

基于“入血成分-复方功效-靶点通路”的四妙勇安汤潜在质量标志物研究

周靖惟¹, 张星^{1#}, 李莎¹, 朱芮¹, 吴秋红¹, 黄友¹, 杨莎莎¹, 林夏¹, 郝怡雯¹, 傅超美^{1*}, 张臻^{1,2*}

1. 成都中医药大学药学院, 西南特色中药资源国家重点实验室, 四川 成都 611137

2. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 中药配方颗粒质量与疗效评价重点实验室, 四川 彭州 610031

摘要: 目的 结合血清药物化学和网络药理学, 预测四妙勇安汤的潜在质量标志物 (quality marker, Q-Marker), 并在此结果基础上开展动物实验加以验证。方法 采用 HPLC-Q-TOF/MS 技术分析四妙勇安汤的入血成分, 基于入血成分结合网络药理学预测主要作用靶点、通路, 使用 Cytoscape 软件, 构建“入血成分-复方功效-靶点通路”网络, 依据拓扑学分析结果与四妙勇安汤主治热毒炽盛之脱疽的相关性, 综合确定四妙勇安汤的潜在 Q-Marker。在此基础上建立热毒炽盛之脱疽模型大鼠, 造模成功后连续 ig 四妙勇安汤 (57 g/kg) 2 周, 实验结束后计算各组大鼠创面愈合率, 检测各组血清中丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 水平, 并采用免疫组化法检测创面组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 蛋白表达。结果 鉴定四妙勇安汤 20 个入血成分, 结合网络药理学筛选出四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的 42 个关键功效靶点、62 条相关通路, 根据化合物、靶点以及信号通路之间的度值, 初步预测木犀草素、异鼠李素、甘草素等 9 个功效相关的潜在入血成分并结合绿原酸等主要有效成分作为四妙勇安汤潜在的 Q-Marker。动物实验结果表明, 给予四妙勇安汤后可明显提高热毒炽盛之脱疽大鼠的创面愈合率 ($P < 0.05$), 显著回调血清中关键功效靶点 (VEGF、MAPK、IFN- γ) 水平 ($P < 0.05$), 明显降低创面组织中 TNF 信号通路相关蛋白 TNF- α 、IL-1 β 的表达 ($P < 0.05$)。结论 通过血清药物化学结合网络药理学挖掘预测四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的潜在 Q-Marker, 为整体控制和评价四妙勇安汤质量提供科学依据。动物实验初步证实了四妙勇安汤可通过调控 VEGF、MAPK 和 IFN- γ 等关键功效靶点蛋白以及 TNF 信号通路相关蛋白, 进而发挥治疗热毒炽盛之脱疽的作用。

关键词: 四妙勇安汤; 质量标志物; 血清药物化学; 网络药理学; 热毒炽盛之脱疽; 木犀草素; 异鼠李素; 甘草素; 绿原酸
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)24-7795-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.24.017

Potential Q-Markers of Simiao Yong'an Decoction based on “component absorbed into blood-efficacy of compound prescription-target pathway”

ZHOU Jing-wei¹, ZHANG Xing¹, LI Sha¹, ZHU Rui¹, WU Qiu-hong¹, HUANG You¹, YANG Sha-sha¹, LIN Xia¹, HAO Yi-wen¹, FU Chao-mei¹, ZHANG Zhen^{1,2}

1. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. Key Laboratory of Quality Control and Efficacy Evaluation of Traditional Chinese Medicine Formula Granules, Sichuan New Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Pengzhou 610031, China

Abstract: Objective To predict the potential quality marker (Q-Marker) of Simiao Yong'an Decoction (四妙勇安汤) by combining serum medicinal chemistry and network pharmacology, and based on these results, animal experiments were carried out to verify it.

收稿日期: 2022-08-06

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81803742); 四川省科技计划重点研发项目 (2020YFS0567); 四川省科技厅四川省科技计划项目 (2021YJ0251); 四川省中医药管理局中医药科研专项 (2021MS109); 四川省教育厅自然科学基金重点项目 (18ZA0187); 成都中医药大学杏林学者青年学者专项 (QNXX2019031); 四川新绿色药业博士后科研专项 (301022019)

作者简介: 周靖惟, 男, 研究方向为中药新制剂和新剂型。E-mail: 1026990524@qq.com

*通信作者: 傅超美, 男, 教授, 主要从事中药新制剂和新剂型研究。E-mail: chaomeifu@126.com

张臻, 女, 副教授, 主要从事中药制剂新技术新剂型、中药复方功效与作用机制研究。E-mail: zhangzhendr@126.com

#共同第一作者: 张星, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药新制剂和新剂型。E-mail: 2381225006@qq.com

Methods HPLC-Q-TOF/MS was used to analyze the blood components of Simiao Yong'an Decoction. Based on the combination of components absorbed into blood and network pharmacology, main targets and pathways were predicted. Cytoscape software was used to construct "component absorbed into blood-efficacy of compound prescription-target pathway" network. Based on the correlation between the topological analysis results and traditional efficacy of Simiao Yong'an Decoction, potential Q-Markers of Simiao Yong'an Decoction were comprehensively determined. On this basis, rats model of gangrene due to excessive noxious heat was established. After successful modeling, rats were continuously ig Simiao Yong'an Decoction (57 g/kg) for 2 weeks. After the experiment, wound healing rate of rats in each group was calculated, levels of mitogen-activated protein kinase (MAPK), interferon- γ (IFN- γ) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in serum of each group were detected, protein expressions of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in wound tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** Twenty components absorbed into blood of Simiao Yong'an Decoction were identified. Combined with network pharmacology, 42 key efficacy targets and 62 related pathways of Simiao Yong'an Decoction in treatment of gangrene due to excessive noxious heat were screened out. According to degree value between compounds, targets and signaling pathways, nine potential blood components related to efficacy such as luteolin, isorhamnetin, and liquiritigenin were preliminarily predicted, and combined with the main active components such as chlorogenic acid as Simiao Yong'an Decoction potential Q-Markers. The results of animal experiments showed that Simiao Yong'an Decoction significantly increased the wound healing rate of gangrene due to excessive noxious heat rats ($P < 0.05$), significantly modulated the levels of key efficacy targets (VEGF, MAPK, IFN- γ) in serum ($P < 0.05$), and significantly reduced TNF signaling pathway related protein (TNF- α , IL-1 β) expressions in wounded tissues ($P < 0.05$). **Conclusion** The potential Q-Marker of Simiao Yong'an Decoction in treating gangrene due to excessive noxious heat was predicted by combining serum pharmacology with network pharmacology, which provided scientific basis for overall control and evaluation of Simiao Yong'an Decoction quality. Animal experiments preliminarily confirmed that Simiao Yong'an Decoction can regulate key functional target proteins such as VEGF, MAPK and IFN- γ , as well as proteins related to TNF signaling pathway, thereby play a role in treating gangrene due to excessive noxious heat.

Key words: Simiao Yong'an Decoction; quality marker; serum pharmacology; network pharmacology; gangrene due to excessive noxious heat; luteolin; isorhamnetin; liquiritigenin; chlorogenic acid

君臣佐使的遣方配伍是中医临床用药的主要形式,经典名方是君臣佐使配伍的重要载体,也是历代医家从大量临床实践中形成的中医药精华^[1],国家相关主管部门先后出台了一系列政策与技术指导原则鼓励开展研制经典名方,但其中仍有众多关键问题亟待解决,以临床功效为导向进行中药的创新研发和质量标准研究一直是业内专家学者的共识^[2-3],特别是经典名方源于临床,用于临床,其核心生命力在于临床疗效,如何在经典名方的研发与质量控制及评价过程体现经方的临床功效特色,是目前研究的重点与难点。质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 概念在研究中药功效特色标示性物质方面,以“特有性、有效性、传递与溯源、可测性、配伍环境”五原则为核心,将中药有效性-物质基础-质量控制标志性成分进一步关联^[4-5],为中药新药研发及质量控制提供了指导方向^[6-7]。同时,大多数中药及复方采用传统的口服给药的方式,而其中的有效成分多经吸收入血后发挥疗效^[8],因此,有学者提出“中药血清药物化学”的概念,以经典的药物化学研究手段和方法为基础,分析鉴定或表征口服中药后人或动物血清中移行成分,目前已成为快速、准确

研究中药功效相关物质基础的有效途径。与此同时,网络药理学作为一种辅助分析方法,可从“药物-疾病-靶点”全方位解析方剂成分-功效的关联,也被逐步引入到中药 Q-Marker 研究中。

