

实验研究

引用:周耀彬,高冬梅,王一峰,等.吴茱萸次碱衍生物血管舒张活性评价及分子对接模拟研究[J].陕西中医药大学学报, 2024,47(5):91-96.

吴茱萸次碱衍生物血管舒张活性评价 及分子对接模拟研究^{*}

周耀彬^{1,2} 高冬梅³ 王一峰^{1,2} 王婷¹ 高宇飞¹ 张玫倩⁴ 王川¹ 周静^{1**}

(1.陕西中医药大学药学院,陕西 咸阳 712046;2.陕西中医药大学医学技术学院,陕西 咸阳 712046;
3.杨凌职业技术学院药物与化工系,陕西 咸阳 712100;4.陕西中医药大学基础医学院,陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 探讨新型吴茱萸次碱衍生物的细胞毒性、血管舒张活性及其作用机制。方法 合成了6个吴茱萸次碱衍生物,并通过血管环试验对其血管舒张功能进行了测试,通过 CCK-8 细胞增殖实验和血管内皮细胞毒性实验对化合物的细胞毒性进行了评价。选取活性高的化合物,采用 AutoDock 软件进行分子对接,分析与 eNOS 酶的相互作用模式。结果 共合成得到6个吴茱萸次碱衍生物,对其血管舒张功能结果显示吴茱萸次碱衍生物均对苯肾上腺素预收缩的大鼠肠系膜动脉具有舒张作用,其中吴茱萸次碱衍生物 4c 的舒张作用最强。细胞毒性评价显示,吴茱萸次碱衍生物中化合物 4b、4e、4f 对肝癌细胞的抑制率略低,细胞毒性比原药略微有所下降;化合物 4a 与原药的细胞毒性相当,化合物 4c、4d 细胞毒性略高于原药。内皮细胞存活率测定结果显示,化合物 4c 对内皮细胞的毒性与原药相当。分子对接结果显示,活性较高的化合物与 eNOS 酶具有很好的能量匹配,并且与该蛋白的活性氨基酸残基形成氢键,配体与受体具有良好的结合能力。结论 分子对接结果与活性测定实验结果一致。这类吴茱萸次碱衍生物很可能通过激活 eNOS 酶的活性而具有了良好的血管舒张能力。

关键词:吴茱萸次碱衍生物;细胞毒性;血管舒张活性;分子对接

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:2096-1340(2024)05-0091-06

DOI:10.13424/j.cnki.jsctcm.2024.05.015

Evaluation of Vasodilatory Activity and Molecular Docking Simulation of Wuzhuyu Alkaloid Derivatives

ZHOU Yaobin^{1,2} GAO Dongmei³ WANG Yifeng^{1,2} WANG Ting¹
GAO Yufei¹ ZHANG Meiqian³ WANG Chuan¹ ZHOU Jing¹

(1.School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China; 2.School of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China; 3.Department of Pharmacy and Chemical Engineering, Yangling Vocational and Technical College, Shaanxi Yangling 712100, China;
4.School of Basic Medicine, Shaanxi University of Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712046, China)

Abstract: **Objective** To investigate the cytotoxicity, vasodilatory activity, and mechanism of action of a novel derivative of rutaecarpa alkaloids. **Methods** Six derivatives of rutaecarpa alkaloids were synthesized and their vasodilation function was tested by vascular ring assay. The cytotoxicity of the compounds was evaluated by CCK-8 cell proliferation assay and

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(22201169);陕西省科技厅青年基金项目(2021JQ-723);陕西省教育厅专项基金项目(21JK0601);国家级双创项目(202110716025)

