

补阳还五汤化学成分、药理作用研究进展及质量标志物（Q-Marker）预测

李海英^{1,3}, 贺鹏^{2,3#}, 李文姣^{2,3}, 杨磊¹, 唐林¹, 胡超¹, 邓凯文^{1,3,4,5}, 潘雪^{2,3,4,5*}, 贺福元^{2,3,4,5*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007
2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
3. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208
4. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 湖南 长沙 410208
5. 中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 具有补气活血通络之功效和抗血栓、抗神经损伤、抑制细胞凋亡等药理作用, 临床上常用于治疗缺血性脑卒中。通过对 BHD 的化学成分、药理作用进行系统总结与梳理, 依照质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 理念, 从传递与溯源、特有、有效、复方配伍、可测和超分子“印迹性”6个方面对 BHD 的 Q-Marker 进行预测分析, 提示黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、阿魏酸、川芎嗪、藜芦内酯、芍药苷、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A 可作为该复方的 Q-Marker, 后续可选择这些 Q-Marker 为指标, 根据药材、饮片、制剂的量值传递规律建立并控制 BHD 全过程质量可溯源体系。

关键词: 补阳还五汤; 质量标志物; 质量控制; 黄芪甲苷; 毛蕊异黄酮; 芒柄花素; 芒柄花苷; 阿魏酸; 川芎嗪; 藜芦内酯; 芍药苷; 苦杏仁苷

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)13-4575-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.13.029

Chemical constituents and pharmacological effects of Buyang Huanwu Decoction and predictive analysis of quality markers

LI Haiying^{1,3}, HE Peng^{2,3}, LI Wenjiao^{2,3}, YANG Lei¹, TANG Lin¹, HU Chao¹, DENG Kaiwen^{1,3,4,5}, PAN Xue^{2,3,4,5}, HE Fuyuan^{2,3,4,5}

1. The First Affinity Hospital, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410007, China
2. College of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Key Laboratory of Druggability and Preparation Modification for Traditional Chinese Medicine of Hunan Province, Changsha 410208, China
4. Supramolecular Mechanism and Mathematic-Physics Characterization for Chinese Materia Medica, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China
5. Property and Pharmacodynamic Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤, BHD) has the effects of tonifying qi, activating blood and dredging collaterals, as well as antithrombotic, anti-nerve damage, inhibiting apoptosis and other pharmacological effects. It is commonly used in clinical

收稿日期: 2024-03-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274215); 湖南省科技创新计划项目 (2022SK2014); 湖南省自然科学基金项目 (2022JJ30453, 2024JJ6362, 2024JJ8151); 湖南省卫生健康委一般项目 (D202313058493); 湖南省教育厅青年项目 (22B0379); 长沙市自然科学基金 (kq2208192)

作者简介: 李海英, 博士, 从事中药复方的生物有效性及其新制剂、新技术与新工艺的研究。E-mail: 1208666249@qq.com

#共同第一作者: 贺鹏, 博士研究生, 研究方向为中药超分子药剂学与药理学。E-mail: hepengmails@163.com

*通信作者: 潘雪, 实验师, 从事中药活性成分及其有效性及中医药超分子与数理特征化研究。E-mail: 405465029@qq.com

贺福元, 教授, 从事中药药理学、中药药剂学、中医药超分子与数理特征化研究。E-mail: pharmsharking@163.com

treatment of ischemic stroke. This paper systematically summarizes and sorts out the research progress of the chemical constituents and pharmacological effects of BHD. On this basis, according to the concept of quality marker (Q-Marker), the Q-Marker of BHD was predicted and analyzed from six aspects: transmission and traceability, specificity, effectiveness, compound compatibility, testability, and supramolecular “imprinting”. The Q-Marker of BHD was predicted and analyzed, suggesting that astragaloside IV, astragaloside I, calycosin 7-*O*- β -*D*-glucopyranoside, calycosin, formononetin, ononin, ferulic acid, ligustrazine, ligustilide, paeoniflorin, amygdalin, hydroxysafflor yellow A can be used as the Q-Marker of the formula, and these Q-Markers can be selected as indicators in the future, and the quality traceability system of BHD in the whole process can be established and controlled according to the quantity transfer law of medicinal materials, decoction pieces and preparations.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; quality marker; quality control; astragaloside A; calycosin; formononetin; ononin; ferulic acid; tetramethylpyrazine; ligustilide; paeoniflorin; amygdalin

