

蒜酶催化大鼠血浆中同型半胱氨酸作用研究

哈密旦木·艾合买提江¹, 敬爽¹, 胡小霞², 史荣梅², 李新霞^{1,3*}, 王艳^{1,3*}

(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆埃乐欣药业, 乌鲁木齐 830000;
3. 新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: **目的** 研究蒜酶对血浆中同型半胱氨酸的催化裂解作用。**方法** 采用分子对接的方法对蒜酶与蒜氨酸、同型半胱氨酸、半胱氨酸的结合能打分, 初步探索蒜酶对同型半胱氨酸的催化裂解作用; 通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测血浆中的同型半胱氨酸, 研究蒜酶对血浆中的同型半胱氨酸催化裂解作用。**结果** 蒜氨酸、同型半胱氨酸、半胱氨酸与蒜酶分子对接, 获得其亲和力分别为-5.8、-4.7、-4.4 kcal/mol, 它们与蒜酶具有一定的结合活性, 同型半胱氨酸与蒜酶的反应作用小于蒜氨酸, 而大于半胱氨酸。同型半胱氨酸在 10~128 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内线性良好($r=0.9991$), 回收率为 93.39%~104.55%。蒜酶催化裂解血浆中的同型半胱氨酸转化率达 49.59%。**结论** 蒜酶对血浆中的同型半胱氨酸具有一定的催化裂解作用, 为蒜酶用于心血管系统疾病的预防和治疗提供了研究基础。

关键词: 血浆; 同型半胱氨酸; 蒜酶; 分子对接; 高效液相色谱法

Catalytic effect of alliinase on homocysteine in rat plasma

HAMIDANMU Ai-He-Mai-Ti-Jiang¹, JING Shuang¹, HU Xiao-Xia², SHI Rong-Mei²,
LI Xin-Xia^{1,3*}, WANG-Yan^{1,3*}

(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. Xinjiang Ailexin Pharmaceutical, Urumqi 830000, China; 3. Key Laboratory of Active Components of Xinjiang Natural Medicine and Drug Release Technology, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: Objective To study the catalytic cleavage of alliinase on homocysteine in plasma. **Methods** The molecular docking method was used to score the binding energy of alliinase with alliin, homocysteine and cysteine, and the catalytic cleavage of alliinase on homocysteine was preliminarily explored. Plasma was detected to study the catalytic cleavage of homocysteine in plasma by alliinase by high performance liquid chromatography. **Results** Alliin, cysteine, and homocysteine were docked with alliinase molecules, and their affinities were -5.8, -4.7, and -4.4 kcal/mol, respectively, indicating that they had a strong affinity with alliinase. Certain binding activity, but the reaction between homocysteine and alliinase was less than alliin and greater than cysteine. Homocysteine had a good linearity in the concentration ranges of 10–128 $\mu\text{mol/L}$ ($r=0.9991$), and the recoveries rate were 93.39%–104.55%.

基金项目: 新疆医科大学博士后科研项目(2019-13)、新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目(XJDX1713)

Fund: Supported by the Postdoctoral Research Project of Xinjiang Medical University (2019-13), and Xinjiang Key Laboratory of Natural Medicine Active Components and Drug Release Technology (XJDX1713)

*通信作者: 李新霞, 博士, 教授, 主要研究方向为药物分析及体内药分的研究。E-mail: lxx6668@163.com

王艳, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物研究。E-mail: wangyan_1060@163.com

*Corresponding author: LI Xin-Xia, Ph.D, Professor, No.393, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: lxx6668@163.com

WANG Yan, Ph.D, Associate Professor, No.393, College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China. E-mail: wangyan_1060@163.com

Alliinase catalyzed the cleavage of homocysteine in plasma with a conversion rate of 49.59%. **Conclusion** Alliinase can catalyze the cleavage of homocysteine in plasma, which has certain reference significance for the prevention and treatment of cardiovascular diseases by alliinase.