^{**} 通讯作者:周静,副教授。E-mail:jingzhou2019@sntcm.edu.cn

endothelial cell toxicity assay. Select compounds with high activity, use AutoDock software for molecular docking, and analyze the interaction mode with eNOS enzyme. **Results** Six derivatives of rutaecarpa alkaloids were synthesized, and their vasodilation function was evaluated. The results showed that all derivatives of rutaecarpa alkaloids had a vasodilatory effect on the mesenteric arteries of rats pre contracted with phenylephrine, with derivative 4c of rutaecarpa alkaloids having the strongest vasodilatory effect. The cytotoxicity evaluation showed that compounds 4b, 4e, and 4f in the derivatives of Evodia rutaecarpa alkaloids had slightly lower inhibition rates on liver cancer cells, and the cytotoxicity was slightly reduced compared to the original drug; The cytotoxicity of compound 4a is comparable to that of the original drug, while the cytotoxicity of compounds 4c and 4d is slightly higher than that of the original drug. The results of endothelial cell survival assay showed that compound 4c had similar toxicity to the original drug on endothelial cells. The molecular docking results showed that compounds with higher activity have good energy matching with eNOS enzyme, and form hydrogen bonds with the active amino acid residues of the protein. The ligand has good binding ability with the receptor. **Conclusion** The molecular docking results are consistent with the experimental results of activity determination. These derivatives of rutaecarpa alkaloids are likely to have good vasodilation ability by activating the activity of eNOS enzyme.

Key words: Derivative of rutaecarpa alkaloids; Cytotoxicity; Vasodilatory activity; Molecular docking

高血压是最常见的中老年慢性病之一,也是心脑血管疾病最主要的危险因素^[1-2]。因此,慢性病的治疗一直是相关科学工作者一项重要的研究课题。天然产物是一个巨大的药物开发宝库,天然产物的研究与开发历来是人类寻找新药以及向疾病作斗争的重要手段,从中药中研制开发新药具有广阔的前景^[3]。近临床和实验研究不断证明中药单体或复方能有效调节血管内皮的收缩和舒张功能的平衡^[4]。从天然原型分子出发,经结构修饰或类似物的合成及活性研究,从中总结结构效关系,是研究天然产物活性成分的主要思路和方法,是创制新药物的一条有效途径,也是开展中药现代化的主要内容之一。

吴茱萸次碱是一种吲哚吡啶并喹啉类生物碱,是中药吴茱萸的主要生物碱之一^[5]。吴茱萸是一种应用广泛的传统中药^[6-8],始载于《神农本草经》,为芸香科植物吴茱萸及其变种石虎和疏毛吴茱萸的干燥近成熟果实。吴茱萸苦辛,性温热,为温中散寒,疏肝止痛的常用药^[9]。研究表明吴茱萸次碱及其衍生物具有降血压^[10-11]、抗炎^[12]、抗癌^[13]、抗肥胖^[14]和神经保护^[15]等多种药理活性^[16]。其中在血管舒张方面,研究证实吴茱萸次碱主要通过激活内皮细胞 Ca^{2+} -NO-cGMP 通路减少平滑肌的张力以发挥血管舒张作用^[11];也有研究表明,吴茱萸次碱的降血压和血管扩张效果与刺激降钙素基因相关肽(CGRP)的合成,激活辣椒素受体有关^[10]。但是,吴茱萸次碱具有一定的肝肾毒性^[17],限制了其在降血压及血管舒张方面的应用。因此,经过结构

修饰或改造,研发毒性低、药效好的吴茱萸次碱衍生物具有重要意义。

噻吩结构存在于很多具有重要生理活性的药物分子中^[18-19]。为了寻找血管舒张活性更好、毒性更低的吴茱萸次碱衍生物,课题组合成了6个含有噻吩结构的吴茱萸次碱衍生物。化合物的制备采用以下合成路线^[20](见图1),简单高效地合成了6个吴茱萸次碱衍生物。通过血管环法测定这些化合物的血管舒张活性,试验结果表明吴茱萸次碱衍生物及吴茱萸次碱均对苯肾上腺素(phenylephrine, PE)预收缩的大鼠肠系膜动脉具有舒张作用,其中吴茱萸次碱衍生物4c的舒张作用最强。新合成的吴茱萸次碱衍生物中化合物4b、4e、4f对肝癌细胞的抑制率略低,细胞毒性比原药略微有所下降;化合物4a与原药的细胞毒性相当,化合物4c、4d细胞毒性略高于原药。内皮细胞存活率测定结果显示,化合物4c对内皮细胞的毒性与原药相当。

血管张力的调控是血管收缩与舒张的动态平衡,其张力代表着内源性收缩与舒张物质的合力。而机体主要通过神经调节、内皮源性舒张因子、扩血管激素及脂肪细胞因子的生成和释放等机制调节血管舒张功能^[21]。其中,一氧化氮(nitric oxide, NO)是血管内皮细胞合成和释放的重要活性物质,其在血管张力调节中发挥至关重要的作用^[22],而NO受内皮型一氧化氮合酶(endothelial NOS, eNOS)调控。研究表明,吴茱萸次碱可以通过增加eNOS的磷酸化而促进NO的生成,用于预防内皮功能障碍,并有利于心血管健康^[23]。课题组通过分子对接模拟计