补阳还五汤 (Buyang Huanwu Decoction, BHD) 为治疗缺血性脑中风临床应用最广泛的中药复方, 出自王清任的《医林改错·下卷·瘫痪论》, 由黄芪、当归、赤芍、川芎、桃仁、红花、地龙 7 味药组成, 大量补气药与少量活血药相配, 气旺则血行, 活血而又不伤正, 共奏补气活血通络之功效, 体现“不在逐瘀以活血, 重在补气以活血”的配伍特点, 是治疗半身不遂、瘫痪不用诸证的首选方。目前, 针对 BHD 抗缺血性脑卒中的药理作用, 主要从改善脑供血及保护神经细胞的结构和功能进行研究, 包括抗血栓、改善血液流变学、抗血管损伤及保护血脑屏障、抑制兴奋性氨基酸毒性、抑制炎症因子释放、清除自由基与抗氧化作用、抑制细胞凋亡、促进神经元再生等。近年来, 国内外研究者对 BHD 的药效成分和作用机制分别从“药材、有效部位或组分、有效成分”3 个层次和“整体动物、器官组织、细胞亚细胞、分子生物学”4 个水平进行深入研究。尽管关于该方的研究众多, 包括化学成分、药理作用、临床疗效等, 但研究总体较为分散, 且《中国药典》2020 年版未收载该方, 该方的质量标志物 (quality marker, Q-Marker) 尚不明确, 也尚无中药复方制剂面世。BHD 临床疗效明确, 但其化学成分和药理作用靶点众多, 且药效物质基础及作用机制尚不明确, 故本文以 Q-Marker 五原则和本团队提出的超分子“气析”理论原则为指导, 对 BHD 化学成分、药理作用进行系统梳理和总结, 并针对研究现状提出超分子化学解决对策, 为 BHD 质量控制提供理论参考, 促进 BHD 新药研发和产业化发展。

1 化学成分

1.1 复方化学成分

曹东敏等^[1]采用四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱对 15 批 BHD 的 21 个共有峰进行归属和鉴定, 其中来源于黄芪的有 10 个 (奎宁酸甲酯、毛蕊异黄

酮苷、毛蕊异黄酮苷-6"-*O*-丙二酸酯、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素等); 来源于红花的有 3 个 (琥珀酰基腺苷、6-羟基山柰酚-3,6-*O*-二葡萄糖-7-*O*-葡萄糖醛酸苷、山柰酚-3-*O*-槐糖苷); 来源于赤芍的有 2 个 (没食子酸、芍药苷); 来源于当归的有 1 个 (香草酸); 来源于地龙的有 1 个 (鸟苷); 来源于桃仁的有 2 个 (苦杏仁苷、野樱苷); 来源于当归和川芎的有 2 个 (阿魏酸、洋川芎内酯 H)。Liu 等^[2]从 BHD 样品中鉴定出 54 个成分, 包括 4 种 C-糖基喹诺查耳酮、4 种黄酮 *O*-苷、16 种异黄酮、6 种单萜苷、8 种皂苷、4 种有机酸和 5 种氨基酸, 其中黄芪中的成分多达 29 个, 而桃仁中的成分只有 2 个。姚维一等^[3]基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 在 BHD 药液中鉴定出 55 个化合物, 主要为黄酮类如毛蕊异黄酮、槲皮素、芒柄花苷等。由此可知, BHD 黄酮类成分最多, 其次是苷类成分, 建议可进一步加强对挥发油、多糖等成分的研究。

1.2 单味药材化学成分

BHD 各单味药材主要化学成分可分为 8 类, 包括挥发油类 (除地龙外, 其他 6 味植物药均有, 主要为苯酚类)、苷类 (主要为黄芪皂苷类和黄酮苷类、桃仁黄酮苷和氰苷、赤芍单帖糖苷类、红花黄酮苷类、地龙核苷类等) 及其苷元、生物碱类 (主要为川芎嗪、地龙解热碱、黄嘌呤类等)、酚酸类 (当归和川芎酚酸类)、多糖类 (黄芪多糖、当归多糖、赤芍多糖)、蛋白质类 (主要为桃仁蛋白质、地龙蛋白质)、氨基酸类 (地龙氨基酸), 其他类如萜类、鞣质类、甾体类、酶类等^[4-16]。各单味药材主要成分类型及数目见表 1。