四妙勇安汤作为《古代经典名方目录(第一批)》中公布的 100 首经典名方之一,始载于汉代《华佗神医秘传》^[9],全方由金银花、玄参、当归、甘草 4 味药物组成,具有清热解毒、活血止痛之功效,主治热毒炽盛之脱疽,现代临床常用其治疗糖尿病及其并发症(糖尿病足溃疡、糖尿病大血管病变)和血栓闭塞性脉管炎等疾病^[10]。目前对四妙勇安汤研究多集中在药效评价以及化学成分的鉴别分析^[9,11-14],缺乏与临床功效关联的 Q-Marker 相关研究,难以反映中药治疗疾病的本质特征,不利于建立专属性、针对性的质量评价方法和质量标准,一定程度上限制了其临床疗效的保障及产品质量的提升。因此,本研究采用血清药物化学的方法分析鉴定四妙勇安汤入血成分,筛选得到其潜在的药效物质基础,再利用网络药理学^[15]构建“中药入血成分-核心功效靶点-重要作用通路”网络,分析经典名方四妙勇安汤发挥临床疗效的 Q-Marker,在此结果基础上开展相应

的动物验证实验, 中医学认为糖尿病足溃疡属“脱疽”“坏疽”等范畴^[6], 因此采用 ip 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 和剪切创面的方法建立热毒炽盛之脱疽模型, 对前期网络药理学结果中得到的关键功效靶点及相关蛋白表达进行检测, 进一步验证四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的对应靶点及通路, 为四妙勇安汤经方研制、质量控制和评价提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只, 体质量 (200±20) g, 购自成都恩斯维尔生物科技有限公司, 动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。动物于成都中医药大学实验动物中心动物房内饲养, 室温 20~25 °C, 相对湿度 65%~69%。动物实验遵循成都中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

1.2 药材

甘草 (批号 2112087)、当归 (批号 2112065)、玄参 (批号 2111040)、金银花 (批号 2110098) 均购自四川新荷花中药饮片股份有限公司, 经成都中医药大学裴瑾教授鉴定分别为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根及根茎、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根、忍冬科植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花。

1.3 药品与试剂

对照品马钱苷 (批号 RFS-M01001910018)、绿原酸 (批号 RFS-L00701908029)、木犀草素 (批号 RFS-M00702004028)、阿魏酸 (批号 RFS-A00211812016)、β-谷甾醇 (批号 RFS-G00202005008)、哈巴昔 (批号 RFS-H02101908013) 购自成都瑞芬思生物科技有限公司, 质量分数均 ≥ 98%; 色谱纯乙腈、甲醇购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 色谱纯甲酸购自成都市科隆化学品有限公司; 超纯水购自广州屈臣氏食品饮料有限公司; 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) ELISA 试剂盒 (批号 BM220602)、γ 干扰素 (interferon-γ, IFN-γ) ELISA 试剂盒 (批号 BM220602)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) ELISA 试剂盒 (批号 BM220602) 均购自合肥博美生物技术有限公司; 肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)

抗体 (批号 ab220210) 购自艾博抗 (上海) 贸易有限公司; 白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β) 抗体 (批号 GB11113) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.4 仪器

Synapt XS 高分辨质谱仪、Acquity 超高效液相色谱 (美国 Waters 公司); Spectra Max i3x 酶标仪 [美谷分子仪 (上海) 有限公司]; HTP-312 型电子天平 (上海花潮电器有限公司); HR/T20M 型离心机 (湖南赫西仪器装备有限公司); 正置光学显微镜 (日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 四妙勇安汤血清药物化学研究

2.1.1 四妙勇安汤的制备 按原方比例 (3:3:2:1) 分别称取金银花、玄参、当归、甘草饮片共 270 g, 加入 20 倍蒸馏水, 于陶瓷锅中浸泡 60 min, 武火加热至沸腾, 文火保持微沸继续煎煮 60 min, 趁热滤过, 60 °C 减压浓缩至 200 mL, 经测定含绿原酸 16.468 3 mg/g、阿魏酸 1.112 4 mg/g、异绿原酸 C 4.927 5 mg/g、安格洛昔 C 3.235 5 mg/g、哈巴俄昔 1.987 0 mg/g 和甘草酸 11.679 5 mg/g。

2.1.2 混合对照品溶液的制备 取马钱苷、绿原酸、木犀草素、阿魏酸、β-谷甾醇、哈巴昔对照品适量, 精密称定, 加甲醇制成质量浓度分别为 0.11、0.12、0.11、0.13、0.11、0.12 mg/mL 的对照品溶液。取上述 6 种对照品溶液各 0.5 mL, 置于 5 mL 量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 得混合对照品溶液。

2.1.3 血清样品制备 12 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组和四妙勇安汤 (32 g/kg) 组。根据文献报道^[17]与预实验结果, 将“2.1.1”项下制备的四妙勇安汤浓缩为 3.2 g/mL (以生药量计) 的 ig 溶液, 大鼠连续 3 d 给药, 对照组 ig 等体积蒸馏水。末次给药后 60 min, 大鼠 ip 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 室温静置 1 h 后, 4 °C、4000 r/min 离心 20 min, 取上清液。分别取对照组和四妙勇安汤组血清 2 mL, 加入 5 倍量甲醇, 涡旋振荡 10 min, 20 000 r/min 离心 20 min, 取上清液氮气吹干, 加入 200 μL 50% 甲醇复溶, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, LC-MS/MS 进样分析。

2.1.4 色谱条件 Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~1 min, 2% B; 1~11 min, 2%~25% B; 11~18 min, 25%~60%

B; 18~23 min, 60%~90% B; 23~26 min, 90% B; 26~27 min, 90%~2% B; 27~30 min, 2% B。体积流量 0.1 mL/min; 柱温 25 °C; 进样量 10 μ L。

2.1.5 质谱条件 电喷雾离子源, 分别在正、负离子条件下扫描, 扫描范围 m/z 0~1200, 扫描时间 0.3 s, 检测时间 30 min。低能量碰撞电压 15 eV, 高能量碰撞电压为 35 eV; 正、负离子模式的毛细管电压分别为 2.0 kV、-2.5 kV; 锥孔电压 40 V; 离子源温度 150 °C; 辅助喷雾电离与去溶剂气体为高纯度 N_2 ; 去溶剂化温度 450 °C; 锥孔气体体积流量 50 L/h; 去溶剂化气体体积流量 800 L/h。

2.1.6 数据分析方法 采用 MassLynx 4.1 软件提取质谱数据。通过 ChemSpider 在线数据库对四妙勇安汤中的化合物进行检索, 建立包括中英文名称、分子式、精确相对分子质量以及特征碎片等信息的四妙勇安汤潜在化学成分数据库; 采用 UNIFITM 数据处理系统对四妙勇安汤入血成分质谱数据进行处理, 依据相对分子质量偏差以及二级质谱裂解规律, 确定各色谱峰对应化合物的分子式, 在已建立的四妙勇安汤化学成分数据库中检索确证匹配的化合物; 进一步综合对照品信息及相关文献报道, 对化合物进行分析鉴定。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 成分靶点预测 将分析得到的四妙勇安汤入血成分通过 PubChem 数据库及 Chem Bio Draw 软件获得入血成分的化学结构, 之后通过 SwissTargetPrediction 平台及 TCMSP 数据进行入血成分靶点蛋白预测, 再通过 UniProt 数据库将得到的靶点蛋白进行名称规范。

2.2.2 潜在靶点获取 在 Gene Cards 和 OMIM 数据库搜寻热毒炽盛之脱疽相关靶点 (如血栓闭塞性脉管炎: thromboangitis obliterans、buerger disease、buerger's disease; 肢体动脉硬化闭塞症: arteriosclerosis obliterans; 坏疽: gangrene; 糖尿病: diabetes、diabetes mellitus 等), 获得疾病相关靶点^[18]; 之后与四妙勇安汤的入血成分药物靶点进行交集, 获得四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的潜在靶点。

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析 将潜在靶点导入 String 数据库, 限定物种为人, 为确保数据的可靠性, 选择 0.9 的高置信度, 保存结果。将结果中的节点 1、节点 2 和 combined score 信息导入 Cytoscape 3.7.0 软件构建 PPI 网络, 对其网络进行分析, 筛选关键

功效靶点, 并将节点大小和颜色设置用于反映度值的大小。

2.2.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将关键功效靶点导入 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), identifier 设置为 official gene symbol, list type 设置为 gene list, 物种设置为人, 进行 GO 功能和 KEGG 通路分析, 富集分析均以 $FDR < 0.01$ 具有统计学意义, 并结合 KEGG 数据库和 Reactome 数据库进行通路注释分析。

