

基于 UFLC-IT-TOF-MS 技术的牡荆子中 2 个木脂素在大鼠体内代谢研究

李月婷, 孙 晶, 霍会霞, 庞道然, 孙 慧, 张云封, 宋月林, 屠鹏飞, 赵云芳*, 李 军*
北京中医药大学中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029

摘要: 目的 对牡荆子中 2 个木脂素单体化合物 6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萘醛 (VB-1) 和 vitedoin A (VB-2) 在大鼠体内的代谢情况进行研究。方法 采用超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱 (UFLC-IT-TOF-MS) 技术, 鉴定大鼠分别 ig 给予 2 个木脂素单体化合物后, 粪便、尿液、胆汁、血浆中的代谢产物。结果 发现并确证了 2 个木脂素原型及其 11 个代谢产物在大鼠体内的存在。通过代谢产物鉴定分析了其主要代谢途径, 发现在大鼠体内这 2 个木脂素成分发生了葡萄糖醛酸化、硫酸化、羟化、羟化硫酸化、还原葡萄糖醛酸化和还原硫酸化等代谢反应。结论 通过对 2 个木脂素单体化合物代谢产物的分析, 基本阐明了其在体内的代谢过程, 为进一步的药理活性及其机制研究提供了依据。

关键词: 牡荆子; UFLC-MS-IT-TOF; 木脂素; 代谢产物; 6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萘醛; vitedoin A

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)24-5117-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.24.010

Characterization of metabolites in rats after gavage of two lignans from fruits of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* by UFLC-IT-TOF-MS

LI Yue-ting, SUN Jing, HUO Hui-xia, PANG Dao-ran, SUN Hui, ZHANG Yun-feng, SONG Yue-lin,
TU Peng-fei, ZHAO Yun-fang, LI Jun

Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate *in vivo* metabolic profiles of two lignans, 6-hydroxy-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxymethyl-7-methoxy-3,4-dihydro-2-naphthaldehyde (VB-1) and vitedoin A (VB-2) in the rats. **Methods** A UFLC-IT-TOF-MS method was applied to characterize the prototypes and metabolites of VB-1 and VB-2 in rat feces, urine, bile, and plasma after oral administration. **Results** Eleven metabolites of the two parent compounds were detected and two prototypes were identified unambiguously by comparing with references. Analysis of metabolites revealed that glucuronidation, sulfation, and hydroxylation were major biotransformation pathways of two lignans. **Conclusion** In this study, under the analysis of metabolites of two lignans, its *in vivo* metabolic process is basically clarified. The results could be helpful for the further pharmacokinetics and pharmacological evaluations of VB-1 and VB-2.

Key words: fruits of *Vitex negundo* var. *cannabifolia*; UFLC-IT-TOF-MS; lignan; metabolite; 6-hydroxy-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-hydroxy methyl-7-methoxy-3,4-dihydro-2-naphthaldehyde; vitedoin A

牡荆子为马鞭草科牡荆属植物牡荆 *Vitex negundo* L. var. *cannabifolia* (Sieb. et Zucc.) Hand.-Mazz. 的干燥成熟果实, 具有除湿祛痰、止咳平喘、理气止痛的功效, 主要用于咳嗽气喘、胃痛、泄泻、痢疾、疝气痛、脚气肿胀、白带、白浊等^[1-3]。本课

题组前期实验中, 从牡荆子中分离得到 2 个主要的苯代萘型木脂素类单体成分, 6-羟基-4-(4-羟基-3-甲氧基苯基)-3-羟甲基-7-甲氧基-3,4-二氢-2-萘醛 (VB-1) 和 vitedoin A (VB-2)^[4] (图 1)。药理活性研究发现, 这 2 个化合物均具有显著的抗炎^[5]、抗肿

收稿日期: 2017-07-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573572, 81503227)

作者简介: 李月婷 (1991—), 女, 硕士研究生。E-mail: yuetingli1111@163.com

*通信作者 赵云芳 Tel: (010)64286180 E-mail: yunfang.zhao@163.com

李 军 Tel: (010)64286350 E-mail: drlj666@163.com

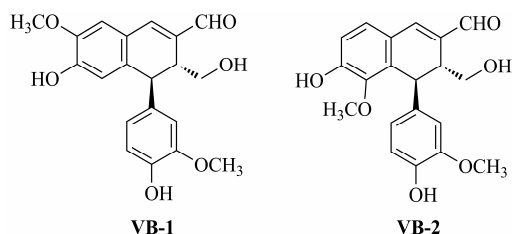


图 1 2 个木脂素化合物的结构

Fig. 1 Structures of two lignans

瘤^[6-9]、抗氧化^[10-12]和镇痛^[13]活性,关于其体内代谢的研究未见报道。本实验旨在研究这 2 个苯代萆型木脂素类成分的体内代谢情况,通过采用超快速液相色谱-离子阱飞行时间质谱(UFLC-IT-TOF-MS)技术对 2 个活性成分的体内代谢研究,初步探讨苯代萆型木脂素的体内代谢过程和代谢规律,为牡荆子中活性成分的体内代谢研究奠定基础,从而进一步指导牡荆子药材的临床合理应用。