KEY WORDS: plasma; homocysteine; alliinase; molecular docking; high performance liquid chromatography

0 引言

同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 是蛋氨酸 (methionine, Met) 代谢的中间产物。Hcy 是一种含硫氨基酸, 绝大部分以二硫化物的形式存在, 还有约 1% 以还原形式的形式存在^[1]。结合形式与游离形式的 Hcy 的总和统称为 Hcy。血浆 Hcy 来源于蛋氨酸脱甲基反应, 并且高 Hcy 在人体蛋白质代谢过程中通过甲基和转硫化途径产生蛋氨酸和四氢叶酸^[2-3]。

高 Hcy 升高, 容易导致动脉硬化性血管疾病的发生, 因高 Hcy 可以使血管内皮细胞损伤, 导致血管平滑肌细胞的增殖, 并可以增强血小板功能, 从而形成血栓。血浆中的 Hcy 的水平高于 15 $\mu\text{mol/L}$ 时, 即可诊断为高同型半胱氨酸血症^[4]。研究表明, 高水平的 Hcy 现已被公认为是心脑血管疾病的独立危险因素之一^[5-7], 因此降低体内 Hcy 的含量对心血管系统疾病的防治具有参考意义。大蒜及大蒜制品在医药和保健品方面已得到普遍的认可, 大蒜在多方面都具有较强的药理活性作用, 具有降血压、降血脂、预防动脉粥样硬化、防治心血管疾病等多种作用^[8]。蒜酶是存在于大蒜中的内源酶, 能够裂解存在于大蒜中的天然底物蒜氨酸的 C-S 键, 生成大蒜辣素和系列含硫化合物, 从而表现出大蒜的特性。

分子对接 (molecular docking) 是在 FISHER 的受体学说的基础上发展而来的一种利用计算机进行分子模拟的技术, 对接时将小分子配体放入受体的活性位点, 之后按照能量互补、几何匹配及化学环境互补的原则, 对配体与受体相互作用的好坏进行实时评价, 找到配体与受体分子间最佳的结合模式 (包括合理的位置与构象), 这在药物设计上有非常重要的意义^[9]。本研究在上述研究背景的基础上, 根据同型半胱氨酸的结构中含有巯基, 与蒜氨酸的结构相似具有相似性, 故首先利用分子对接方式将蒜酶分别与蒜氨酸、Hcy、半胱氨酸对接获得结合能分数, 初步探索蒜酶对同型半胱氨酸的催化作用。对 Hcy 进行还原及衍生化^[10-12], 然后通过高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 测定蒜酶与 Hcy 反应前后的减少量来探索蒜酶能否催化裂解血浆中的 Hcy, 以期为进一步研究蒜酶催化血浆中 Hcy 提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

LC-20AD-SPD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); MULTIFUGE X3R 低温高速离心机 (美国 Thermo 公司); AB153-S 分析天平 (德国 Mettler toledo 公司)。

1.1.2 试剂

7-氟苯咪唑-4-硫酸铵盐 (7-fluorobenzo furazan-4-sulfonic acid ammonium salt, SBD-F)、甲醇 (色谱纯)、同型半胱氨酸对照品 (纯度 $\geq 98\%$) (美国 Sigma 公司); 同型半胱氨酸 (纯度 $\geq 90\%$, 上海源叶有限公司); 三(2-羧乙基)膦盐酸盐 (TCEP hydrochloride, TCEP-HCl) (上海阿拉丁公司); 氢氧化钠 (分析纯, 天津永晟精细化工有限公司); 磷酸二氢钾 (分析纯, 天津市知远化学试剂有限公司); 磷酸氢二钠 (分析纯, 天津市盛奥化学试剂有限公司); 四硼酸钠 (分析纯, 天津市光复精细化工有限公司); 乙二胺四乙酸二钠 (分析纯, 天津市福晨化学试剂厂); 高氯酸 (分析纯, 天津市申泰化学试剂有限公司); 蒜酶 (批号 201801001, 新疆埃乐欣药业公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 蒜酶与配体的分子对接

通过 pubchem 网站得到化合物蒜氨酸 (alliin)、L-半胱氨酸 (L-cysteine)、Hcy 的 SDF 结构文件, 并利用 Open Babel 2.3.2 软件将 SDF 文件转化为 PDB 文件, 从 Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) 数据库中检索获得蒜酶 (PDB ID: 2hor) 晶体结构。化合物与蒜酶的结构用 Autodock Tools 1.5.6^[13] 转化为 PDBQT 格式。利用 AutoDock Vina^[14] (版本: 1.1.2, <http://vina.scripps.edu/index.html>) 对蒜酶与配体小分子分别进行分子对接。