2.2.5 网络构建 将上述四妙勇安汤的入血成分、关键靶点、作用通路在 Excel 表中分别建立入血成分-关键靶点、关键靶点-作用通路之间的对应关系, 导入 Cytoscape 软件, 构建“入血成分-关键靶点-作用通路”网络图。

2.2.6 分子对接 采用 AutoDock vina 软件对关键功效靶点与潜在 Q-Marker 进行分子对接验证。从 RCSB PDB 蛋白质结构数据库中获得靶点蛋白的三维结构, 采用 AutoDock Tools 对上述蛋白受体和配体进行常规处理, 再用其插件 Autogrid 得到对接活性位点, 进行分子对接, 得到结合能。本研究以结合能 ≤ -5.0 kJ/mol 为分子与靶点结合性较好。

2.3 动物实验验证

2.3.1 热毒炽盛之脱疽模型制备 STZ 以 0.1 mol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.2) 配制成 0.2% STZ 溶液, SD 大鼠空腹 18 h 后 ip 2% STZ (60 mg/kg), 72 h 后取尾静脉血检测空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 则糖尿病模型大鼠建立成功; 成模后 ip 3% 戊巴比妥钠麻醉, 用图章在大鼠背部印出圆形标记 (直径约 2.0 cm), 用剪刀剪除其全层皮肤, 深至筋膜, 建立热毒炽盛之脱疽大鼠模型^[19-20]。

2.3.2 分组及给药 热毒炽盛之脱疽模型大鼠随机分为模型组、四妙勇安汤 (57 g/kg, 相当于临床剂量的 2 倍)^[20]组和二甲双胍 (135 mg/kg) 组, 每组 5 只, 另取 5 只 SD 大鼠作为对照组。将“2.1.1”项下制备的四妙勇安汤浓缩为 5.7 g/mL (以生药量计) 的溶液。称取适量盐酸二甲双胍, 以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制质量浓度为 13.5 mg/mL 的混悬液。各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 2 周。

2.3.3 创面愈合率测定 分别于第 0、4、9、14 天, 使用标尺定位对各组大鼠创面进行数码拍照, 利用

Image J 软件测定创面面积，并计算创面愈合率。

创面愈合率=(造模时创面面积-治疗后创面面积)/造模时创面面积

2.3.4 血清中 MAPK、IFN- γ 和 VEGF 水平的测定 给药结束后，眼眶采血分离血清，按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 MAPK、IFN- γ 、VEGF 水平。

2.3.5 免疫组化法检测创面组织 TNF- α 和 IL-1 β 蛋白表达 取各组大鼠创面组织，经固定、脱水等制成切片，经脱蜡、水化、修复后，加入相应一抗，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；洗涤后加二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min，添加 DAB 工作液，湿盒孵育 40 s，苏木素复染，无水酒精分化、脱水、透明化，封片。于显微镜下观察并拍照，利用 Image pro plus 6.0 图像分析软件进

行测量分析，计算 TNF- α 、IL-1 β 阳性表达区域的平均吸光度 (A) 值。

2.3.6 统计学分析 使用 SPSS 软件分析数据，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 四妙勇安汤入血原型成分分析

共鉴定 20 个四妙勇安汤的入血成分 (表 1)，正、负离子模式下的总离子流图见图 1。正离子模式下有 17 个成分，负离子模式下有 3 个成分。

3.2 网络药理学分析

3.2.1 潜在靶点的预测 通过 SwissTargetPrediction 平台得到四妙勇安汤 20 个入血成分作用靶点共 544 个。将 GeneCards 和 OMIM

表 1 四妙勇安汤入血原型成分鉴定

Table 1 Identification of prototype components of Simiao Yong'an Decoction

序号	t_R /min	离子模式	相对分子质量 (m/z)		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	分子式	化合物	归属
			理论值	实测值					
1	2.40	[M+HCOO] ⁻	413.110 7	413.109 2	3.6	191.058 3, 134.992 6, 111.916 1, 93.210 1	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	绿原酸甲酯	金银花
2	2.58	[M+Na] ⁺	149.031 7	149.032 1	-2.7	127.049 7, 125.989 1, 109.068 4, 81.720 3	C ₆ H ₆ O ₃	5-羟甲基糠醛	玄参
3	3.56	[M+Na] ⁺	387.137 0	387.136 7	0.8	369.036 0, 269.087 3, 225.043 7, 207.000 2, 203.045 5, 189.018 2, 105.071 2	C ₁₅ H ₂₄ O ₁₀	哈巴昔	玄参
4	4.61	[M+HCOO] ⁻	178.052 8	178.051 7	6.2	134.104 9, 211.125 9, 379.237 1	C ₈ H ₇ NO	5-羟基吡啶	当归
5	6.38	[M+Na] ⁺	413.152 6	413.152 8	-0.5	395.243 6, 381.288 5, 363.152 3, 258.069 2, 251.091 5	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	马钱苷	金银花
6	8.70	[M+H] ⁺	313.136 2	313.136 0	0.6	279.111 7, 266.674 4	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	8-(3-methylbut-2-enyl)-9,10-dihydrophenanthrene-2,3,5,7-tetrol	甘草
7	9.17	[M+H] ⁺	404.131 9	404.134 5	-6.4	265.096 8, 255.172 2, 233.164 7, 195.113 0, 163.093 6	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁	断氧化马钱子苷	金银花
8	9.28	[M+H] ⁺	433.105 6	433.104 7	2.1	281.102 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	芹苷元-7-葡萄糖苷	金银花
9	9.33	[M+K] ⁺	453.386 2	453.384 7	3.3	415.157 7, 397.176 5, 367.220 1, 199.974 0	C ₂₉ H ₅₀ O	谷甾醇	玄参、当归
10	9.42	[M+H] ⁺	423.172 9	423.174 9	-4.7	367.253 8, 311.233 8	C ₂₅ H ₂₆ O ₆	粗毛甘草素 A	甘草
11	10.20	[M+Na] ⁺	329.255 9	329.258 2	-7.0	67.805 3, 81.994 1, 95.208 8, 109.358 9, 108.980 2, 306.669 8	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	亚麻酸乙酯	金银花
12	11.32	[M+H] ⁺	257.073 6	257.075 4	-7.0	137.062 8, 147.075 7	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	甘草素	甘草
13	11.50	[M+H] ⁺	357.162 4	357.163 0	-1.7	357.163 0, 301.113 0, 165.605 9, 221.139 2	C ₂₁ H ₂₄ O ₅	粗毛甘草素 C	甘草
14	12.02	[M+H] ⁺	223.198 4	223.200 2	-8.0	188.109 9, 207.116 6	C ₁₅ H ₂₆ O	(+)-雪松醇	玄参、金银花
15	12.86	[M-H] ⁻	285.047 7	285.050 1	-8.4	175.963 2, 151.007 7, 133.033 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	木犀草素	金银花
16	17.07	[M+H] ⁺	317.058 3	317.058 1	0.6	302.219 1, 300.124 8, 269.191 2, 153.096 9, 151.118 2, 107.086 0	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	异鼠李素	甘草
17	18.94	[M+K] ⁺	451.370 5	451.371 7	-2.7	412.366 5, 256.049 7, 219.051 3, 203.045 5	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾醇	当归
18	19.16	[M+H] ⁺	471.339 6	471.344 2	-9.8	407.330 7, 235.167 6, 189.163 3, 149.096 5	C ₃₀ H ₄₆ O ₄	甘草次酸	甘草
19	19.43	[M+H] ⁺	513.313 8	513.311 5	4.5	345.072 3, 304.234 8	C ₃₁ H ₄₄ O ₆	甘乌内酯	甘草
20	21.80	[M+H] ⁺	339.151 8	339.150 4	4.1	282.277 1, 148.114 3	C ₂₁ H ₂₂ O ₄	甘草查尔酮 G	金银花、甘草

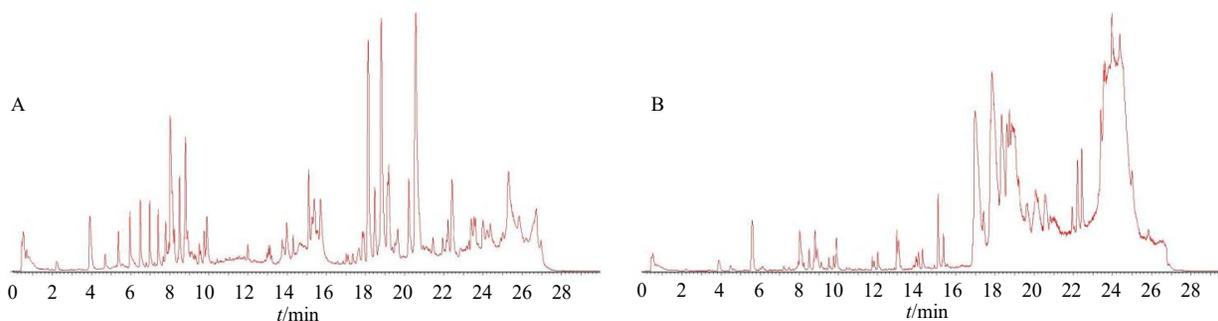


图 1 正 (A)、负 (B) 离子模式下四妙勇安汤血清样品的 UPLC-Q-TOF-MS 总离子流图

Fig. 1 UPLC-Q-TOF-MS total ion current of Simiao Yong'an Decoction serum samples in positive (A) and negative (B) ion modes

