粒的靶点-功效网络如图 5 所示。通脉颗粒治疗脑卒中的作用靶点主要富集在炎症 (degree = 22)、凋亡 (degree = 16)、氧化应激 (degree = 13) 和神经保护 (degree = 11) 上, 尤其是神经炎症和细胞凋亡富集的靶点最多, 提示其主要通过抗炎和抑制凋亡途径发挥抗脑卒中的作用。

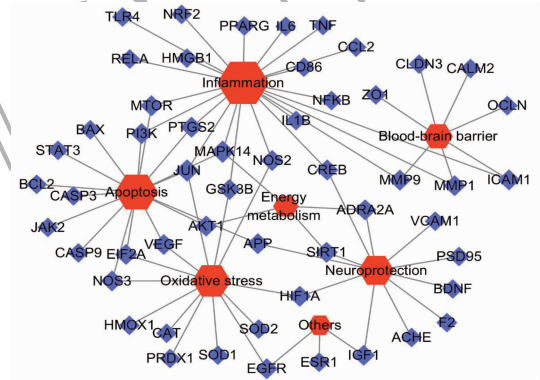


图5 通脉颗粒治疗脑卒中的靶点-功效网络

2.7 GO 功能及 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析共得到 549 条生物过程 (BP)、

55 条细胞组成 (CC) 和 78 条分子功能 (MF), 排名前 10 位 GO 条目的结果见图 6。通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点主要涉及细胞交互、催化活性、信号传导、细胞迁移的正调控、细胞死亡、神经元凋亡的调控等生物过程; 主要涉及蛋白复合物、细胞质、细胞连接、囊泡、线粒体和细胞膜等细胞组分; 主要参与蛋白结合、酶结合、信号受体结合、血红素结合、蛋白激酶结合和转录因子结合等分子功能。

进一步采用 KEGG 通路富集分析筛选通脉颗粒治疗脑卒中可能涉及的信号通路, 共得到 29 条显著相关的信号通路 ($P < 0.05$)。富集排名靠前的信号通路主要包括缺氧诱导因子信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、白细胞介素-17 信号通路 (IL-17 signaling pathway)、松弛素信号通路 (Relaxin signaling pathway) 和神经营养素信号通路 (Neurotrophin signaling pathway) 等。富集因子前 20 位的信号通路见图 7。KEGG 通路分析表明, 通脉颗粒主要通过抑制神经炎症相关信号通路发挥治疗脑卒中的作用。

3 讨论

脑中风的发病机制涉及再灌注损伤、神经炎症、神经细胞凋亡等复杂的缺血级联反应, 其确切发病机制尚未完全清楚^[15]。目前, 西医尚无特效的治疗方法, 而中医药治疗缺血性中风具有整体调节、综合治疗、标本兼顾的独特优势^[16]。通脉颗粒由丹参、川芎和葛根组成, 其中丹参具有活血祛瘀、清心除烦的作用; 川芎具有活血化瘀、祛风燥湿和行气止痛之功效; 葛根具有升阳透疹、