1.2.2 色谱条件

色谱柱: XBridge C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 检测波长 384 nm; 流动相: A 相, pH=4.5 的醋酸盐缓冲液; B 相, 甲醇; 洗脱程序为: A 相的体积变化为 0~16 min, 98%~95%, B 相的体积变化为 0~16 min, 2%~5%; 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

1.2.3 样品前处理

pH=6.8 磷酸盐缓冲液的配制: 称取磷酸氢二钠 15 g、磷酸二氢钾 11 g 置于 1 L 量瓶中, 加水溶解, 用 NaOH 调 pH 至 6.8。

硼酸缓冲液的配制: 称取四硼酸钠 4.77 g, 置于 100 mL 容量瓶中, 加 4 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠溶液溶解定容, 即得 0.125 mol/L 的硼酸缓冲液。

Hcy 储备液: 称取一定量的 Hcy 对照品置于量瓶中, 加入 pH=6.8 磷酸盐缓冲液溶解。

还原剂的配制(TCEP): 精密称取 TCEP 11.5 mg, 置于 5 mL 容量瓶中, 纯水定容, 得 8 $\mu\text{mol/mL}$ 的 TCEP 还原溶液。

衍生化试剂的配制(SBD-F): 精密称取 SBD-F 10 mg, 加硼酸缓冲液溶解至 10 mL, 得 1 mg/mL SBD-F 溶液。量取 1 mL SBD-F 溶液, 置于 10 mL 容量瓶中, 加硼酸缓冲液定容, 得 0.42 $\mu\text{mol/L}$ 的 SBD-F 储备液。-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。SBD-F 工作液是由 SBD-F 储备液:硼酸缓冲液:1.55 mmol/L 氢氧化钠=1:2.5:0.2 (V:V:V)的比例配制。

取大鼠血浆 100 μL , 加入 0.6 mol/L 的高氯酸 100 μL , 样品离心(14000 r/min, 10 min), 吸取上清液 100 μL , 加入 0.8 $\mu\text{mol/L}$ TCEP 溶液 100 μL , 加入 4.2 $\mu\text{mol/L}$ SBD-F 储备液 200 μL , 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 70 min, 冷却 10 min, 即得待用样品。

1.2.4 线性范围

取一定量的 Hcy 标准品, 用 pH=6.8 缓冲液稀释, 配制一定浓度的 Hcy 标准储备液, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

分别精密吸取 5、2.5、1.25、0.625 mL Hcy 储备液 ($C=1280 \mu\text{mol/L}$)置于 10 mL 量瓶中, 加 pH=6.8 磷酸盐缓冲液溶解, 定容。并稀释得到 5 个不同质量浓度(1280、640、320、160、80 $\mu\text{mol/L}$)的 Hcy 溶液。

取空白血浆 90 μL , 依次加入上述系列浓度 Hcy 标准溶液 10 μL , 得质量浓度为 8.0、16.0、32.0、64.0、128.0 $\mu\text{mol/L}$ 的标准样品溶液, 按“样品前处理”项下方法操作, 进样分析, 得峰面积(A)。

1.2.5 准确度和精密度实验

取 20 份的 90 μL 空白血浆分别加入 10 μL 不同质量浓度(80、160、640、1280 $\mu\text{mol/L}$)的 Hcy 标准溶液, 每一质量浓度制备 5 个样品, 按“样品前处理”方法操作, HPLC 分析, 记录峰面积。1 d 内进行连续测定, 考察日内准确度和日内精密度。并连续测定 5 d, 考察日间精密度。

1.2.6 回收率实验

取血浆 90 μL , 依次加入最低检出限、低、中、高(80、160、640、1280 $\mu\text{mol/L}$)质量浓度的 Hcy 标准溶液 10 μL , 每一浓度制备 6 个样品, 按“样品前处理”项下方法操作, HPLC 分析, 记录峰面积值。另取血浆 100 μL , 加 0.6 mol/L 的高氯酸 100 μL , 涡旋混匀 2 min, 离心(4 $^{\circ}\text{C}$ 、12000 r/min) 10 min, 取上清液 90 μL , 依次加入 Hcy 标准溶液 10 μL , 同法还原和衍生, 摇匀, 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 70 min, 冷却 10 min, 进样分析, 记录峰面积值。