数据库得到的所有靶点，删除重复后得到与“四妙勇安汤主治病症”相关基因 1717 个。利用 Venn 作图工具对其进行交集，得到 128 个治疗热毒炽盛之脱疽的潜在靶点 (图 2)。

3.2.2 关键功效靶点的分析 将 String 平台中获取的潜在靶点蛋白相互作用关系数据导入 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络图，见图 3。PPI 网络中共有 100

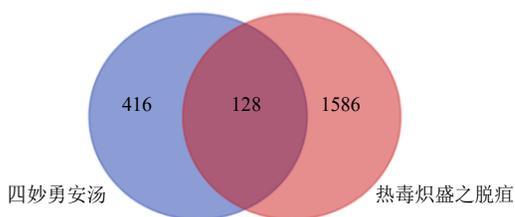


图 2 四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的潜在靶点

Fig. 2 Potential target of Simiao Yong'an Decoction in treatment of gangrene due to excessive noxious heat

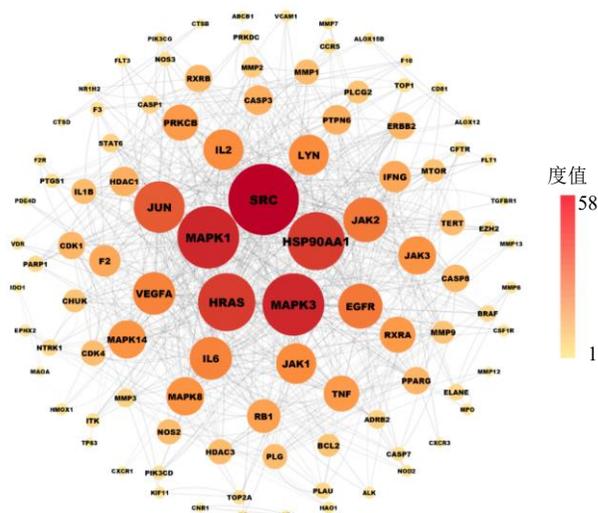


图 3 潜在靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of potential targets

个节点 (靶点蛋白)、1352 条边 (蛋白相互作用)。节点大小和颜色表示该节点度值，度值越大则说明其在网络中的作用越大，其中大于平均度值 (13.52) 的靶点共 42 个，为关键功效靶点，见表 2。

3.2.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 利用 DAVID 平台对 42 个关键靶点进行 GO 功能富集分析，根据 $P < 0.01$ 、基因数 $>$ 平均值 (4.09) 得到 GO 条目 93 条。生物过程 (biological process, BP) 相关的条目最多，有 73 条，主要涉及细胞因子的调节、蛋白质磷酸化的调控、细胞凋亡的调节、生物节律等；细胞组分 (cellular component, CC) 相关的条目有 6 条，主要涉及细胞质与细胞核质等；分

表 2 42 个关键功效靶点

Table 2 42 key efficacy targets

基因名称	PDB ID	度值	基因名称	PDB ID	度值
<i>SRC</i>	1A07	58	<i>F2</i>	1A2C	22
<i>MAPK3</i>	2ZOQ	50	<i>PTPN6</i>	1FPR	20
<i>MAPK1</i>	1PME	50	<i>HDAC1</i>	4BKX	20
<i>HSP90AA1</i>	1BYQ	46	<i>CASP3</i>	1CP3	20
<i>HRAS</i>	121P	46	<i>RXR</i>	1H9U	18
<i>JUN</i>	1A02	40	<i>PPARG</i>	1FM6	18
<i>JAK2</i>	2B7A	34	<i>ERBB2</i>	1MFG	18
<i>EGFR</i>	1IVO	34	<i>CDK1</i>	4Y72	18
<i>VEGFA</i>	5DN2	32	<i>CASP8</i>	1F9E	18
<i>IL6</i>	1ALU	32	<i>TERT</i>	2BCK	16
<i>LYN</i>	1W1F	30	<i>PLG</i>	1B2I	16
<i>JAK1</i>	3EYG	30	<i>NOS2</i>	1NSI	16
<i>IL2</i>	1IRL	30	<i>MMP1</i>	1JIZ	16
<i>MAPK8</i>	1UKH	28	<i>IL1B</i>	1HIB	16
<i>MAPK14</i>	1A9U	28	<i>HDAC3</i>	4A69	16
<i>JAK3</i>	1YVJ	28	<i>CDK4</i>	2W96	16
<i>TNF</i>	3IT8	26	<i>PLCG2</i>	2K2J	14
<i>RXRA</i>	1BY4	26	<i>MTOR</i>	1AUE	14
<i>PRKCB</i>	2I0E	26	<i>MMP9</i>	1GKC	14
<i>RB1</i>	1AD6	24	<i>CHUK</i>	3BRT	14
<i>IFNG</i>	1EKU	22	<i>BCL2</i>	1G5M	14

子功能 (molecular function, MF) 相关的条目有 14 条, 主要涉及蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、非膜跨越蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性等。将 GO 条目按 *P* 值进行排序, 分别选取 BP、CC 和 MF 的前 5 名绘制气泡图 (图 4-A)。

利用 DAVID 平台对关键靶点进行 KEGG 通路富集分析, 根据 $P < 0.01$ 、基因数 > 平均值 (8.88) 获得 62 条通路, 按 *P* 值选取前 20 个通路, 绘制气泡图。如图 4-B 所示, 这些通路主要涉及炎症相关通路和疾病相关通路等, 炎症相关通路主要包括 IL-17、Th17、MAPK、TNF 等通路; 疾病相关通路主要包括癌症、乙型肝炎、EB 病毒感染、非小细胞癌等通路。IL-17 家族通过其相应的受体发出信号, 并激活 MAPK 等下游途径, 从而诱导抗菌肽、细胞因子和趋化因子等的表达, 在炎症反应中起着至关重

要的作用^[21]; 产生 IL-17A 的 Th17 细胞是 CD4⁺ T 细胞的子集, 参与上皮细胞和嗜中性粒细胞介导的针对细胞外微生物的免疫应答以及自身免疫疾病的发病机制^[18]; TNF 信号通路可通过激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路和 MAPK 级联反应, 调控细胞凋亡、炎症和免疫^[22]。疾病相关通路主要涉及癌症相关通路, 提示其在癌症的治疗具有潜在作用, 与临床研究一致^[23-24]。以上结果说明四妙勇安汤在调节免疫、抑制炎症中起着非常重要的作用, 可能是其治疗热毒炽盛之脱疽的原因。

同时通过 Reactome 数据库对关键靶点, 进行通路富集分析。如图 5 所示, 关键靶点主要涉及免疫系统、信号转导、基因表达、细胞凋亡和疾病等多个生物过程, 其中免疫系统涉及最多, 表明四妙勇安汤是通过调控以免疫系统为主的多个复杂的生物过程来治疗热毒炽盛之脱疽。

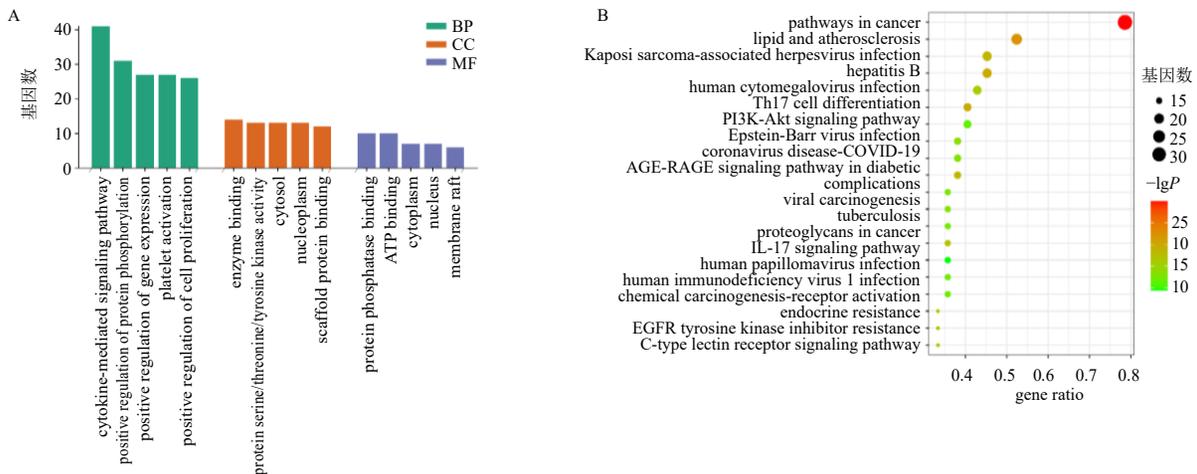


图 4 四妙勇安汤关键靶点的 GO 功能 (A) 和 KEGG 通路 (B) 富集分析

Fig. 4 GO function (A) and KEGG pathway (B) enrichment analysis of key targets of Simiao Yong'an Decoction