2 药理作用及主要靶点

BHD 主要通过抑制脑血栓形成和神经系统损害抗缺血性脑卒中, 其中抗神经系统损害包括抑制兴奋性氨基酸毒性和 Ca^{2+} 超载、抗炎、抗氧化应激和硝

表 1 BHD 各单味药材成分种类及数目

Table 1 Types and numbers of ingredients in each single flavor of BHD

药材	化学成分种类 (数目)	药效成分种类	Q-Marker	文献
黄芪	挥发油 (65)、黄酮 (25)、皂苷 (11)、多糖 (18)、氨基酸 (25)、微量元素 (9)、其他类 (酚酸、脂肪烃类、生物碱)	黄酮、皂苷和多糖类	黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 III、异黄芪皂苷 I、异黄芪皂苷 II、异黄芪皂苷 IV、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素	4-5
当归	挥发油 (苯酞类 (46)、单萜和倍半萜类 (84)、芳香类化合物 (87)、脂肪烃及其衍生物 (121))、多糖 (36)、有机酸 (20)、氨基酸 (16)、微量元素 (17) 及其他类 (三萜和甾体、生物碱、核苷、维生素)	苯酞类、酚酸类及多糖类	阿魏酸、藁本内酯、绿原酸、洋川芎内酯 A、I、H、正丁烯酞内酯、正丁基苯酞、阿魏酸松柏酯、欧当归内酯 A	6-8
赤芍	挥发油 (144)、单萜糖苷类 (64)、三萜类 (27)、黄酮 (20)、鞣质 (9)、酚酸类 (21)、糖类 (8)、甾体化合物 (6)、其他类 (醇类、生物碱等)	单萜糖苷类、鞣质、黄酮类和挥发油	芍药苷、氧化芍药苷、芍药苷内酯、儿茶素、苯甲酸、丹皮酚、没食子酸、没食子酸丙酯、柚皮素	9-10
川芎	挥发油 (苯酞类 36、烯萜和烯醇类 13)、酚酸类 (12)、生物碱类 (20)、多糖类 (6)、其他类 (萜类、甾体类、黄酮类)	酚酸类、苯酞类、生物碱类	川芎嗪、阿魏酸、阿魏酸松柏酯、Z-藁本内酯、洋川芎内酯 A、I、H、欧当归内酯 A	11-12
桃仁	挥发油 (21)、苷类 (21)、黄酮及其苷类 (9)、甾醇及其苷类 (16)、氨基酸 (16)、脂肪酸类 (22)、桃仁蛋白 (44)、其他类 (微量元素、萜类)	挥发油、甾苷、黄酮、桃仁蛋白	苦杏仁苷、野樱苷、棕榈酸、油酸、亚油酸	13-14
红花	黄酮及其苷 (50)、生物碱 (20)、聚炔 (14)、亚精胺 (6)、木脂素 (4)、甾醇类 (5)、多糖类 (6)、其他类 (8)	黄酮类	羟基红花黄色素 A、红花黄色素	15
地龙	蛋白质及多肽类 (10)、酶类 (11)、氨基酸及二肽类 (27)、核苷类 (15)、脂肪酸类 (37)、甾体化合物 (9)、溶血磷脂 (40)、无机元素 (11)	蛋白质类、酶类、脂肪酸类、氨基酸	纤溶活性蛋白、蚓激酶、蚯蚓纤溶酶、次黄嘌呤、肌苷、琥珀酸、多不饱和脂肪酸、氨基酸及二肽类成分	16

化应激、调节细胞凋亡和自噬、修复血脑屏障和抗脑水肿、提高脑组织能量代谢、促进血管和神经再生等。有研究表明其关键调控机制主要与磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路有关^[17], 还涉及到白细胞介素-7 (interleukin-7, IL-7) 信号通路、缺氧诱导因子-1 信号通路、高级糖基化终末产物-受体信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 信号通路等^[18-19]。