算,发现吴茱萸次碱衍生物 4c 可以很好的与 eNOS 酶进行对接。

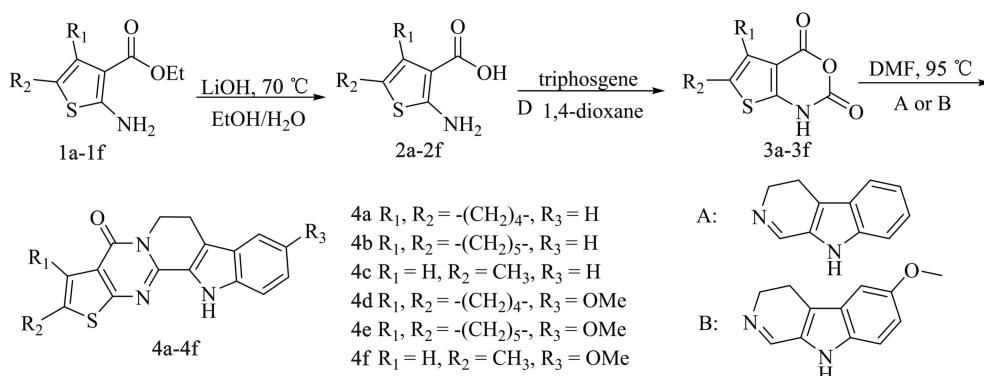


图 1 吴茱萸次碱衍生物的合成路线

1 仪器与材料

1.1 仪器 XT-4 熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司);Bruker ARX-400 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司,TMS 为内标);MP500Z 分析天平(上海恒平科学仪器有限公司);SZCL-4 数显智能控温磁力搅拌器(巩义市予华仪器有限公司);RE-2000A 旋转蒸发器(西安予辉仪器有限公司);DHG9070A 电热恒温鼓风干燥箱(巩义市予华仪器有限责任公司);CODA 动物无创血压测量系统(美国 Kent 公司);DMT 630M 型离体微血管张力测定系统(丹麦 DMT 公司);CLM-170-8-NF CO₂培养箱(新加坡艺思高科技有限公司);Imark 酶标仪(美国 BIORAD 公司);PL2604 肌张力描记记录系统(澳大利亚 ADInstruments 公司);SZ51 体式解剖显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 试剂 CCK-8 试剂盒:GLPBIO 品牌(GK10001);吴茱萸次碱(上海麦克林生化科技有限公司,纯度 $\geq 99\%$,批号 C11115043);苯肾上腺素(Sigma-Aldrich 上海贸易有限公司,纯度 $\geq 99\%$),其他实验所用化学试剂均购自天津市天力化学试剂有限公司。液体试剂用前均按照标准操作进行纯化处理。血管舒张活性测定所用大鼠动脉血管环自行制备。

1.3 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200 ± 20)g,6~8 周龄,由西安交通大学实验动物中心提供,实验动物生产(使用)许可证号 SCXK(陕)2020-030。动物饲养于陕西中医药大学中药药理实验室,室温(23 ± 2)℃,光照周期为 12 h,饲养期间动物自由进食饮水。

2 方法

2.1 血管舒张功能检测 SD 大鼠脱颈处死,无菌

条件下分离出大鼠肠系膜,浸泡于经滤过除菌并预冷的 Na⁺-PSS 缓冲溶液($119 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaHCO₃、 $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂、 $1.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH₂PO₄、 $4.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、 $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ CaCl₂和 $5.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖)中。在显微镜下将肠系膜动脉周围的脂肪以及组织用显微剪和显微镊轻轻剥离,将血管剪成 1.5~2 mm 的血管环。将血管浸没于充满氧气以及 5 mL Na⁺-PSS 溶液的 DMT 恒温浴槽(37 °C)中。采用两根 20 μm 的不锈钢金属丝将肠系膜动脉血管环悬挂于固定架上,固定架一端与微固定器相连来固定血管,另一端与张力传感器连接以测量血管张力变化。血管环固定好后,将血管张力调至 0 mN,平衡 40 min,每 15 min 施加 0.5 mN 的预张力,直至 2 mN。期间每隔 20 min 更换一次浴槽中的 Na⁺-PSS 缓冲溶液。平衡完毕后,加入 5 mL K⁺-PSS 缓冲液检验动脉环收缩活性,若动脉环在 2 次 K⁺-PSS 缓冲液中的收缩幅度均大于 5 mN,且 2 次收缩差异低于 10%时,取此动脉环备用。