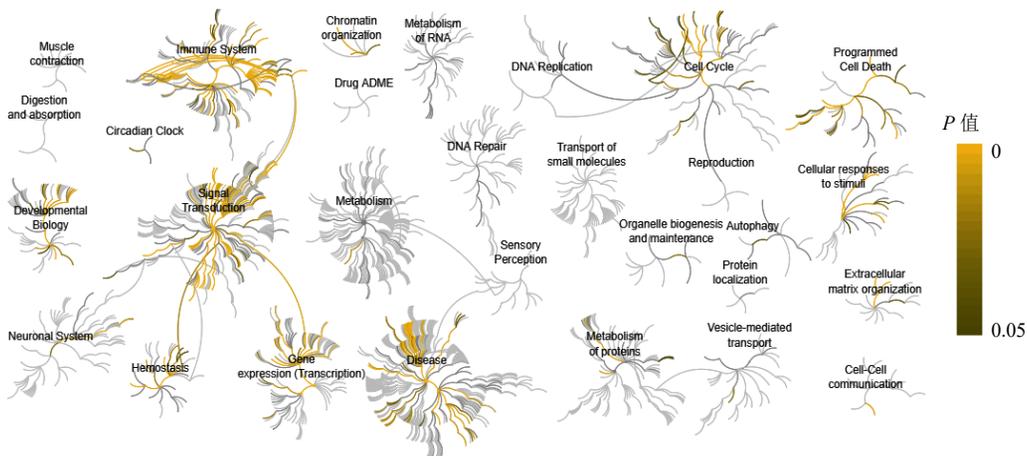


图 5 四妙勇安汤潜在靶点生物功能分析

Fig. 5 Analysis of biological functions of potential targets of Simiao Yong'an Decoction

3.2.4 “入血成分-关键靶点-作用通路”网络构建 利用 Cytoscape 软件构建“入血成分-关键靶点-作用通路”网络（图 6），并用其插件 Network Analyzer 进行分析。该网络有 128 个节点（包括 20 个入血成分、42 个关键靶点、62 条通路）和 1906 条边。网络图中成分连接度越大，表明该成分通过关键靶点治疗热毒炽盛之脱疽的可能性越大。其中有 9 个度值大于平均度值的与药效相关的入血成分，分别为

5-羟基吲哚、粗毛甘草素 A、甘草素、粗毛甘草素 C、木犀草素、异鼠李素、甘草次酸、甘乌内酯和 licoagrocarpin，这些成分是四妙勇安汤临床发挥药效的潜在重要成分，可作为四妙勇安汤潜在 Q-Marker。

3.2.5 分子对接验证 将 PPI 网络中排名前 42 的关键靶点蛋白与 9 个药效相关重要入血成分进行分子对接验证，结果见图 7。若结合能 < 0，表明配体

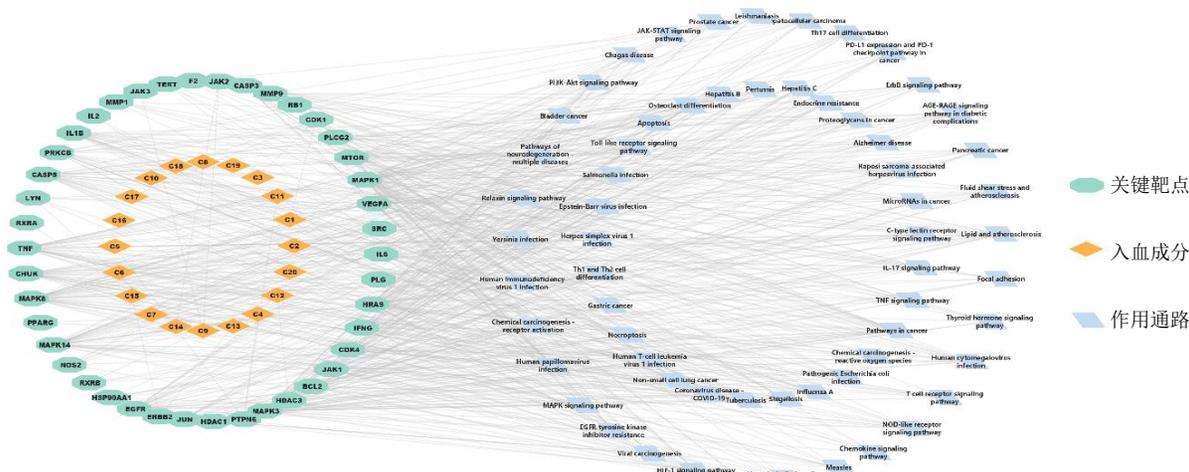


图 6 “入血成分-关键靶点-作用通路”网络

Fig. 6 “Component absorbed into blood-key target-action pathway” network

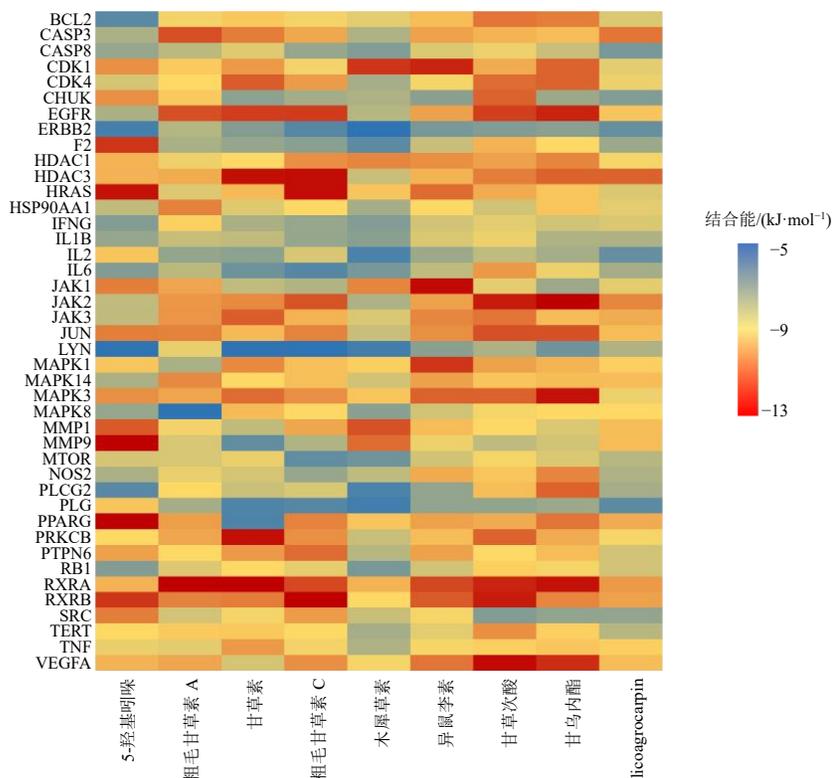


图 7 四妙勇安汤 9 个药效相关重要入血成分的分子对接结果热图

Fig. 7 Heat map of molecular docking results of nine important components absorbed into blood related to efficacy of Simiao Yong'an Decoction

分子均能和受体蛋白自发地结合；结合能<-5.0 kJ/mol，表明其结合性好；结合能越小对接越好，图中9个药效相关重要入血成分都能与靶点蛋白较好地结合，其中对接结果较好的有粗毛甘草素 A、甘草素、木犀草素等成分。选取排名前9的对接结果，并利用 Discovery Studio Visualizer 进行分析，其靶蛋白与成分的3D和2D相互作用模式，见图8。

3.3 动物实验验证

3.3.1 大鼠一般情况及创面愈合情况 对照组大鼠毛发细密、光亮，皮下脂肪丰满，体质量逐渐增加，创面明显减小，局部无红肿，疮面有明显肉芽组织和上皮生长（图9）。模型组大鼠毛色逐渐灰暗、枯黄、杂乱，皮肤及皮下脂肪变薄，多饮、多食、多尿明显，创面有出血现象，愈合较缓慢，可见明显