1 仪器与材料

岛津 Shimadzu UFLC-IT-TOF-MS 液质联用仪(日本岛津公司)。**VB-1**、**VB-2** 均由本课题组分离得到,结构由 ¹H-NMR、¹³C-NMR 及 MS 确定^[4]。质量分数经 HPLC 面积归一化法测定均大于 98%。

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量(200±10)g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 UFLC-MS 条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH 柱(100 mm×3 mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.1%甲酸水(B),梯度洗脱: 0~15 min, 26%~48% A; 15~20 min, 48%~95% A; 20~25 min, 95% A。柱温 30 °C, 体积流量 0.3 mL/min, 进样体积 5 μL。

ESI 源,正、负离子检测模式,扫描范围 *m/z* 100~1 000,雾化气为高纯氮气,体积流量为 1.5 L/min,干燥气为高纯氮气,压力为 100 MPa,碰撞气为氩气,离子源温度为 200 °C,曲型脱溶剂管和加热块温度 200 °C, CID 能量 50%,检测器电压 1.4 kV,离子阱真空度为 0.019 Pa。质谱操作之前均用调谐液进行调谐以保证预测分子式的准确,质谱设为自动多级 MS¹、MS²、MS³ 全扫描模式,离子累计时间为 100 ms。

2.2 生物样品采集

取 SD 大鼠 26 只,随机分为尿液和粪便组 9 只

(对照组、**VB-1** 和 **VB-2** 组各 3 只),血浆和胆汁组 17 只(对照组 3 只、**VB-1** 和 **VB-2** 组各 7 只),给药前禁食 12 h(自由饮水),按 500 mg/kg 剂量分别 ig 生理盐水(对照组)、**VB-1** 和 **VB-2** 的 0.5%CMC-Na 混悬溶液。收集 24 h 内(每 4 小时收集 1 次)空白组、**VB-1** 和 **VB-2** 组大鼠的尿液和粪便,得到尿液、粪便样品。对对照组大鼠进行胆道插管手术收集空白胆汁,取完对照胆汁后腹主动脉取血于预先涂有 1%肝素钠的离心管中,离心 20 min(4 °C、4 000 r/min),分离上层血浆样品得到空白血浆。另外收集 ig **VB-1** 和 **VB-2** 后 1~2、4~5、8~9、12~13、24~25 h 的大鼠胆汁和血浆,得到胆汁、血浆样品。以上生物样品于-20 °C 保存。

2.3 大鼠生物样品供试液的制备

2.3.1 粪便 精密称定干燥粪便的质量后,加入 10 倍量 50%甲醇室温下浸泡 2 h,超声提取 30 min,分别取各时间段粪便提取液 100 μL,涡旋混合,离心 10 min(4 °C, 12 000 r/min),取上清液作为粪便样品供试液。

2.3.2 尿液 分别取各时间段尿液 100 μL 混合,充分涡旋后,离心 10 min(4 °C, 12 000 r/min),取上清液于活化后的 Oasis[®] HLB 固相萃取小柱,先以 2 mL 5%甲醇分 2 次洗脱,弃去,再以 2 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,于 37 °C 氮气吹干,以 100 μL 50%乙腈复溶,涡旋混合,离心 10 min(4 °C、12 000 r/min),取上清液作为尿液样品供试液。

2.3.3 胆汁 分别取各时间点胆汁 100 μL 混合,充分涡旋后,加入 10%盐酸溶液调 pH 值为 2.0,加入醋酸乙酯,每次 1 mL,萃取 3 次,合并有机层,于 37 °C 氮气吹干,以 100 μL 50%乙腈复溶,涡旋混合,离心 10 min(4 °C、12 000 r/min),取上清液作为胆汁样品供试液。

2.3.4 血浆 分别取各时间点血浆 100 μL 混合,充分涡旋后,加入 3 倍量的乙腈沉淀蛋白,涡旋混匀 1 min,离心 10 min(4 °C, 12 000 r/min),取上清液于 37 °C 氮气吹干,以 100 μL 50%乙腈复溶,涡旋混合,离心 10 min(4 °C、12 000 r/min),取上清液作为血浆样品供试液。

2.4 数据分析

根据测得的精确相对分子质量,应用 LC solution Version 1.1 软件(Shimadzu)在规定的误差范围内(±1×10⁻⁵)计算可能的元素组成,并结合各色谱峰的二级、三级质谱碎片信息与文献报道数