2.1 抗血栓

血栓的形成与内皮细胞功能和血小板功能异常、血液流变学、血管内膜增生及凝血系统等有关。BHD 有效组分生物碱和苷可抑制血管内皮细胞分泌组织型纤溶酶原激活物和纤溶酶原激活物抑制物-1、组织因子、组织因子途径抑制物、凝血酶调节蛋白 mRNA 表达及蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 蛋白表达, 从而起到保护血管内皮细胞功能^[20]; 抑制凝血因子 III 和血管性血友病因子、P-选择素、溶

酶体颗粒糖蛋白 63 表达^[21]。降低模型大鼠血小板活化因子含量, 改善血小板的黏附、变形和聚集等活动; 血小板活化与酪氨酸激酶、蛋白激酶和 p38 MAPK 蛋白及其磷酸化表达有关^[22-23]。此外, BHD 可降低脑缺血模型大鼠一氧化氮、内皮素、血栓素 B2 含量, 升高降钙素基因相关肽、6-酮-前列腺素 F1 α 、前列腺环素及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 含量, 改善血流动力学和血液流变学, 减少血液黏滞性, 从而发挥抗血栓的作用。生物碱和苷可增强基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) 的表达, 生物碱还可抑制组织基质金属蛋白酶抑制物-1 表达, 提示 BHD 中这 2 种有效组分可能通过抑制增生内膜中细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的合成, 促进 ECM 的清除和降解以对抗血管内膜增生^[24]。黄芪甲苷、苦杏仁苷、芍药苷及其配伍物通过调节细胞外信号调节激酶、PI3K、Janus 激酶/信号转导与激活因子信号通路相关蛋白表达发挥抗血管平滑

肌细胞增殖作用^[25]。

2.2 抗神经损伤

脑血栓后，会引发一系列神经损伤反应，导致细胞膜去极化，产生大量兴奋性氨基酸并导致 Ca^{2+} 超载，引起氧化应激和硝化应激，并导致炎症反应、脑水肿和能量代谢障碍等一系列连锁反应。

2.2.1 抑制兴奋性氨基酸毒性和 Ca^{2+} 超载 兴奋性氨基酸，包括谷氨酸、天冬氨酸、甘氨酸，主要为聚集的谷氨酸与 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸受体 (*N*-methyl-*D*-aspartate receptor, NMDAR) 结合，引起 Ca^{2+} 内流，同时兴奋性氨基酸能降低脑源性神经营养因子、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 的释放，抑制钙结合蛋白的表达，引起 Ca^{2+} 通道开放，共同导致细胞内游离 Ca^{2+} 超载^[26]。BHD 通过上调谷氨酸转运体-1 及谷氨酰胺合成酶蛋白及垂体腺苷酸环化酶激活肽 38 表达，促使谷氨酸代谢为谷氨酰胺。且 BHD 可作用于 α -氨基-3-羟基-5-甲基-4-异恶唑丙酸 (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, AMPA) 受体、NMDAR 和亲代谢型谷氨酸受体，缓解细胞内 Ca^{2+} 超载，从而使热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) mRNA 表达减少，保护神经纤维^[23]；毛蕊异黄酮、刺芒柄花素、川芎嗪和芍药新苷等成分作用于谷氨酸受体的活性位点如 NR1、NR2A、NR2B 等，抑制谷氨酸堆积，发挥神经元保护作用^[27]。

2.2.2 抗炎作用 经氧化应激和硝化应激产生大量的过氧化物，导致中性粒细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞及淋巴细胞等炎症细胞活化，产生各种炎症因子如细胞因子及其受体、趋化因子、黏附因子。抗炎作用包括 5 个方面。(1) 调控 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)：TLR3 可直接识别 Toll/IL-1 受体结构域，激活肿瘤坏死因子受体相关因子 3 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 3, TRAF3)，促进抗炎因子释放^[28]。TLR 在各种不同机制的免疫炎症反应中发挥重要作用，BHD 可有效减少 TLR4 及调控 TLR 信号转导通路相关 mRNA 和蛋白的表达抑制炎症反应^[29-30]。(2) 调控炎症因子释放：BHD 可下调 IL-1、IL-2、IL-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素、一氧化氮等致炎因子激发防御反应，促进组织的修复；同时上调 IL-4、IL-10 等炎症因子，对抗已经产生的炎症介质；降低 IL-8、人巨噬细胞趋化蛋白-1、巨噬细胞炎症蛋白 1 α 等趋化因子的含量