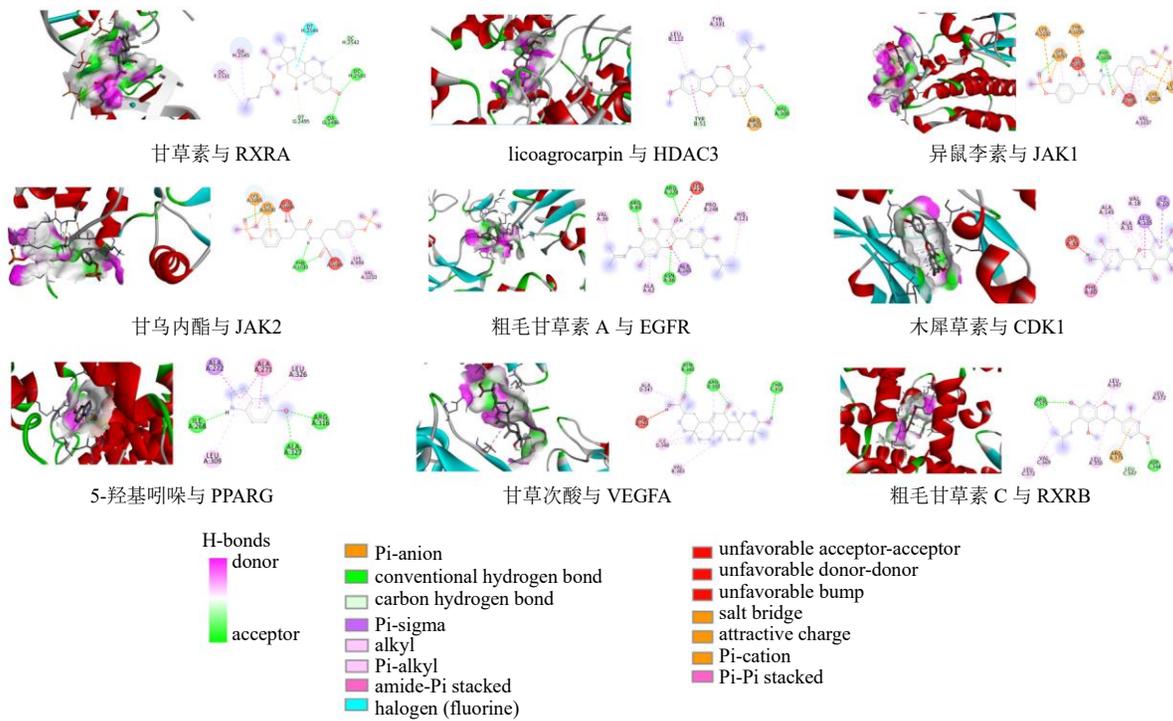
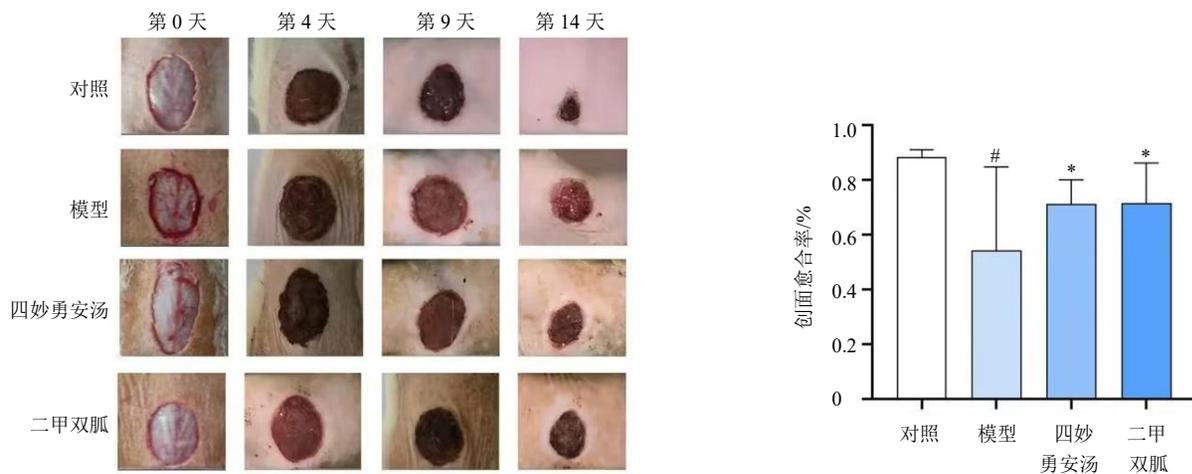


图8 四妙勇安汤9个药效相关重要入血成分的分子对接模式图

Fig. 8 Molecular docking pattern diagram of nine important components absorbed into blood related to efficacy of Simiao Yong'an Decoction



与对照组比较：# $P < 0.05$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ，下图同
$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group, same as below figures

图9 各组大鼠创面愈合情况 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 9 Wound healing of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分泌物，肉芽新生较少，有红肿现象；给予四妙勇安汤或二甲双胍干预后，大鼠一般情况显著改善，创面有肉芽组织生长，几乎无渗出液，红肿减少，创面逐渐修复，有黄褐色的痂覆盖。给药第 14 天，与对照组比较，模型组大鼠创面愈合率显著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠创面愈合率显著升高 ($P < 0.05$)。

3.3.2 四妙勇安汤对热毒炽盛之脱疽模型大鼠血清中 $INF-\gamma$ 、VEGF 和 MAPK 水平的影响 采用 ELISA 法对四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的关键功效靶点 $INF-\gamma$ 、VEGF、MAPK 进行验证，结果见图 10。与对照组比较，模型组大鼠血清中 VEGF、MAPK 和 $INF-\gamma$ 水平均显著上升 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组大鼠血清中 VEGF、MAPK 和 $INF-\gamma$

水平均显著降低 ($P < 0.05$)，二甲双胍组 VEGF 和 $INF-\gamma$ 水平显著降低 ($P < 0.05$)。表明四妙勇安汤对热毒炽盛之脱疽关键靶点蛋白 $INF-\gamma$ 、VEGF、MAPK 具有调控作用。

3.3.3 四妙勇安汤对热毒炽盛之脱疽模型大鼠创面组织 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 蛋白表达的影响 采用免疫组化法对四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的 TNF 信号通路相关蛋白 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 进行实验验证，结果见图 11。与对照组比较，模型组大鼠创面组织中 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 表达明显增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，各给药组创面组织中 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 表达均明显下降 ($P < 0.05$)。表明四妙勇安汤可以通过调控 TNF 信号通路相关蛋白 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ ，进而治疗热毒炽盛之脱疽。

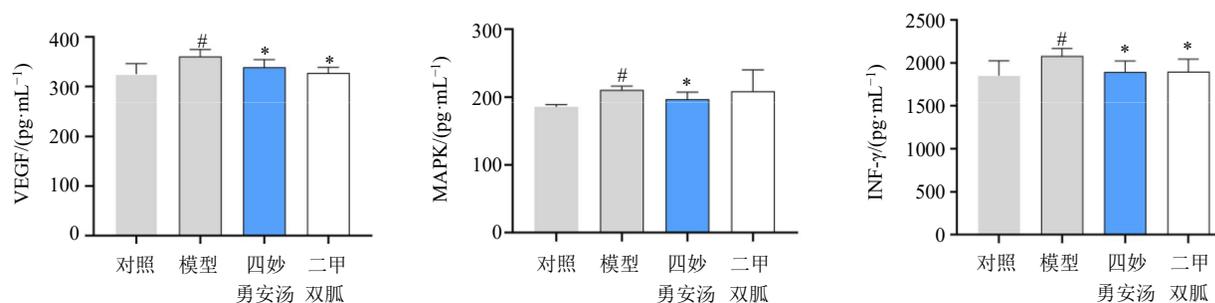


图 10 四妙勇安汤对热毒炽盛之脱疽模型大鼠血清中 $INF-\gamma$ 、VEGF 和 MAPK 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 10 Effect of Simiao Yong'an Decoction on levels of $INF-\gamma$, VEGF and MAPK in serum of rats with gangrene due to excessive noxious heat ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