据及对照品比对, 对色谱峰进行定性分析。

3 结果

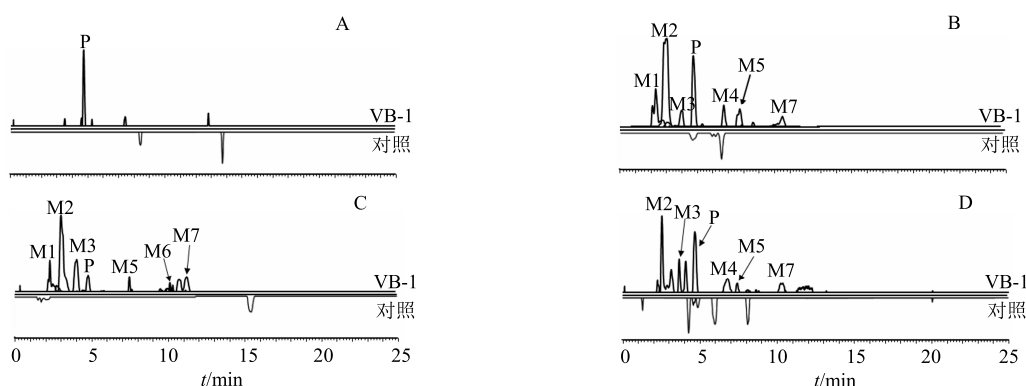
3.1 给药后大鼠粪便、尿液、胆汁、血浆 UFLC-IT-TOF-MS 分析

对照组和给药组大鼠粪便、尿液、胆汁、血浆样品负离子条件下的提取离子流图见图 2 和 3, 在正离子条件下, 给药粪便、尿液、胆汁、血浆未得到较好的响应信号, 因此本实验主要对负离子模式下的代谢产物进行定性分析。

3.2 原型成分的质谱行为分析

化合物 VB-1 和 VB-2 为同分异构体, 二者结构的区别在于其中 1 个甲氧基的连接位置不同, 因此

在质谱中体现相似的裂解规律, 环上的甲氧基、羟甲基容易断裂, 形成相应的碎片离子。VB-1 的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 355.120 6 ($C_{20}H_{19}O_6$), 二级质谱信号 m/z 340.098 3 ($C_{19}H_{16}O_6$) 与分子离子峰 (MS^2 前体离子) 相差 15, 提示为脱去甲基的信号。三级质谱信号中, m/z 325.075 9 ($C_{18}H_{13}O_6$) 为 m/z 340 的碎片离子 (MS^3 前体离子) 脱去 1 个甲基所得, m/z 295.062 8 ($C_{17}H_{11}O_5$) 较 m/z 325 少 30, 为脱去 1 个羟甲基的碎片离子; m/z 340 的碎片离子脱去 1 个羟甲基得 m/z 309.078 2 ($C_{18}H_{14}O_5$) (图 4)。VB-2 分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 355.120 2 ($C_{20}H_{19}O_6$), 二级质谱信号 m/z 340.095 2 ($C_{19}H_{16}O_6$)

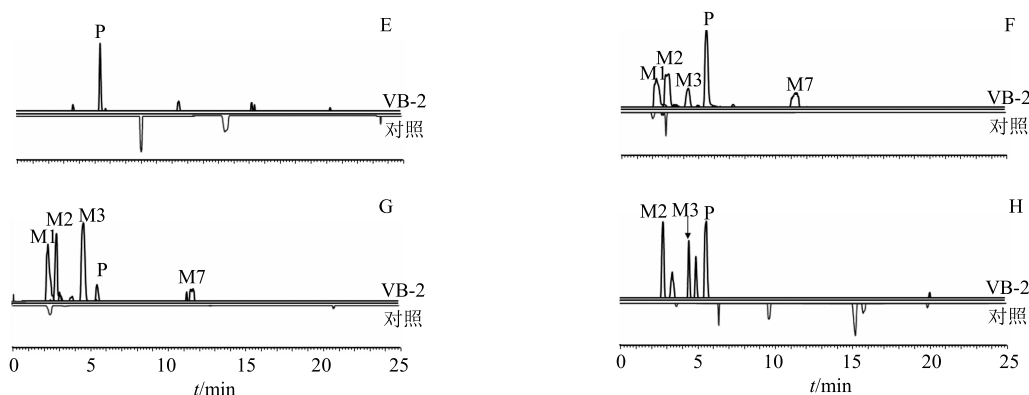


A-粪便样品 B-尿液样品 C-胆汁样品 D-血浆样品 M1-还原葡萄糖醛酸化 M2-葡萄糖醛酸化 M3-羟基化 P-原型成分 M4-羟化硫酸化 M5-还原硫酸化 M6-氧化 M7-硫酸化, 图 3 同

A-stool sample B-urine sample C-bile sample D-plasma sample M1-reduced glucuronidation M2-glucuronidation M3-hydroxylation P-original composition M4-hydroxylation sulfated M5-reductive sulfation M6-oxidation M7-sulfated, same as Fig. 3

图 2 对照组和 ig 给予 VB-1 后大鼠各生物样品负离子模式提取离子流图 (镜像图)

Fig. 2 EIC chromatograms of blank and rat biosamples after intragastric administration of VB-1 in the negative mode (mirror image)



E-粪便样品 F-尿液样品 G-胆汁样品 H-血浆样品

E-stool sample F-urine sample G-bile sample H-plasma sample

图 3 对照组和 ig 给予 VB-2 后大鼠各生物样品负离子模式提取离子流图 (镜像图)