1.2.7 稳定性实验

本研究所用的血浆均是从大鼠中得到的, 即按照“样

品前处理”项下操作后, 进行连续测定, 考察了其稳定性。

取血浆 90 μL 分别加入不同质量浓度(80、1280 $\mu\text{mol/L}$)的 Hcy 标准溶液, 每个质量浓度制备 5 个样品, 按“1.2.2”项下进行操作, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 0、2、4、8、12、24 h, HPLC 分析, 计算各样品中 Hcy 浓度的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD)值。

1.2.8 蒜酶对大鼠血浆中 Hcy 的催化裂解作用

取血浆 90 μL 于 EP 管中, 加入 Hcy 10 μL , 加入 0.6 mol/L 高氯酸 100 μL , 样品离心(14000 r/min, 10 min), 吸取上清液 100 μL , 加入蒜酶 400 μL , 于 35 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min, 加入 0.8 $\mu\text{mol/mL}$ 的 TCEP 溶液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 10 min, 加入 SBD-F 储备液 200 μL 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴反应 70 min, 冷却 10 min, 作为供试品溶液备用, HPLC 测定。

另外以磷酸盐缓冲液替代蒜酶溶液加入反应体系, 作为反应的试剂空白对照, HPLC 测定。

2 结果与分析

2.1 蒜酶与配体的分子对接

2.1.1 分子对接结合能分数

由表 1 结合能分数得知, 蒜酶分别与蒜氨酸、Hcy、半胱氨酸对接, 获得其亲和力分数分别为 -5.8、-4.7、-4.4 kcal/mol, 说明它们与蒜酶都具有一定的结合活性。因配体与受体结合的构象稳定时能量越低, 发生的作用可能性越大, 所以 Hcy 与蒜酶的反应作用能力小于蒜氨酸, 而大于半胱氨酸。

表 1 结合能打分及对接参数结果

| 名称 | 网格尺寸/cm | 亲分数和/(kcal/mol) | | |
|----|----------|-----------------|------|--------|
| | | 蒜氨酸 | 半胱氨酸 | 同型半胱氨酸 |
| 蒜酶 | 40×40×40 | -5.8 | -4.4 | -4.7 |

2.1.2 结合模式分析

采用分子对接的方法研究受体蛋白与蒜氨酸、半胱氨酸、Hcy 之间的结合模式, 图 1(A)为受体蒜酶与蒜氨酸之间的结合模式, 氨基酸残基 Ser250、Thr133、Val132、Tyr165、Arg259 与蒜氨酸配体小分子形成氢键相互作用, 氨基酸残基 Gly131、Thr248、Val227、Tyr228、Asp225 与蒜氨酸配体小分子形成疏水相互作用。图 1(B)为受体蒜酶与半胱氨酸配体小分子之间的结合模式, 氨基酸残基 Thr253 与半胱氨酸配体小分子形成氢键相互作用, 氨基酸残基 Gly254、His255、Trp73、Glu70、Leu69 与半胱氨酸配体小分子形成疏水相互作用。图 1(C)为受体蒜酶与 Hcy 配体小分子之间的结合模式, 氨基酸残基 Val132、Thr133、Arg259、Ser250、Tyr165 与 Hcy 配体小分子形成氢键相互

作用,氨基酸残基 Val227、Thr248、Gly131 与配体小分子形成疏水相互作用。这些氢键相互作用是蛋白质和化合物之间最主要的作用力。所有的这些相互作用使得蛋白质和化合物形成稳定的复合物。