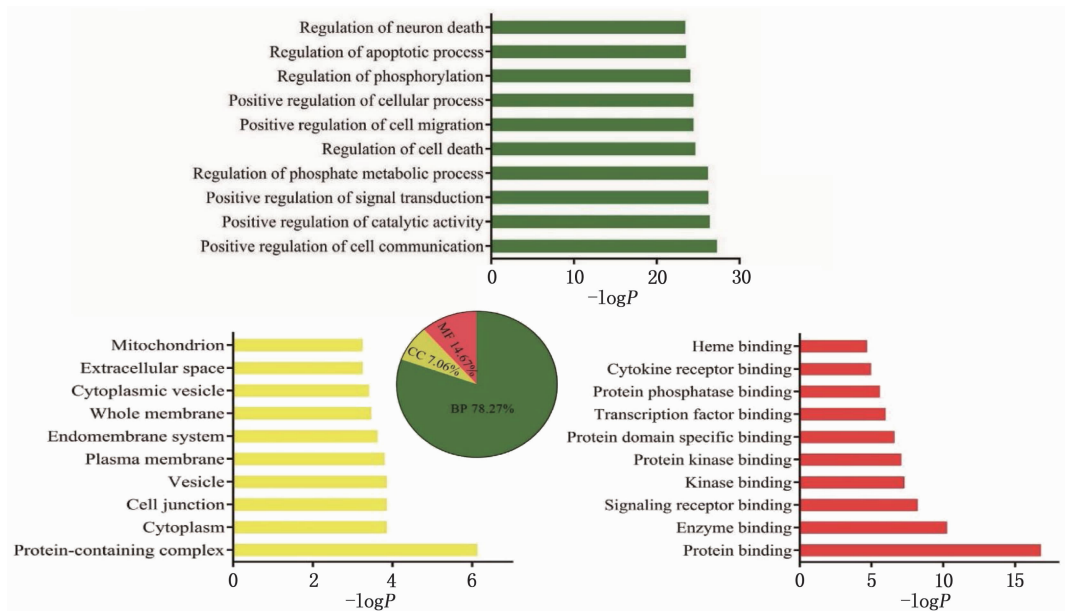


图 6 通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点 GO 富集分析

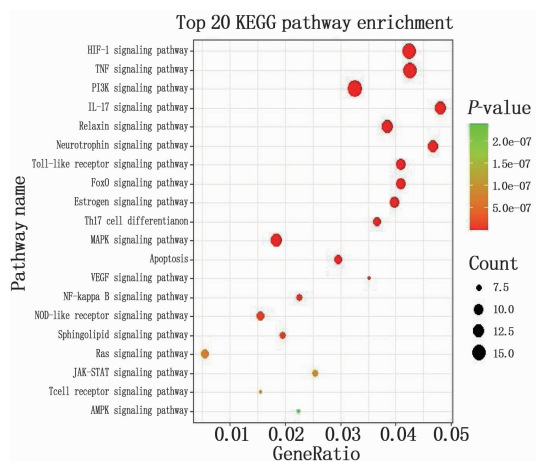


图 7 通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点 KEGG

通路富集分析

解肌退热和止泻的作用。诸药合用可活血、行气和养血,其被广泛用于脑卒中的临床治疗。本研究利用 UHPLC-QTOF-MS 结合网络药理学技术探讨了通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点和作用机制。

化合物-靶点网络分析显示,通脉颗粒中丹酚酸 B、葛根素、大豆苷、染料木素、丹参酮Ⅱ A 和藁本内酯等活性成分通过作用于 PTGS2、NFκB、CASP3、NRF2 和 AKT1 等靶点,在脑卒中治疗中发挥重要作用。丹酚酸 B 和丹参酮Ⅱ A 是丹参主要活性成分,丹酚酸 B 通过抑制脂质过氧化反应、清除氧自由基、促进半影区 VEGF 的表达等途径,有效改善血脑屏障损伤^[17]。丹参酮Ⅱ A 能够显著下调 BCL2 相关 X 蛋白(BAX)、胱天蛋白酶 3(Caspase-3)、胱天蛋白酶 8(Caspase-8)等凋亡诱导因子的表达,抑制神经元细胞凋亡^[18];并可降

低肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-1β 和 IL-6 等炎症因子的表达,进而抑制神经炎症,减轻细胞黏附分子和白细胞浸润导致的脑损伤^[19]。葛根素和染料木素是葛根主要药效成分,葛根素通过抑制单核细胞因子和内皮素分泌,减少脑梗死范围,改善脑卒中患者神经功能缺损^[20]。染料木素通过抑制 Ca²⁺ 超载、减轻谷氨酸神经毒性、上调 NRF2、HIF-1α 等抗氧化蛋白表达,对脑卒中有显著预防和保护作用^[21]。藁本内酯是川芎重要活性成分,可通过抑制 TLR4-MAPK/NF-κB 信号通路,减少炎症相关酶及炎症因子表达,减少缺血区脑梗死体积^[22]。

KEGG 富集分析结果表明,以 PTGS2、TNF、VEGF、NFκB、NRF2、BAX 和 IL-6 等为核心的通脉颗粒治疗脑卒中的关键靶点,参与了 HIF-1、TNF、PI3K-Akt、IL-17、Relaxin 和 Neurotrophin 等信号通路。缺氧诱导因子(HIF)是机体低氧应答状态下的关键转录因子,通过抑制氧化/硝化应激、促进血管生成等途径改善半影区的脑梗死体积^[23]。TNF-α 和 IL-1β、IL-6、IL-17 等炎症细胞因子具有促进脑内炎症反应,加重脑损伤的作用^[24]。PI3K-Akt 通路是自噬的经典通路,涉及神经炎症、内质网应激、氧化应激和神经元细胞凋亡等重要生命过程,与脑卒中的发生发展密切相关^[25]。Neurotrophin 信号通路在中枢神经系统中,对于促进神经细胞存活尤为重要,可通过激活 Trk 受体诱导神经递质释放,增强突触可塑性^[26]。PTGS2 参与局部缺血后的氧化应激和炎症反应,服用 PTGS2

抑制剂可增加脑卒中病死率^[27]。

综上所述,通脉颗粒中有酚酸类、苯酚类、黄酮类和丹参酮类等成分,通过作用于 PTGS2、HIF-1 α 、NF κ B、NRF2、TNF 和 BAX 等脑卒中相关靶点,干预 HIF-1、TNF 和 PI3K-Akt 等信号通路,进而抑制神经炎症、降低氧化应激和调节细胞凋亡,从而改善脑卒中症状。本研究从化学成分表征、靶点、功效、生物功能和信号通路等多角度探讨通脉颗粒治疗脑卒中的药效成分和作用机制,可为通脉颗粒的临床应用和二次开发提供参考。