Fig. 3 EIC chromatograms of blank and rat biosamples after intragastric administration of VB-2 in the negative mode (mirror image)

与分子离子峰 (MS^2 前体离子) 相差 15, 提示为脱去甲基的信号。三级质谱信号中, m/z 340 (MS^3 前体离子) 到 m/z 309.077 4 ($C_{18}H_{14}O_5$) 为脱去 1 个

羟甲基的碎片离子信号, m/z 187.043 3 ($C_{11}H_7O_3$) 较 m/z 295 又少了 108, 为在此基础上 C 环断裂得到 (图 5)。

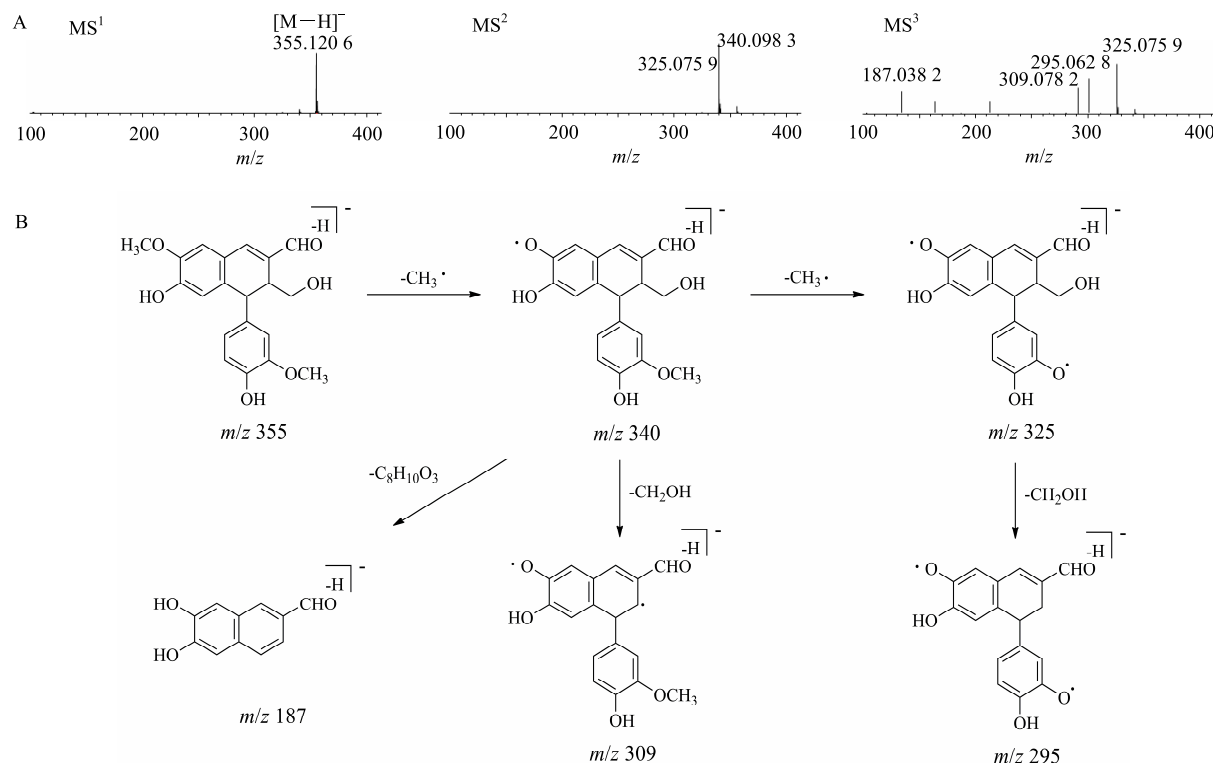


图 4 VB-1 的三级质谱图 (A) 和质谱裂解途径 (B)

Fig. 4 Tandem mass spectra (MS^1 , MS^2 , MS^3) under negative ionization mode (A) and proposed mass fragmentation pathways (B) of VB-1