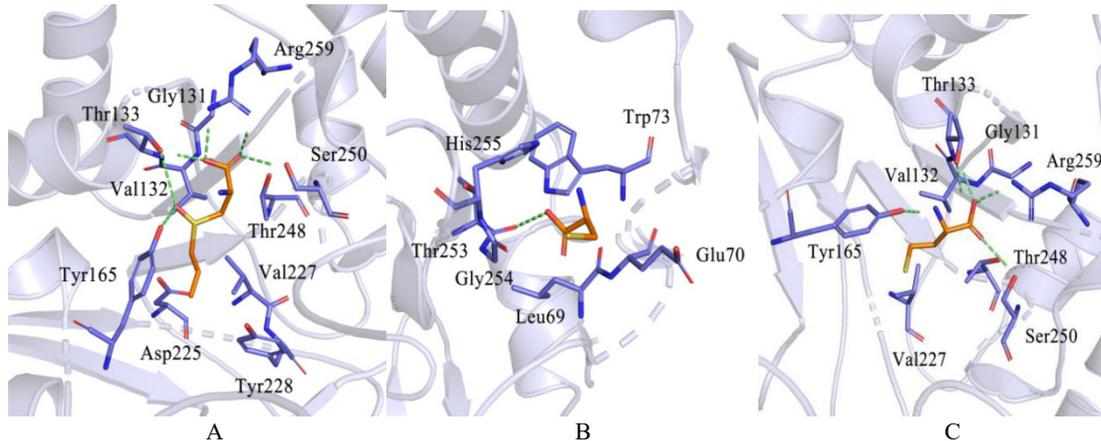
2.1.3 线性范围和定量限

以 Hcy 的质量浓度(X , $\mu\text{mol/L}$)为横坐标,峰面积均值 Y 为纵坐标作线性回归曲线图,得回归方程 $Y=102.41X+581.5$, $r=0.9991$,表明 Hcy 在 10~128 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内线性关系良

好。根据峰面积的分度确定 10 $\mu\text{mol/L}$ 为定量下限。

2.1.4 回收率和精密度

结果显示,不同浓度 Hcy 标准样品溶液的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 8.09%、3.71%、2.79%、2.17%,均小于 15%,精密度符合生物样品分析方法要求。表 2 结果显示,加标回收率范围为 93.39%~104.55%,RSD 分别为 0.79%、0.51%、3.84%和 1.54%,均小于 15%,满足检测要求。



注: A 为蒜氨酸与蒜酶的结合模式图; B 为半胱氨酸与蒜酶的结合模式图; C 为同型半胱氨酸与蒜酶的结合模式图。

图 1 受体和蒜酶的结合模式图

Fig.1 Binding pattern of receptor and alliinase

表 2 回收率结果($n=6$)
Table 2 Recoveries rate results ($n=6$)

| 分类 | 峰面积 A1 | 峰面积 A2 | A1/A2/% | $\bar{A}1/\bar{A}2/\%$ | RSD/% |
|---------|--------|--------|---------|------------------------|-------|
| 最低检出限浓度 | 1682 | 1724 | 97.56 | 98.24 | 0.79 |
| | 1692 | 1713 | 98.77 | | |
| | 1595 | 1612 | 98.95 | | |
| | 1649 | 1687 | 97.75 | | |
| | 1607 | 1622 | 99.08 | | |
| | 1638 | 1683 | 97.33 | | |
| 低 | 2628 | 2801 | 93.82 | 93.39 | 0.51 |
| | 2631 | 2815 | 93.46 | | |
| | 2635 | 2802 | 93.74 | | |
| | 2612 | 2811 | 92.92 | | |
| | 2598 | 2803 | 92.69 | | |
| | 2644 | 2822 | 93.69 | | |
| 中 | 6546 | 6388 | 102.47 | 104.55 | 3.84 |
| | 6161 | 5785 | 106.50 | | |
| | 6414 | 6342 | 101.14 | | |
| | 6371 | 6096 | 104.51 | | |
| | 6576 | 5895 | 111.55 | | |
| | 6440 | 6368 | 101.13 | | |
| 高 | 11874 | 12228 | 97.11 | 97.05 | 1.54 |
| | 11642 | 12219 | 95.28 | | |
| | 11903 | 11955 | 99.57 | | |
| | 12294 | 12573 | 97.78 | | |
| | 11751 | 12189 | 96.41 | | |
| | 11399 | 11854 | 96.16 | | |

2.1.5 稳定性实验

各样品中 Hcy 浓度的 RSD 值分别为 1.54%、2.47%，均小于 15%，结果表明样品溶液在 4 °C 放置 24 h 稳定。

2.1.6 蒜酶对大鼠血浆中 Hcy 的催化裂解作用

表 3 结果显示，蒜酶可催化裂解血浆中 Hcy，转化率平均可达到 49.59%。

表 3 蒜酶对大鼠血浆中 Hcy 的催化裂解作用结果($n=3$)
Table 3 Results of the catalytic cleavage of Hcy in rat plasma by alliinase ($n=3$)

| 反应顺序 | 浓度/($\mu\text{mol/L}$) | 含量/ μg | 减少量/ μg | 转化率/% |
|------|--------------------------|-------------------|--------------------|-------|
| 反应前 | 21.32 | 4.15 | - | - |
| 反应后 | 11.17 | 2.17 | 1.98 | 47.53 |
| 反应前 | 52.02 | 10.31 | - | - |
| 反应后 | 25.62 | 4.98 | 5.32 | 51.64 |