和表达；抑制可溶性细胞间黏附分子 1、可溶性血管细胞黏附分子 1 等的表达产生抗炎作用^[29]。(3) 抑制细胞焦亡：BHD 所含生物碱、苷类、多糖和苷元可能通过抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1) 表达^[28]；苷类成分可降低脑缺血大鼠海马 NOD 样受体热蛋白结构域 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、ASC 抗体、IL-1 蛋白、Caspase-1 蛋白和 Caspase-1 前体蛋白的表达，显著抑制炎症细胞焦亡，从而产生抗炎作用^[29]。(4) 抑制 MMP 表达，如 MMP3、MMP9 等，从而抑制 MMP 降解和血管内斑块的炎症反应^[32]。(5) 调控小胶质细胞以减少小胶质细胞/巨噬细胞的 M₁ 型标记物 CD16/32 表达，抑制 CD86、诱生型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 及其分泌的促炎因子表达，并且增加 M₂ 型标记物 CD206 表达，促进 M₂ 型小胶质细胞/巨噬细胞表面标记物 CD206、精氨酸酶-1 (arginase-1, Arg-1) 及抗炎因子和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) mRNA 表达，说明 BHD 可促进脑缺血后小胶质细胞/巨噬细胞从 M₁ 型向 M₂ 型转化，抑制炎症反应^[33]。

2.2.3 抗氧化应激 BHD 类方能有效降低氧化应激模型大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤 PC12 细胞培养液中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和胞内活性氧的含量，增加胞内谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 含量，抑制模型细胞内细胞周期素依赖性蛋白激酶 5 (cyclin-dependent kinase 5, CDK5) 和 tau 蛋白的过表达，从而发挥抗氧化应激作用。BHD 还可提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 与降低丙二醛水平，减轻脑缺血模型大鼠的氧化应激反应导致的脑组织损伤^[34]。丙二醛、活性氧、LDH 可反映脑组织氧化损伤程度，而 SOD、GSH-Px、过氧化氢酶等抗氧化酶能减轻氧自由基引起的脑损伤。此外，沉默信息调节因子 1 也可作为抗氧化应激的关键调节点^[35]。

2.2.4 修复血脑屏障和抗脑水肿 BHD 修复血脑屏障和抗作用包括 3 个方面。(1) 稳定血脑屏障超微结构：显著抑制 γ 干扰素的水平和 NF- κ B p65 蛋白磷酸化，减少脑缺血诱导的趋化因子 CXCL10 产生，下调 MMP2 和 MMP9 水平，上调大鼠血脑屏障紧密连接蛋白 (claudin-5、闭锁小带蛋白-1、微管相关蛋白 2) 的表达，从而改善脑梗死大鼠血脑屏障超微结构破坏；(2) 抑制血脑屏障破坏：激活过

氧化物酶体增殖物激活受体 γ , 降低炎症因子表达, 降低细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 含量, 增强 IL-10 表达, 抑制炎症反应, 从而抑制 MMP9 大量表达, 降低血脑屏障通透性, 减轻血脑屏障破坏; (3) 调节脑梗死后血脑屏障通透性: 下调 MMP9 和水通道蛋白 4 (aquaporin 4, AQP4) mRNA 表达, 从而减轻梗死后炎性水肿, 保护脑组织^[36-37]。

2.2.5 提高脑组织能量代谢 BHD 通过提高三磷酸腺苷、ADP 含量, 并促进大脑分泌去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺等, 有效改善能量代谢障碍^[36]; 还可降低乳酸及 LDH 含量促进能量代谢^[38]。