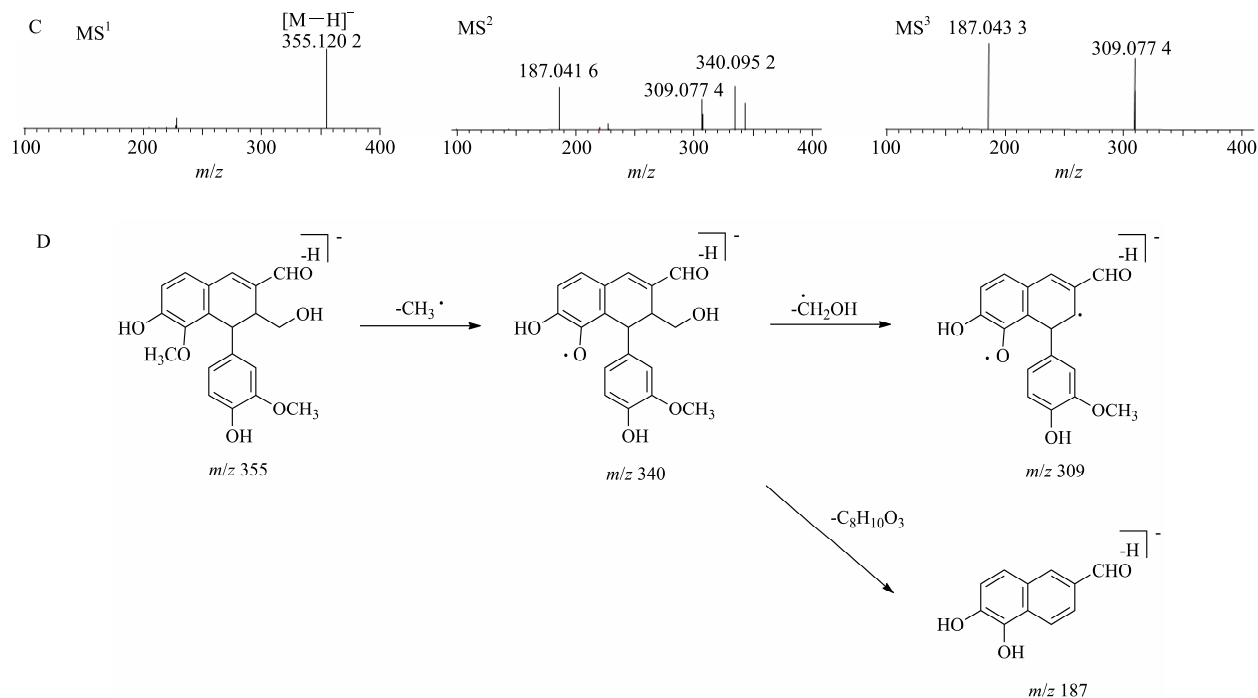


图 5 VB-2 的三级质谱图 (C) 和质谱裂解途径 (D)

Fig. 5 Tandem mass spectra (MS^1 , MS^2 , MS^3) under negative ionization mode (C) and proposed mass fragmentation pathways (D) of VB-2

3.3 代谢产物的结构推测

VB-1 的 6-OH 或 4'-OH 易与葡萄糖醛酸或硫酸结合, 代谢产物 **M2** 的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 531.157 0 ($C_{26}H_{28}O_{12}$) 和 **M7** 的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 435.078 5 ($C_{20}H_{19}O_9S$), 分别较 **VB-1** 多出 176 和 80, 这 2 个信号在质谱中表现出葡萄糖醛酸和硫酸的特征中性丢失。同时在二级质谱中出现了 **VB-1** 的分子离子峰碎片, 在三级质谱中出现了 **VB-1** 的特征碎片信号, 例如, m/z 340.095 5 和 m/z 340.140 5 ($C_{19}H_{16}O_6$) 分别为 $[M2-H-GluA-CH_3]^-$ 和 $[M7-H-SO_3-CH_3]^-$ 的碎片离子。**VB-1** 结构中的醛基易被还原为羟甲基^[6], 在此基础上发生硫酸或葡萄糖醛酸结合反应, 分别得到代谢物 **M1** 和 **M5**。**VB-1** 还可发生羟化反应, 经 MS^2 分析, **M3** 存在 m/z 353.105 4 ($C_{20}H_{17}O_6$) 和 m/z 340.101 5 ($C_{19}H_{16}O_6$) 碎片离子峰, 分别为 $[M3-H-H_2O]^-$ 和 $[M3-H-O-CH_3]^-$ 的碎片离子 (图 6 和表 1)。化合物发生羟基化或者葡萄糖醛酸化等反应后, 分子极性增大, 保留时间前移, 如代谢物 **M1**、**M2** 和 **M3** 保留时间分别为 2.1、2.6 和 3.8 min, 均小于原

型化合物的保留时间, 从侧面佐证了代谢物的结构。由于结合代谢物加入的基团不稳定, 在母核裂解之前已经发生断裂。因此, 无法准确判断结合代谢物加入基团的连接位置。

同样, **VB-2** 的 6-OH 或 4'-OH 也易与葡萄糖醛酸或硫酸结合, 代谢产物 **M2** 的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 531.154 9 ($C_{26}H_{28}O_{12}$), **M7** 的分子离子峰 $[M-H]^-$ 为 m/z 435.078 5 ($C_{20}H_{19}O_9S$), 分别较 **VB-2** 多出 176 和 80, 这 2 个信号在质谱中也表现出葡萄糖醛酸和硫酸的特征中性丢失。同时在二级质谱中出现了 **VB-2** 的分子离子峰碎片, 在三级质谱中出现了 **VB-2** 的特征碎片信号, m/z 340.095 7 和 m/z 340.095 0 ($C_{19}H_{16}O_6$) 分别为 $[M2-H-GluA-CH_3]^-$ 和 $[M7-H-SO_3-CH_3]^-$ 的碎片离子。**VB-2** 还可发生羟化反应, 经 MS^2 分析, **M3** 存在 m/z 353.101 1 ($C_{20}H_{17}O_6$) 和 m/z 340.078 8 ($C_{19}H_{16}O_6$) 碎片峰, 分别为 $[M3-H-H_2O]^-$ 和 $[M3-H-O-CH_3]^-$ 的碎片离子。**VB-2** 结构中的醛基易被还原为羟甲基, 在此基础上发生葡萄糖醛酸结合反应, 得到代谢物 **M1** (图 7 和表 2)。