3 结论与讨论

本研究通过分子对接分别获得了蒜酶与蒜氨酸、Hcy、半胱氨酸对接的结合能分数，按照结合能(score)来判断活性成分与靶点的匹配度，一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低，发生作用的可能性越大^[15-16]。分子对接结果表明蒜氨酸、Hcy、半胱氨酸可与蒜酶结合，并通过结合模式可知，氨基酸残基 Val132、Thr133、Arg259、Ser250、Tyr165 与 Hcy 配体小分子形成氢键相互作用，氨基酸残基 Val227、Thr248、Gly131 与配体小分子形成疏水相互作用。这些氢键相互作用是蒜酶和化合物 Hcy 之间最主要的作用力。所有的这些相互作用使得蒜酶和化合物 Hcy 形成稳定的复合物。

研究蒜酶对血浆中 Hcy 的催化裂解作用的前提是建立准确、可靠和简便的 Hcy 的检测方法，目前 Hcy 的检测方法有气相色谱质谱联用法、化学发光免疫法及 HPLC 法等^[17-20]。故本研究首先采用 HPLC 法，文献报道的 HPLC 法中测定的都是总的 Hcy，本研究选择还原剂 TCEP 和衍生剂 SBD-F 进行柱前还原和衍生，并比较蒜酶与大鼠血浆中 Hcy 反应前后 Hcy 的含量，蒜酶在血浆中对 Hcy 的转化率为 49.59%，较前期实验非血浆中的转化率低，降低的原因可能是蒜酶在血浆中的酶活力受血浆中其他成分的影响，为后续详细研究蒜酶在血浆中对 Hcy 的催化裂解提供依据。本研究采用分子对接和 HPLC 法探索了蒜酶对大鼠血浆中同型半胱氨酸的催化裂解作用。研究结果表明，蒜酶对大鼠血浆中 Hcy 具有一定的催化裂解作用，为深入研究蒜酶对血浆中同型半胱氨酸催化作用奠定了基础，也为蒜酶用于心血管系统疾病的预防和治疗提供了研究基础。