动脉环给予苯肾上腺素(PE)预收缩,待其收缩至稳定后,采用浓度梯度累计法加入吴茱萸次碱或其衍生物($10^{-10} \sim 10^{-6.5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$),PowerLab 系统记录血管张力的变化曲线,研究吴茱萸次碱衍生物对大鼠血管舒张功能的影响。

分别取正常雄性 SD 大鼠的肠系膜动脉制备血管环,预先用 10 μM 的 PE 诱发血管环收缩,收缩曲线稳定后再累积加入浓度梯度的吴茱萸次碱及其衍生物,使用血管张力检测仪记录血管张力变化。

2.2 CCK-8 细胞增殖实验 首先进行细胞培养,再进行细胞铺板。取对数生长期的肝癌 HepG2 细胞,

胰酶消化,收集细胞,以 $1000 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,弃上清,新鲜培养液重悬细胞。对细胞计数,调整细胞密度,吸取 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液加入 96 孔板中,使细胞密度为每孔 5×10^3 个细胞,每组设置 6 个复孔,并设置空白组、对照组、阳性对照组(顺铂)和溶剂对照组,置培养箱中常规培养 24 h。之后配备一定精确浓度的药物。称取测试药物及顺铂,配置母液浓度为 $200 \mu\text{M}$ 的二甲基亚砜溶液,依次用二甲基亚砜稀释为浓度 1、3、10、30、50 μM 用于给药。然后进行给药。次日,空白组、对照组更换新鲜培养液,给药组更换含药物(1、3、10、30、50 μM)的培养液,阳性对照组更换含顺铂(1、3、10、30、50 μM)的培养液,溶剂对照组加入 $1 \mu\text{L}$ 的二甲基亚砜,分别置培养箱中常规培养 24 h。最后,对吸光度值进行检测。给药 24 h 后,每孔加入 $10 \mu\text{L}$ 的 CCK8 溶液,置于培养箱中继续孵育 2.5 h。用酶联免疫检测仪在 450 nm 波长处测定每孔的吸光度值 A,计算每组吸光度的平均值。按照下列公式计算抑制率:抑制率% = $[(A_{\text{对照组}} - A_{\text{给药组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

2.3 血管内皮细胞存活率实验 首先进行细胞培养。取人脐静脉内皮细胞 HUVEC 采用含有 20% 胎牛血清、1% 双抗(青霉素和链霉素)的 DMEM/F12 培养基培养。之后进行细胞铺板。取对数生长长期的人脐静脉内皮细胞 HUVEC,胰酶消化,收集细胞,以 $1000 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,弃上清,新鲜培养液重悬细胞。对细胞计数,调整细胞密度,吸取 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液加入 96 孔板中,使细胞密度为每孔 1×10^4 个细胞,每组设置 6 个复孔,并设置空白组及对照组,置培养箱中常规培养 24 h。之后给药。次日,空白组及对照组更换新鲜培养液,给药组更换含药物(1、3、10、30、50、100 μM)的培养液,置培养箱中常规培养 24 h。最后进行检测。24 h 后,每孔加入 $15 \mu\text{L}$ 浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$ 的 MTT 溶液,置于培养箱中继续孵育 3 h。然后小心吸尽各孔中的培养液,每组各孔加入 $100 \mu\text{L}$ 的二甲基亚砜,使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪在 490 nm 波长处测定每孔的吸光度值 A,计算每组吸光度的平均值。按照下列公式计算抑制率和存活率。抑制率% = $[(A_{\text{对照组}} - A_{\text{给药组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})] \times 100\%$,存活率% = $100\% - \text{抑制率}\%$ 。