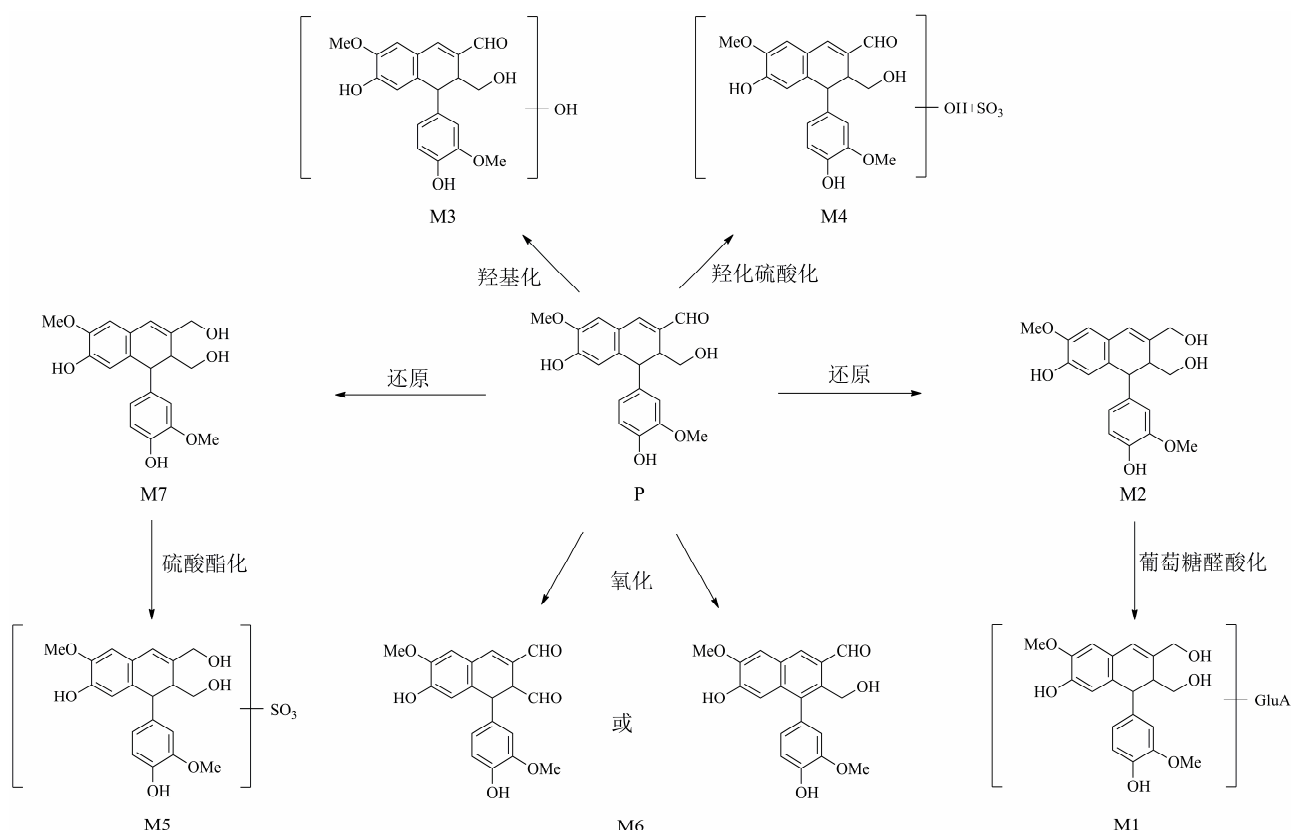


图 6 **VB-1** 可能的代谢途径

Fig. 6 Possible metabolic pathway of **VB-1**

表 1 大鼠 ig VB-1 负离子模式下生物样品中代谢物鉴定

Table 1 MSⁿ data of prototype and metabolites of VB-1 in negative mode

编号	<i>t_R</i> /min	分子式	相对分子质量		误差 ($\times 10^{-5}$)	MS ²	MS ³	代谢 类型	样品来源 (峰面积)
			实测值	计算值					
M1	2.125	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	533.164 7	533.166 5	-3.38	357.122 3	342.102 2	R+G	尿液 (6 427 185)、 胆汁 (9 935 023)
M2	2.622	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	531.155 8	531.150 8	9.41	355.119 9	340.095 5, 325.077 1, 231.064 5	G	尿液 (44 051 520)、 胆汁 (40 810 814)、 血浆 (15 280 083)
M3	3.872	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	371.117 0	371.113 6	9.16	353.105 4*, 340.101 5	327.125 0, 310.117 9, 294.092 6	OH	尿液 (2 367 545)、 胆汁 (21 665 917)、 血浆 (6 024 676)
P	4.443	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	355.120 6	355.118 7	5.35	340.098 3	325.075 9, 310.078 2, 295.062 8	P	粪便 (6 753 789)、 尿液 (37 598 183)、 胆汁 (7 451 923)、 血浆 (10 796 627)
M4	6.450	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₀ S	451.069 4	451.070 4	-2.22	371.120 2, 353.097 7	—	OH+S	尿液 (3 564 788)、 血浆 (5 700 062)
M5	7.377	C ₂₀ H ₂₂ O ₉ S	437.094 3	437.091 2	7.09	340.124 1, 310.113 9*	295.090 9	R+S	尿液 (4 302 789)、 胆汁 (3 590 283)、 血浆 (1 907 893)
M6	10.208	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	353.106 4	353.103 1	9.35	338.079 7	323.053 1	O	胆汁 (3 035 023)