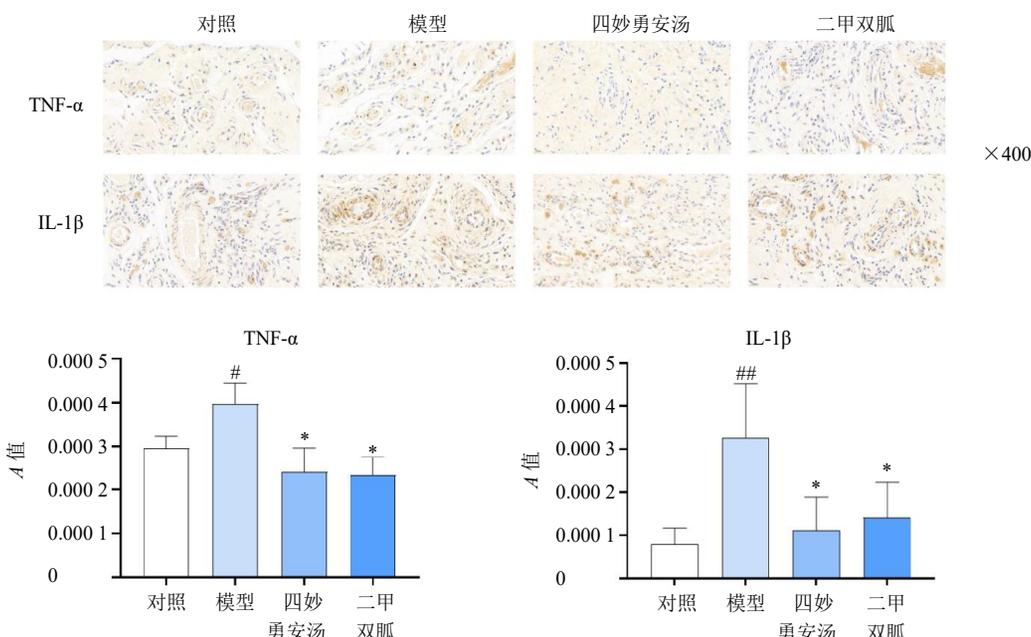


图 11 四妙勇安汤对热毒炽盛之脱疽模型大鼠创面组织中 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of Simiao Yong'an Decoction on $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ protein expressions in wound tissue of rats with gangrene due to excessive noxious heat ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中药经典名方的质量控制及评价如何体现其临床功效与特色,是目前研究的关键科学问题之一^[25]。中药 Q-Marker 的提出,为中药质量控制紧密联系临床功效与特色提供了新思路。血清药物化学和网络药理学作为经典分析方法,基于中药成分“有效性”的角度出发,对于挖掘和研究中药 Q-Marker 有重要作用。由于目前《中国药典》暂未收录四妙勇安汤,故无法获得来源于药典的质量标准,因此,基于质量标志成分需反映原方功能主治原则,本研究以“有效性”为主,通过血清药物化学研究得到经典名方四妙勇安汤 20 个入血成分,作为四妙勇安汤的潜在 Q-Marker; 随后通过网络药理学方法构建“中药入血成分-核心功效靶点-重要作用通路”网络,筛选出木犀草素、异鼠李素、甘草素、甘草次酸、粗毛甘草素 C、甘乌内酯、lipoagrocarpin、粗毛甘草素 A、5-羟基吲哚 9 个与临床功效密切相关的潜在重要成分,再结合《中国药典》对四妙勇安汤中 4 味药材含量测定规定的指标成分、特征性成分,综合考虑将绿原酸、木犀草苷、阿魏酸、哈巴苷、哈巴俄苷、甘草酸、甘草苷等已确定的重要指标成分,作为可以衡量四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的潜在 Q-Marker。筛选得到的四妙勇安汤 9 个药效相关重要入血成分主要为黄酮类和三萜类成分,其中黄酮类成分占比最高。现代研究表明,黄酮类化合物在四妙勇安汤的药物组成中广泛存在,是其发挥治疗作用的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化、调节免疫等作用^[18]。如金银花中的木犀草素可通过降低炎症因子转录调节因子的活性、减少促炎细胞因子和炎症介质的产生发挥抗炎作用^[26]; 还可通过抑制过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤,减少胆固醇在外周组织细胞中聚集,从而防止动脉粥样硬化的形成^[27]。甘草中异鼠李素可通过保护血管内皮细胞、抗氧化、抗炎等方面发挥抗动脉粥样硬化作用; 此外,已有研究表明异鼠李素能较好地改善血液流变学,减少红细胞聚集与血小板黏附,进而抑制血栓形成^[28]。甘草中甘草素^[29]与甘草次酸^[30]也具有抗炎作用,另有研究表明甘草次酸还具有抗凝血作用,可用于治疗血栓症^[31]。本研究选取的四妙勇安汤主治疾病为血栓闭塞性脉管炎、肢体动脉硬化闭塞症及坏疽等,诸多研究表明这几类疾病都与炎症反应密切相关^[32-33],其中肢体动脉硬化闭塞症是动脉粥样硬化发生于周围血管时引起远端肢体缺血的相关

病症^[34],二者病因有着紧密联系,发病机制主要与血栓形成以及血管内皮细胞受损有关;坏疽的形成也与高血糖通过促进动脉粥样硬化、血液的高凝状态、广泛的微血栓形成等病理过程使周围血管发生闭塞样改变有关^[35]。综上所述,从四妙勇安汤中筛选得到的 9 个入血关键成分可能主要通过抗炎、保护血管内皮细胞、抗血栓等作用治疗疾病。在基于“有效性”筛选得到的 9 个重要入血成分的基础上,综合考虑《中国药典》中对于四妙勇安汤中 4 味药材含量测定规定的指标成分、特征性成分,预测四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的潜在 Q-Marker,为四妙勇安汤的质量评价与制剂开发提供科学依据。

四妙勇安汤主治热毒炽盛之脱疽,现代医学中的糖尿病足溃疡、血栓闭塞性脉管炎、糖尿病大血管病变等均属该范畴^[16,36]。网络药理学部分以上述疾病为研究对象,筛选出四妙勇安汤治疗热毒炽盛之脱疽的 42 个关键功效靶点,主要涉及炎症因子、MAPK、VEGFA 等其他靶点 3 大类。这些靶点通过发挥调节免疫、抗炎、保护血管内皮、调节血管新生等作用,从而治疗热毒炽盛之脱疽。

IL-1 β 、IL-6、TNF 等促炎介质在免疫调节、应激反应中起着关键作用^[37-38]。现代研究表明血栓闭塞性脉管炎、肢体动脉硬化闭塞症与炎症密切相关,四妙勇安汤可降低血栓闭塞性脉管炎模型大鼠体内 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的含量,减少它们对血管内皮细胞的损伤,从而对血栓闭塞性脉管炎发挥一定的保护作用^[39-40]; 加味四妙勇安汤可能通过降低超敏 C 反应蛋白、IL-6 等炎症因子的含量,进而对下肢动脉硬化闭塞症急性期起到治疗作用^[41]。在本研究的验证实验中,模型组大鼠创面组织中 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达较对照组显著增加,四妙勇安汤和二甲双胍组大鼠创面组织中 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达均明显下降。表明四妙勇安汤可以通过调节热毒炽盛之脱疽大鼠 TNF 信号通路蛋白 TNF- α 、IL-1 β 的表达治疗糖尿病溃疡。

MAPK 主要包括 MAPK1、MAPK3、MAPK8、MAPK14 等,广泛参与细胞增殖、分化、迁移、转化、程序性细胞死亡和炎症反应^[42]。研究表明,MAPK 可能是四妙勇安汤“异病同治”脱疽、糖尿病和冠心病的关键靶点^[18]。VEGFA 是促进血管新生的主要生长因子之一,调节血管内皮细胞的增殖和分化,促进内皮细胞的扩张、增殖和迁移^[43-44]。四妙勇安汤可以通过上调 VEGF 的基因表达,从而

促进血管内皮细胞的增殖和分化^[45]。VEFG 水平较高时为创面肉芽增生、表皮的生长提供条件,对溃疡愈合有促进作用^[46]。IFN- γ 能激活巨噬细胞,促进 B 细胞活化产生抗体,激活中性粒细胞功能和 NK 细胞杀伤活性,在抗胞内病原体感染中发挥重要作用。本研究结果显示,模型组大鼠血清中 MAPK、VEGF、IFN- γ 水平较对照组显著上升,给予四妙勇安汤后,大鼠血清中 MAPK、VEGF 和 IFN- γ 水平均显著降低,表明四妙勇安汤可以调节热毒炽盛之脱疽大鼠血清中 MAPK、VEGF、IFN- γ 水平从而发挥治疗作用。

另外,筛选得到的 9 个重要入血成分中,并未包含四妙勇安汤中 4 味药材在《中国药典》2020 年版所规定的绿原酸、木犀草苷、阿魏酸、哈巴苷、哈巴俄苷、甘草酸、甘草苷等指标成分,上述成分可能由于溶解度小^[47]、口服吸收差^[48-50]、化学性质不稳定、易水解^[51]、被分解为其他成分^[52]等原因,未在此次研究中检出。由于本次研究重点关注内容为入血原型成分,暂未涉及对代谢产物以及肠道菌群对原型成分的影响,课题组后续也将在本研究的基础上围绕此类成分进行深入研究,同时对于以上已被研究证实的重要有效成分,也应辨识为四妙勇安汤的潜在 Q-Marker。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 张星,张臻,林夏,等.经典名方制剂开发的主要环节关键技术问题探析 [J]. 中草药, 2021, 52(21): 6724-6731.