2.2.6 促进血管和神经再生 血管内皮生长因子主要包括 VEGF、促血管生成素 (angiopoietin, Ang) 家族因子、碱性成纤维生长因子等, 在血管新生过程中具有重要作用。BHD 能促进脑出血大鼠脑内 Ang-1 和内皮细胞 TEK 受体酪氨酸激酶 (TEK receptor tyrosine kinase, Tie-2) mRNA 表达, 促进血管生成, 从而促进损伤组织修复^[39]; 促进脑出血大鼠脑内损伤区 VEGF 及其受体 mRNA 的表达, 从而调整血管新生过程^[40]。其还能促进 NGF、神经元营养因子 (neurotrophic factors, NTFs) 等 20 多种多肽类活性物质分泌, 诱导神经再生^[41]。

2.3 调节细胞凋亡和自噬

脑缺血缺氧、脑血栓及神经细胞损伤后, 最终激活凋亡基因表达和凋亡因子释放, 导致细胞凋亡。凋亡相关基因通常分为促凋亡和抗凋亡基因^[42]。自噬可在脑缺血缺氧条件下被激活, 适当的自噬可以保护神经细胞, 而过度自噬会导致细胞死亡。BHD 可抑制 CDK5 和下游蛋白 tau 的异常活化, 下调神经元凋亡因子 Caspase-3 的 mRNA 表达和 B 淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) /Bcl-2 的值^[43]; 同时上调自噬相关蛋白 (人抑癌基因 Beclin1 和 LC3B/LC3A) 的表达, 提高线粒体动力学蛋白水平, 动态调控凋亡与自噬的交互, 稳定线粒体功能, 保护氧化应激受损的细胞^[44]。还能抑制 NGF, 调控与凋亡相关的生长因子; 抑制 p38 MAPK 磷酸化, 抑制缺血损伤后 p38 MAPK/Caspase-3 级联通路的活化, 减少神经细胞凋亡; 进一步拮抗凋亡执行蛋白酶活化^[45]。Caspase 家族是执行细胞凋亡的主要酶类, 其中启动分子 Caspase-8、9、10 等为蛋白酶级联反应的起始者, 效应分子 Caspase-3、6、7 等则通

过裂解细胞的多种蛋白质或酶使细胞凋亡, Caspase-3 是细胞凋亡的关键蛋白。此外, 还可降低 p53、 β 微管蛋白、死亡因子 (factor associated suicide, Fas)、Fas 配体等凋亡相关蛋白水平^[46]; 抑制泛素结合蛋白 p62 表达, 增加 Beclin1 含量, 降低自噬通路 PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路相关蛋白的磷酸化, 从而发挥神经保护作用^[47]。