参考文献

- [1] 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.
- [2] MA Q F, LI R, WANG L J, *et al.* Temporal trend and attributable risk factors of stroke burden in China, 1990–2019: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet Public Health*, 2021, 6(12): e897–e906.
- [3] 王陇德, 吉训明, 康德智, 等. 《中国卒中中心报告 2020》概要[J]. 中国脑血管病杂志, 2021, 18(11): 737–743.
- [4] CYRANOSKI D. Why Chinese medicine is heading for clinics around the world[J]. *Nature*, 2018, 561(7724): 448–450.
- [5] WANG F R, YANG X W, ZHANG Y, *et al.* Three new isoflavone glycosides from Tongmai granules[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2011, 13(4): 319–329.
- [6] 张静. 通脉颗粒联合氯吡格雷及依折麦布治疗脑梗死临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(2): 287–288.
- [7] BAI F, HU N, YANG R, *et al.* Tongmai granules improve rat hippocampal injury by regulating TLR4/MyD88/AP-1 signalling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 285: 114874.
- [8] 张颖, 李丹, 韩笑, 等. 通脉颗粒活血通脉功效的指征药效成分研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(7): 1398–1404.
- [9] 于海水, 杜振元. 通脉颗粒联合丁苯酞治疗急性脑梗死的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 252–257.
- [10] MEIM X D, CAO Y F, CHE Y Y, *et al.* Danshen: a phytochemical and pharmacological overview[J]. *Chin J Nat Med*, 2019, 17(1): 59–80.
- [11] CHEN Z J, ZHANG C, GAO F, *et al.* A systematic review on the rhizome of Ligusticum Chuanxiong Hort. (Chuanxiong)[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 119: 309–325.
- [12] WANG S G, ZHANG S M, WANG S P, *et al.* A comprehensive review on Pueraria: insights on its chemistry and medicinal value[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110734.
- [13] 孙小鑫, 苗青, 王瑞海, 等. 丹参-葛根药对成分、药理及临床应用的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(12): 4308–4313.
- [14] CAPRIO F Z, SOROND F A. Cerebrovascular disease: primary and secondary stroke prevention[J]. *Med Clin North Am*, 2019, 103(2): 295–308.
- [15] 武丽芳, 胥向红, 高晓嵘, 等. 二氧化氮与缺血性脑中风和血管性痴呆的相关性研究[J]. 实用临床医药杂志, 2015, 19(17): 18–20.
- [16] 周敏, 江丰, 崔远武, 等. 张伯礼教授辨治中风病经验[J]. 天津中医药, 2015, 32(9): 513–516.
- [17] FAN Y, LUO Q P, WEI J J, *et al.* Mechanism of salvianolic acid B neuroprotection against ischemia/reperfusion induced cerebral injury[J]. *Brain Res*, 2018, 1679: 125–133.
- [18] SUBEDI L, GAIRE B P. Tanshinone IIA: a phytochemical as a promising drug candidate for neurodegenerative diseases[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169: 105661.
- [19] WANG L, XIONG X X, ZHANG X, *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting autophagy and inflammation[J]. *Neuroscience*, 2020, 441: 46–57.
- [20] MIAO Q, WANG R H, SUN X X, *et al.* Combination of puerarin and tanshinone IIA alleviates ischaemic stroke injury in rats via activating the Nrf2/ARE signalling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 1022–1031.
- [21] SCHREIHOFFER D A, OPPONG-GYEBI A. Genistein: mechanisms of action for a pleiotropic neuroprotective agent in stroke[J]. *Nutr Neurosci*, 2019, 22(6): 375–391.
- [22] HAN L, LIU D L, ZENG Q K, *et al.* The neuroprotective effects and probable mechanisms of Ligustilide and its degradative products on intracerebral hemorrhage in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 63: 43–57.
- [23] HE Q Y, MA Y Z, LIU J, *et al.* Biological functions and regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor-1 α in ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 801985.
- [24] 侯兵兵, 张本平, 毛森林, 等. 进展性卒中危险因素的研究现状[J]. 临床神经病学杂志, 2020, 33(2): 146–151.
- [25] YUAN Q, WANG F J, JIA Z Z, *et al.* Xueshuantong injection combined with Salvianolate lyophilized injection improves the synaptic plasticity against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through PI3K/AKT/mTOR and RhoA/ROCK pathways[J]. *Brain Res*, 2022, 1787: 147923.
- [26] EYILETEN C, SHARIF L, WICIK Z, *et al.* The relation of the brain-derived neurotrophic factor with microRNAs in neurodegenerative diseases and ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(1): 329–347.
- [27] 张斯时, 张艳. 环氧合酶-1 和环氧合酶-2 基因多态性与阿司匹林抵抗的相关性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(17): 1724–1726.

(本文编辑: 周娟)