2.4 分子对接模拟研究 为了研究化合物血管舒张作用机制并且验证配体-受体结合情况,选取血管舒张经典靶点 eNOS 酶^[24]为受体,在 PDB (<http://www.rcsb.org>) 数据库中,选取 Weber 等报道的晶体结构(PDB ID: 3NOS)^[25]做为靶点进行研究。分子对接研究使用 AutoDock 4.2 软件进行。选取具有显著生物活性的吴茱萸次碱衍生物(4c)作为配体与受体 eNOS 酶进行分子对接。在 ChemDraw Ultra 19.0 中进行三维定向绘制和优化,并使化合物最小能量化,能量最小化后的配体用于分子对接研究。配体-蛋白质相互作用通过 PyMOL 软件将结果可视化。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计软件统计分析,计量资料用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析检验各组间差异显著性,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异, $P < 0.01$ 为统计有显著性差异。

3 结果

3.1 血管舒张活性 吴茱萸次碱衍生物及吴茱萸次碱均对 PE 预收缩的大鼠肠系膜动脉具有舒张作用,其中吴茱萸次碱衍生物 4c 的舒张作用最强(见图 2)。

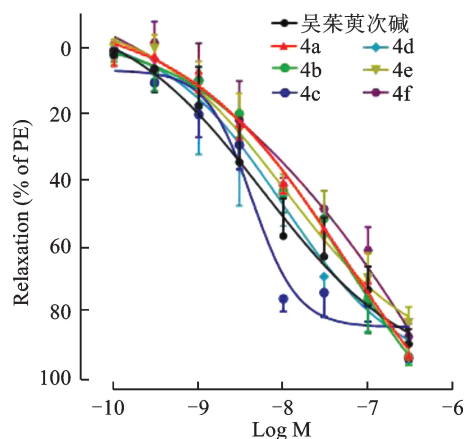


图2 吴茱萸次碱衍生物及吴茱萸次碱舒张大鼠肠系膜动脉的作用

3.2 CCK-8 细胞增殖实验结果 吴茱萸次碱及其衍生物对肝癌细胞的抑制率具体结果如表 1。测定结果显示,新合成的吴茱萸次碱衍生物中化合物 4b、4e、4f 对肝癌细胞的抑制率略低,细胞毒性比原药略微有所下降;化合物 4a 与原药的细胞毒性相当,化合物 4c、4d 细胞毒性略高于原药。

表 1 吴茱萸次碱及其衍生物对肝癌细胞的抑制率

浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1	3	10	30	50
吴茱萸次碱	-1.40 ± 1.78	1.32 ± 0.78	4.47 ± 2.23	8.11 ± 2.25	9.79 ± 1.81
4a	0.13 ± 0.75	1.22 ± 1.42	3.44 ± 2.29	6.33 ± 0.81	10.41 ± 1.91
4b	-0.10 ± 0.62	1.01 ± 1.26	2.15 ± 1.45	3.80 ± 1.17	6.31 ± 2.92
4c	0.14 ± 1.24	0.98 ± 0.39	5.30 ± 2.37	9.23 ± 0.63	13.05 ± 2.27
4d	-0.07 ± 0.39	1.10 ± 1.18	10.20 ± 0.18	14.66 ± 1.83	20.09 ± 3.01
4e	-0.19 ± 1.04	0.78 ± 0.88	4.74 ± 1.35	6.40 ± 1.11	7.48 ± 1.44
4f	-0.91 ± 1.70	0.72 ± 1.08	2.12 ± 0.81	3.80 ± 0.91	4.85 ± 0.69

3.3 血管内皮细胞存活率实验结果 化合物 4c 和吴茱萸次碱对血管内皮细胞的影响见表 2。

表 2 吴茱萸次碱和化合物 4c 对内皮细胞的存活率

浓度($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4c	吴茱萸次碱
1	101.44 ± 3.31	97.84 ± 1.93
10	85.25 ± 1.86	89.57 ± 1.35
30	81.29 ± 1.44	86.33 ± 0.64
50	79.26 ± 1.06	85.73 ± 1.24
100	72.42 ± 1.86	83.33 ± 0.54