参考文献

- [1] IVANOV AV, BULGAKOVA PO, VIRUS ED, *et al.* Capillary electrophoresis coupled with chloroform-acetonitrile extraction for rapid and highly selective determination of cysteine and homocysteine levels in human blood plasma and urine [J]. *Electrophoresis*, 2017. DOI: 10.1002/elps.201700133
- [2] SILVA A, LACERDA FV, MOTA M. Effect of strength training on plasma levels of homocysteine in patients with type 2 diabetes [J]. *Int J Prev Med*, 2019, 10(1): 80.
- [3] 张晓燕. 研究血浆同型半胱氨酸水平测定及与脑梗死关系[J]. *医学食疗与健康*, 2020, 18(23): 146-147.
ZHANG XY. Research on the determination of plasma homocysteine level and its relationship with cerebral infarction [J]. *Med Diet Health*, 2020, 18(23): 146-147.
- [4] CIONI G, MARCUCCI R, GORI AM, *et al.* Increased homocysteine and lipoprotein (a) levels highlight systemic atherosclerotic burden in patients with a history of acute coronary syndromes [J]. *J Vasc Surgery*, 2016, 64(1): 163-170.
- [5] 曾完卿, 何俊. 急性脑梗死患者血浆同型半胱氨酸及相关硫醇物、叶酸、维生素 B₁₂ 水平变化及相关性研究[J]. *神经损伤与功能重建*, 2013, (1): 26-29.
ZENG WQ, HE J. Changes in plasma homocysteine and related thiols, folic acid, vitamin B₁₂ levels and their correlation in patients with acute cerebral infarction [J]. *Nerve Injur Funct Reconst*, 2013, (1): 26-29.
- [6] 张德德. 松龄血脉康胶囊治疗原发性高血压 I 级(肝阳上亢证)临床研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2018.
ZHANG DD. The clinical study of Songling Xuemaikang capsule in the treatment of primary hypertension Grade I (hypertension of liver-yang) [D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
- [7] VAN MEURS JB, DHONUKSHE-RUTTEN RA, PLUIJM SM, *et al.* Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture [J]. *New England J Med*, 2004, 350(20): 2033-2041.
- [8] 张宇, 邵淑丽. 大蒜的药理作用[J]. *高师理科学刊*, 2007, (1): 37-39.
ZHANG Y, SHAO SL. The pharmacological effects of garlic [J]. *J Sci Norm Univ*, 2007, (1): 37-39.
- [9] VIMAL A, JHA A, KUMAR A. Eugenol derivatives prospectively inhibit L-asparaginase: A heady target protein of *Salmonella typhimurium* [J]. *Microb Pathog*, 2017. DOI: S0882401017310264
- [10] JAKUB K, MARTINA V, VIKTOR K. Measurement of homocysteine and other aminothiols in plasma: advantages of using tris (2-carboxyethyl) phosphine as reductant compared with tri-n-butylphosphine [J]. *Clini Chem*, 2001, (10): 1821-1828.
- [11] 唐秀芳, 甄乾娜, 樊子勉, 等. 柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法测定血浆中同型半胱氨酸[J]. *色谱*, 2012, 30(6): 613.
TANG XF, ZHEN QN, FAN ZM, *et al.* Determination of homocysteine in plasma by high performance liquid chromatography with fluorescence detection using pre-column derivatization [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(6): 613.
- [12] NOLIN TD, MCMENAMIN ME, HIMMELFARB J. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: Application to studies of oxidative stress [J]. *J Chromatogr B Anal*

- Technol Biomed Life, 2007, 852(1): 554–561.
- [13] SANNER MF. Python: A programming language for software integration and development [J]. Mol Graph Model, 1999, 17(1): 57–61.
- [14] TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. Comput Chem, 2010, 31(2): 455–461.
- [15] KUN YH, YUKIKO M, YOSHIYUKI A, *et al.* Systems dock: A web server for network pharmacology-based prediction and analysis [J]. Nucl Acid Res, 2016, (1): 507–513.
- [16] 张磊, 朴胜华, 郭姣. 基于网络药理学的佛手干预2型糖尿病潜在靶点机制研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(10): 3594–3604.
ZHANG L, DU SH, GUO J. Research on the potential target mechanism of bergamot intervention in type 2 diabetes based on network pharmacology [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2020, 22(10): 3594–3604.
- [17] 杨涛, 沈杰. 高效液相(HPLC)荧光法同时测定人血浆中 4 种硫醇物的浓度[J]. 复旦学报(医学版), 2014, 41(5): 679–684.
YANG T, SHEN J. High performance liquid phase (HPLC) fluorescence method for simultaneous determination of the concentrations of four thiols in human plasma [J]. J Fudan Univ (Med Ed), 2014, 41(5): 679–684.
- [18] 何俊, 丁敏, 张晓清, 等. 高效液相色谱法同时测定血浆同型半胱氨酸及其相关硫醇物浓度方法的建立[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(3): 203–206.
HE J, DING M, ZHANG XQ, *et al.* Establishment of simultaneous determination of plasma homocysteine and its related thiols by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Lab Med, 2006, 29(3): 203–206.
- [19] HAN J, LI G, WANG X, *et al.* Determination of homocysteine in dried blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2016, 34(6): 567–571.
- [20] 杨华荣, 白建红, 黄石公. 血液同型半胱氨酸的测定方法及临床意义[J]. 家庭医药, 2017, (5): 98–99.
YANG HR, BAI JH, HUANG SG. Determination of blood homocysteine and its clinical significance [J]. Family Med, 2017, (5): 98–99.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



哈米旦木·艾合买提江, 硕士, 主要研究方向为现代药物分析技术及体内药分的研究。

E-mail: 2729349066@qq.com



李新霞, 博士, 教授, 主要研究方向为药物分析及体内药分的研究。

E-mail: lxx6668@163.com



王 艳, 博士, 副教授, 主要研究方向为天然产物研究。

E-mail: wangyan_1060@163.com