M7	10.675	C ₂₀ H ₂₀ O ₉ S	435.078 5	435.075 5	6.90	355.121 8	340.104 0	S	尿液 (2 153 036)、 胆汁 (5 451 923)、 血浆 (8 673 599)

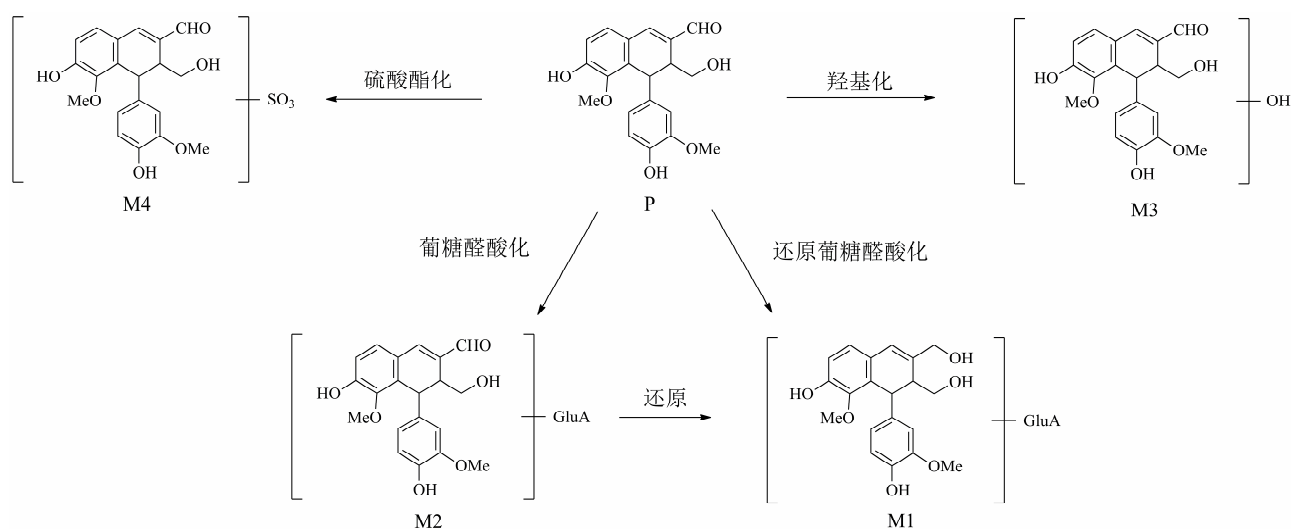
*MS³ 的前体离子 G-葡萄糖醛酸化 OH-羟基化 O-氧化 P-原型 R-还原 S-硫酸化, 表 2 同*precursor ions of MS³ G-glucuronidation OH-hydroxylation O-oxidation P-original composition R-reduction S-sulfated, same as Table 2

图 7 VB-2 可能的代谢途径

Fig. 7 Possible metabolic pathway of VB-2

表 2 大鼠 ig VB-2 负离子模式下生物样品中代谢物鉴定
Table 2 MSⁿ data of prototype and metabolites of VB-2 in negative mode

编号	<i>t_R</i> /min	分子式	相对分子质量		误差 (×10 ⁻⁵)	MS ²	MS ³	代谢 类型	样品来源 (峰面积)
			实测值	计算值					
M1	2.103	C ₂₆ H ₃₀ O ₁₂	533.171 1	533.166 5	8.63	357.133 6	—	R+G	尿液 (29 272 926)、 胆汁 (15 848 101)
M2	2.843	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₂	531.154 9	531.150 8	7.72	355.120 3	340.095 7, 309.076 8, 187.044 5	G	尿液 (29 415 050)、 胆汁 (17 283 588)、 血浆 (5 860 152)
M3	4.305	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	371.115 3	371.113 6	4.58	353.101 1, 340.078 8, 327.102 7*	312.091 2, 281.342 9	OH	尿液 (15 946 464)、 胆汁 (27 476 581)、 血浆 (4 699 780)
P	5.285	C ₂₀ H ₂₀ O ₆	355.120 2	355.118 7	4.22	340.095 2	309.077 4, 187.043 3	P	粪便 (7 986 944)、 尿液 (84 877 365)、 胆汁 (7 689 644)、 血浆 (5 082 269)
M7	11.935	C ₂₀ H ₂₀ O ₉ S	435.078 5	435.075 5	6.90	355.119 7	340.095 0	S	尿液 (17 897 643)、 胆汁 (6 938 915)