内皮细胞存活率测定结果显示,化合物 4c 对内

皮细胞的毒性与原药相当。

3.4 分子对接模拟研究 对接结合能及相互作用键见表 3。配体与受体相互作用图见图 3。活性最强的化合物 4c 与 eNOS 酶的结合模式三维图如图 4 所示。

表 3 分子对接结果

化合物	4c
结合能($\text{kal} \cdot \text{mol}^{-1}$)	-9.65
氢键作用	Arg107 Arg183 Tyr475

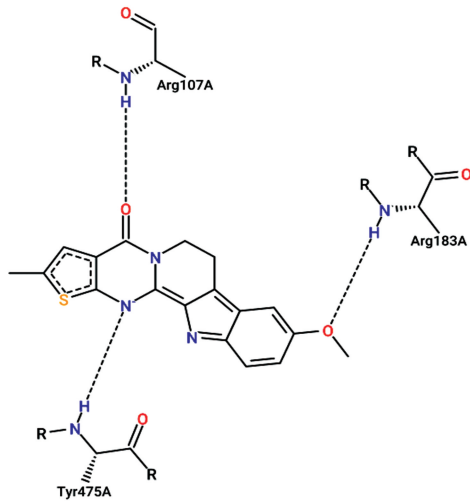


图 3 化合物 4c 与 eNOS 酶氨基酸残基的作用模式图

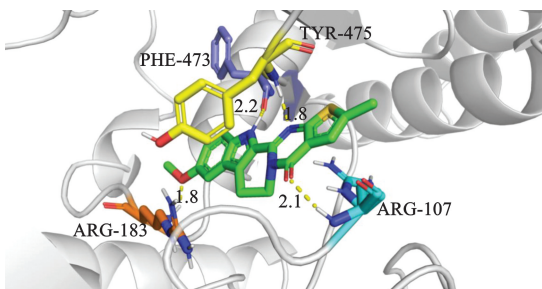
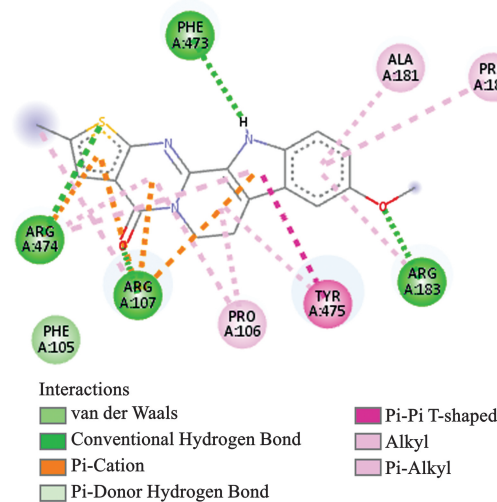


图 4 化合物 4c 与 eNOS 酶的结合模式三维图

4 讨论

本实验简单高效地合成了 6 个含有噻吩结构的吴茱萸次碱衍生物。虽然这些衍生物的细胞毒性与原药相比并没有明显改善。但是,在一定浓度下化合物 4c 舒张血管作用比吴茱萸次碱原药强。通过采用 AutoDock 软件进行计算机对接,分析了 4c 与 eNOS 酶的相互作用模式。分子对接结果表明,化合

物与4c与eNOS酶口袋中的不同氨基酸有较好的结合,分子对接结果与活性测定实验结果相一致。对接结果提示,该化合物可以通过氢键、疏水作用等类型的相互作用与受体eNOS酶很好地对接。化合物4c与受体eNOS酶氨基酸中的Arg107($d=2.1\text{\AA}$)、Arg183($d=1.8\text{\AA}$)、Tyr475($d=1.8\text{\AA}$)残基分别形成了三个氢键,这表明该化合物与eNOS酶蛋白可以很好地对接。喹啉环上羰基和氮的存在、吡啶环上甲氧基的存在对配体和受体之间氢键的形成起到了关键作用。对接结果表明这类吴茱萸次碱衍生物舒张血管的机制可能是由于激活了eNOS酶。噻吩环对吴茱萸次碱的影响并不显著,仍然需要进一步探究;而吡啶环的结构改造显示氧原子的存在对与受体结合有积极影响,具有进一步研究的意义。