[2] 张宏,夏伟,张磊,等.中药应以临床功效为导向进行质量标准研究 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3686-3688.

[3] 刘昌孝,张铁军.基于“物质-药代-功效”关联的中药创新研发思路 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 1-7.

[4] 张铁军,白钢,刘昌孝.中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法 [J]. 药学学报, 2019, 54(2): 187-196.

[5] 刘昌孝.中药质量标志物(Q-Marker)研究发展的 5 年回顾 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2511-2518.

[6] 阳长明,杨平,刘乐环,等.中药质量标志物(Q-Marker)研究进展及对中药质量研究的思考 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2519-2526.

[7] Guo D A. Quality marker concept inspires the quality research of traditional Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 1-2.

[8] 王喜军.中药血清药物化学的研究动态及发展趋势 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789-792.

[9] 郑亮,王梦月,陈钟,等.四妙勇安汤研究进展 [J]. 中成药, 2019, 41(6): 1365-1370.

[10] 揭珊珊,刘建鑫,于峥,等.四妙勇安汤抗炎机制的研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(9): 1539-1542.

[11] 刘鹏,张恩惠,张薇,等.四妙勇安汤水煎液化学成分研究 [J]. 中草药, 2018, 49(14): 3232-3239.

[12] 郑伟娟,熊佳,朱培成,等.国医大师禡国维应用四妙勇安汤治疗皮肤血管炎经验 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(8): 3512-3514.

[13] 李帅帅,于红红,田维毅.四妙勇安汤及配伍成分抗动脉粥样硬化作用机制研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(11): 125-129.

[14] 孙克寒,杨会,王淑琪,等.基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 分析四妙勇安汤的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(10): 2658-2667.

[15] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.

[16] 陆灏,倪青,柳国斌,等.糖尿病足病中医病证结合诊疗指南 [J]. 中医杂志, 2021, 62(12): 1099-1104.

[17] 迟森森,王卫华,刘斌.四妙勇安汤水提物大鼠吸入血成分研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(11): 933-940.

[18] 李娟,张悦健,李腾腾,等.四妙勇安汤“异病同治”脱疽、糖尿病和冠心病的网络药理学作用机制研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(5): 936-948.

[19] 张舒慧,杜金城,李海云,等.芪蛭降糖片对链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病足溃疡的保护作用 [J]. 药学学报, 2019, 54(12): 2256-2266.

[20] 赵亚男,刘明,张玥,等.四妙勇安汤对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -catenin 信号通路表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(1): 79-85.

[21] Song X Y, Qian Y C. The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling [J]. *Cytokine*, 2013, 62(2): 175-182.

[22] MacEwan D J. TNF receptor subtype signalling: Differences and cellular consequences [J]. *Cell Signal*, 2002, 14(6): 477-492.

[23] 薛俊茹,何录文,孙晖,等.四妙勇安汤药理作用及作用机制研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(5): 113-118.

[24] 卢伟,沈政洁,程海波.四妙勇安汤加减在恶性肿瘤中的应用举隅 [J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1601-1603.

[25] 闫广利,孙晖,张爱华,等.基于中医方证代谢组学的中药质量标志物发现研究 [J]. 中草药, 2018, 49(16): 3729-3734.

[26] 王继双,何焱,张文静,等.木犀草素的药理作用研究进展 [J]. 生命科学, 2013, 25(6): 560-565.

- [27] 闫庆峰, 杨达宽, 黄云超, 等. 木犀草素对高血脂症大鼠血脂的影响 [J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(1): 23-26.
- [28] 马悦, 闫姗, 南晓东, 等. 异鼠李素的心血管药理作用研究进展 [J]. 甘肃科技, 2020, 36(19): 158-160.
- [29] Kim Y W, Zhao R J, Park S J, *et al.* Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(1): 165-173.
- [30] 谢世荣, 赵洁, 刘琳, 等. 甘草次酸的研究与展望 [J]. 大连大学学报, 2005, 26(4): 85-88.
- [31] 彭子模. 甘草次酸及其衍生物的研究现状和展望 [J]. 中医学报, 1998, 26(1): 32-35.
- [32] 周晓辉, 刘忠德, 朱晓男, 等. 血栓闭塞性脉管炎病因及发病机制研究进展 [J]. 辽宁中医学院学报, 2000, 2(3): 223-224.
- [33] 叶学劲, 李志鸿, 邓柏杨. 中医药治疗肢体动脉硬化性闭塞症的研究进展 [J]. 中国医药导报, 2020, 17(27): 44-47.
- [34] 陈玲婷, 王蕊, 彭飞, 等. 下肢动脉硬化性闭塞症发病机制的研究进展 [J]. 心理月刊, 2018, 13(12): 111.
- [35] 李大勇. 周围血管病变与糖尿病肢端坏疽发病机制 [J]. 现代中西医结合杂志, 2006, 15(2): 256-257.
- [36] 何宝峰, 马新换, 毕映燕, 等. 四妙勇安汤药理作用及在周围血管疾病中的临床研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(4): 144-147.
- [37] 秦传子, 姜维良, 陈波, 等. NLRP3 炎性小体及其下游产物在 TAO 和 ASO 患者动脉中的表达及意义 [J]. 现代生物医学进展, 2018, 18(9): 1687-1693.
- [38] Slavov E S, Stanilova S A, Petkov D P, *et al.* Cytokine production in thromboangiitis obliterans patients: New evidence for an immune-mediated inflammatory disorder [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2005, 23(2): 219-226.
- [39] 李鑫, 李大勇, 吕延伟, 等. 血瘀型动脉硬化闭塞症血清代谢物和炎症反应相关因子的变化及意义 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26(4): 996-998.
- [40] 李娜, 曲晓波, 蔺爽, 等. 四妙勇安汤对大鼠血栓闭塞性脉管炎的抗炎作用及其机制 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2013, 39(2): 264-267.
- [41] 罗丽, 胡家才, 杨智杰. 加味四妙勇安汤治疗肢体动脉硬化闭塞症急性期疗效观察 [J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(7): 697-699.
- [42] Strnisková M, Barancík M, Ravingerová T. Mitogen-activated protein kinases and their role in regulation of cellular processes [J]. *Gen Physiol Biophys*, 2002, 21(3): 231-255.
- [43] Thiagarajan H, Thiyagamorthy U, Shanmugham I, *et al.* Angiogenic growth factors in myocardial infarction: A critical appraisal [J]. *Heart Fail Rev*, 2017, 22(6): 665-683.
- [44] 梁国安, 姚桂飞, 范海玲. 脑缺血缺氧后新生鼠 miR-210 表达与脑血管再生的关系 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2018, 47(4): 431-436.
- [45] 李艺博, 张悦健, 李娟, 等. 四妙勇安汤“异病同治”动脉粥样硬化与血栓闭塞性脉管炎机制研究 [J]. 世界中医药, 2021, 16(18): 2663-2671.
- [46] 朱安军. 四妙勇安汤对急性心肌梗死后心功能影响及临床疗效分析 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23(19): 2128-2130.
- [47] 郭子娴, 郑亮, 王梦月, 等. 四妙勇安汤标准煎液煎煮工艺的建立 [J]. 中成药, 2021, 43(5): 1300-1304.
- [48] 武晓红, 田智勇, 王焕. 金银花的研究新进展 [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(12): 1303-1304.
- [49] 郑浩然, 褚扬, 李伟, 等. 天然环烯醚萜类化合物的药理学研究进展 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(6): 1147-1153.
- [50] Luo Y D, Chen J, Cao J, *et al.* Determination of sweroside in rat plasma and bile for oral bioavailability and hepatobiliary excretion [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(1): 79-83.
- [51] 于潇, 迟森森, 焦其树, 等. 四妙勇安汤不同配伍组合中环烯醚萜苷类成分肠吸收研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42(7): 592-601.
- [52] 刘卉, 陈乐天, 恽菲, 等. 甘草吸收代谢特征与机制及其配伍用药相互影响研究与思考 [J]. 中草药, 2012, 43(7): 1443-1447.

[责任编辑 李亚楠]