4 讨论

药物经吸收进入体内，主要在肝脏经代谢而失去活性，形成水溶性代谢物而排出体外，体内代谢分为 I 相代谢（氧化、还原、羟基化等反应）和 II 相代谢（结合反应）。I 相代谢使多数药物灭活，但也有少数反而被激活；II 相代谢使药物活性降低或灭活并使极性增加。不同物质的代谢过程有所不同，有的只经一步代谢，有的不经代谢直接自肾排出，有的经多步代谢并生成多个代谢产物。

通过对代谢产物分析发现，VB-1 在大鼠体内发生了氧化、羟化（I 相代谢），葡萄糖醛酸化、硫酸化（II 相代谢），以及羟化硫酸化、还原葡萄糖醛酸化、还原硫酸化（I 相、II 相代谢结合）等代谢反应。各生物样品中代谢产物不同，推测血浆中以葡萄糖醛酸酯、原型及羟基化产物为主，胆汁中以葡萄糖醛酸酯及羟基化产物为主，尿液中以葡萄糖醛酸酯及原型为主，粪便中以原型为主。VB-2 为 VB-1 的同分异构体，VB-2 在体内同样发生了氧化和羟化（I 相代谢）、葡萄糖醛酸化和硫酸化（II 相代谢）、还原葡萄糖醛酸化反应（I 相、II 相代谢结合）。

从代谢产物的保留时间看，VB-1 和 VB-2 的还原葡萄糖醛酸化产物和葡萄糖醛酸化产物的保留时间基本一致，而其他代谢产物和原型化合物则存在差异。因此推测 VB-1 或 VB-2 在体内可能会部分发生异构化变为其异构体后发生代谢反应，其具体机制仍需进一步研究。另外，在 VB-2

的代谢产物中没有检测到羟基硫酸化、还原硫酸化和氧化代谢产物，说明这对异构体在体内代谢途径不完全一致。

参考文献

- [1] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草 (第 6 卷) [M]. 上海: 科学技术出版社, 1999.
- [2] Li Y T, Li M M, Sun J, *et al.* Furofuran lignan glucosides from the leaves of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* [J]. *Nat Prod Res*, 2017, 31(8): 918-924.
- [3] Li M M, Su X Q, Sun J, *et al.* Anti-inflammatory ursane-and oleanane-type triterpenoids from *Vitex negundo* var. *cannabifolia* [J]. *J Nat Prod*, 2014, 77(10): 2248-2254.
- [4] 李月婷, 庞道然, 朱枝祥, 等. 牡荆子的化学成分与生物活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(22): 4197-4203.
- [5] Zheng C J, Huang B K, Han T, *et al.* Nitric oxide scavenging lignans from *Vitex negundo* seeds [J]. *J Nat Prod*, 2009, 72(9): 1627-1630.
- [6] Zhou Y J, Liu Y E, Cao J G, *et al.* Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(16): 5161-5169.
- [7] Wang J G, Zheng X X, Zeng G Y, *et al.* Purified vitexin compound 1 inhibits growth and angiogenesis through activation of FOXO3a by inactivation of Akt in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(2): 441-448.
- [8] Liu L H, Zhou Y J, Ding L, *et al.* Induction of apoptosis

- by VB1 in breast cancer cells: The role of reactive oxygen species and Bcl-2 family proteins [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(2): 423-430.
- [9] Xin H, Kong Y, Wang Y, *et al.* Lignans extracted from *Vitex negundo* possess cytotoxic activity by G2/M phase cell cycle arrest and apoptosis induction [J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(7): 640-647.
- [10] Lou Z H, Li H M, Gao L H, *et al.* Antioxidant lignans from the seeds of *Vitex negundo* var. *cannabifolia* [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2014, 16(9): 963-969.
- [11] Yang Z B, Tan B, Li T B, *et al.* Protective effect of vitexin compound B-1 against hypoxia/reoxygenation-induced injury in differentiated PC12 cells via NADPH oxidase inhibition [J]. *N-S Arch Pharmacol*, 2014, 387(9): 861-871.
- [12] Hu P, Li D H, Hu X, *et al.* Lignans and triterpenoids from *Vitex negundo* var. *heterophylla* and their biological evaluation [J]. *Fitoterapia*, 2016, 111: 147-153.
- [13] Zheng C J, Tang W Z, Huang B K, *et al.* Bioactivity-guided fractionation for analgesic properties and constituents of *Vitex negundo* L. seeds [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(6/7): 560-567.