参考文献

- [1] 王增武. 中国高血压流行和防治现状[J]. 中国心血管病研究, 2022, 20(8): 673-678.
- [2] 尚利. 中西医结合治疗老年高血压的临床观察[J]. 现代中医药, 2017, 37(2): 26-28.
- [3] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014[J]. *Journal of Natural Products*, 2016, 79(3): 629-661.
- [4] 张顺超, 朱吾元. 中药调节血管内皮功能的研究进展[J]. 河南中医, 2009, 29(11): 1141-1143.
- [5] WANG QZ, LIANG JY. Studies on the chemical constituents of *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth[J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2004, 39(8): 605-608.
- [6] 赵志娟, 肖君. 左金丸治疗消化系统疾病的临床研究进展[J]. 中国医学创新, 2022, 19(10): 185-188.
- [7] 郭凤霞, 周建峰, 康进忠, 等. 康进忠运用经方治疗疑难病验案举隅[J]. 现代中医药, 2020, 40(1): 39-41.
- [8] 李耀辉, 呼兴华, 许建泰, 等. 《千金方》求子篇治疗特点浅析[J]. 陕西中医药大学学报, 2022, 45(2): 16-21.
- [9] LIAO JF, CHEN CF, CHOW SY. Pharmacological studies of Chinese herbs. (9) Pharmacological effects of *Evodiae fructus* (author's transl)[J]. *Medicine*, 1981, 80(1): 30-38.
- [10] HU CP, XIAO L, DENG HW, et al. The depressor and vasodilator effects of rutaecarpine are mediated by calcitonin gene-related peptide[J]. *Planta Medica*, 2003, 69(2): 125-129.
- [11] WANG GJ, WU XC, CHEN CF, et al. Vasorelaxing action of rutaecarpine: effects of rutaecarpine on calcium channel activities in vascular endothelial and smooth muscle cells[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1999, 289(3): 1237-1244.
- [12] LIAO JF, CHIOU, SHEN YC, et al. Anti-inflammatory and anti-infectious effects of *Evodia rutaecarpa* (Wuzhuyu) and its major bioactive components[J]. *Chinese Medicine*, 2011, 6(1): 6.
- [13] 郭惠, 王珍珍, 杨琦, 等. 吴茱萸次碱对三种肿瘤细胞体外增殖抑制作用的研究[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(5): 44-47.
- [14] NIE XQ, CHEN HH, ZHANG JY, et al. Rutaecarpine ameliorates hyperlipidemia and hyperglycemia in fat-fed, streptozotocin-treated rats via regulating the IRS-1/PI3K/Akt and AMPK/ACC2 signaling pathways[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2016, 37(4): 483-496.
- [15] WANG QS, DING SL, MAO HP, et al. Antidepressant-like effect of ethanol extract from Zuojin Pill, containing two herbal drugs of *Rhizoma Coptidis* and *Fructus Evodiae*, is explained by modulating the monoaminergic neurotransmitter system in mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2013, 148(2): 603-609.
- [16] TIAN KM. Rutaecarpine: a promising cardiovascular protective alkaloid from *Evodia rutaecarpa* (Wu Zhu Yu)[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 141: 541-550.
- [17] 张茜, 周琦, 金若敏, 等. 吴茱萸次碱对肝肾毒性的初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 221-225.
- [18] KERI RS, CHAND K, BUDAGUMPI S, et al. An overview of benzothienophene-based medicinal chemistry[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, 138: 1002-1033.
- [19] 卜晓斐, 刘鹏, 付晓丽, 等. 噻吩并吡啶类抗血小板聚集药物研究概况[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(1): 43-48.
- [20] NIE LF, WANG SS, CAO JG, et al. Straightforward synthesis, characterization, and cytotoxicity evaluation of hybrids of natural alkaloid evodiamine/rutaecarpine and thieno[2,3-d]pyrimidinones[J]. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2020, 22(1): 69-82.
- [21] 李苗, 王丽丽, 常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(8): 730-736.
- [22] 赵连友. 一氧化氮与高血压[J]. 新医学, 1999, 30(5): 303-306.
- [23] LEE GH, KIM CY, ZHENG CF, et al. Rutaecarpine increases nitric oxide synthesis via ENOS phosphorylation by TRPV1-dependent CaMKII and CaMKK β /AMPK signaling pathway in human endothelial cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(17): 9407.
- [24] RODRÍGUEZ-CRESPO I, GERBER NC, ORTIZ DE MONTELLANO RR, et al. Endothelial nitric-oxide synthase: expression in *Escherichia coli*, spectroscopic characterization, and role of tetrahydrobiopterin in dimer formation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, 271(19): 11462-11467.
- [25] FISCHMANN TO, HRUZA A, NIU XD, et al. Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation[J]. *Nature Structural Biology*, 1999, 6(3): 233-242.

(修回日期: 2022-12-01 编辑: 崔春利)