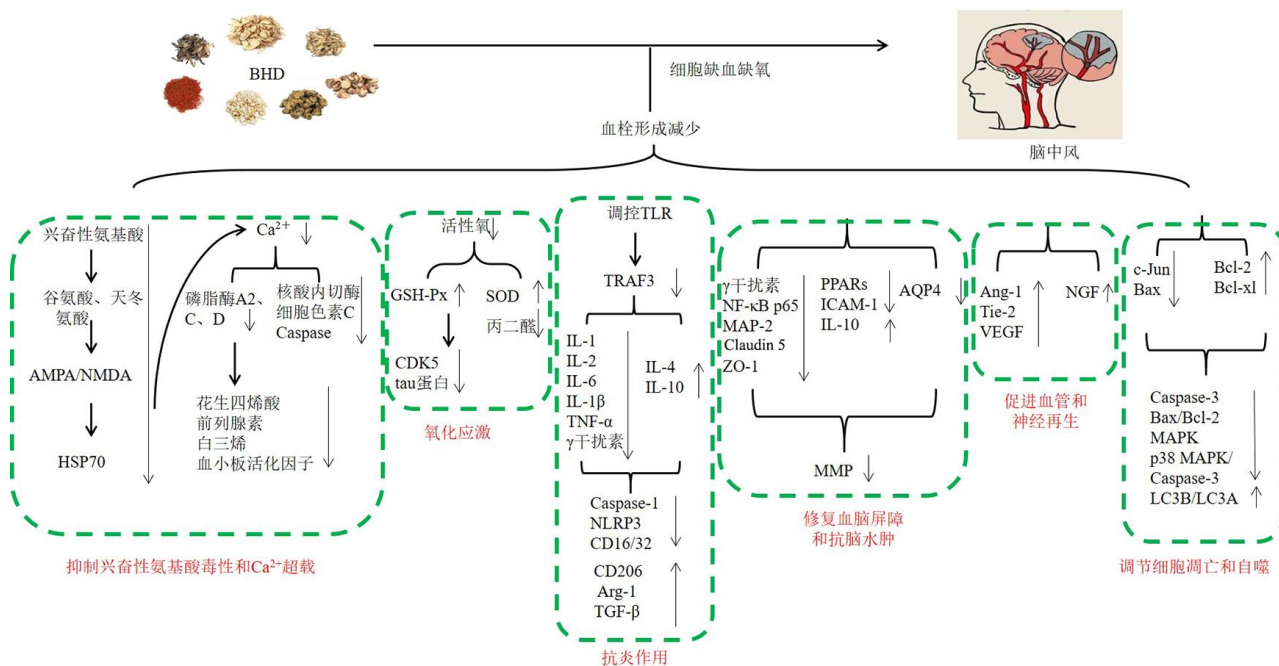
2.4 其他

除了抑制脑血栓形成和神经系统损害, BHD 还可通过调控铁死亡、circRNA-miRNA-mRNA 三元转录网络及外泌体表达、肠道菌群等途径抗缺血性脑卒中。赵冯岩等^[48]利用网络药理学分析得到缺血性脑卒中死亡途径关键靶点 3 个, 分别为 HSP90 α 家族 A 类成员 1、表皮生长因子受体、生长因子受体结合蛋白 2, 及主要京都基因与基因组百科全书通路 7 条。研究发现 70 个差异表达的 circRNAs 和 692 个差异表达的 mRNAs 可能与 BHD 抗脑缺血损伤有关, 其可能通过 mo_CIRCpedia_8313 及 mo_CIRCpedia_8013 等 7 个 circRNAs, 靶向海绵吸附 mo-miR-330-5p、mo-miR-370-3p 及 mo-miR-328 等 9 个 miRNAs, 间接调控 15 个 mRNA 的表达, 发挥神经保护作用^[49]。此外, BHD 干预组能上调 mo-miR-532-5p、mo-miR-338-3p 及 mo-miR-412-5p 表达, 下调 mo-miR-211-3p 及 mo-miR-494-3p 表达, 提示 BHD 通过调节 miRNA 谱而保护神经血管单元^[50]。陈博威等^[51]从外泌体和转录组学的角度探讨了 BHD 对急性脑梗死患者血清外泌体 lncRNA 表达谱的影响。结果表明, 2 组间共有 20 个差异表达的 lncRNA, 其中 19 个下调, 1 个上调, 说明 BHD 可能通过改变急性脑梗死患者的血清外泌体 lncRNA 表达谱, 发挥抗脑缺血损伤作用。

BHD 抗缺血性脑中风调控网络机制图见图 1。

3 Q-Marker 预测分析

针对中药现阶段质量控制体系不完善问题, 刘昌孝院士^[52-55]提出了 Q-Marker 的新概念, 从质量传递与溯源、成分特异性、成分有效性、复方配伍环境及成分可测性 5 方面来论述中药 Q-Marker 研究和发现的路径, 本团队也率先提出基于超分子“印迹性”的中药 Q-Marker 研究方法^[56], 可从这 6 个方面寻找反映中药安全性、有效性、稳定性、传递性和可测性的指标成分和药效成分, 进而对复方质量进行全过程、全方位控制。笔者拟建立 BHD 的 Q-Marker 发现的研究路径, 见图 2。



CDK-5-细胞周期素依赖蛋白激酶 5; ZO-1-闭锁小带蛋白-1; MAP-2-微管结合蛋白-2; PPARs-过氧化物酶体增殖物激活受体。

CDK-5-cyclin-dependent kinase 5; ZO-1-zonula occludens protein 1; MAP-2-microtubule-associated protein 2; PPARs-peroxisome proliferators-activated receptors.

图1 BHD 抗缺血性脑中风网络调控机制

Fig. 1 Network regulation mechanism of BHD in treating ischemic stroke

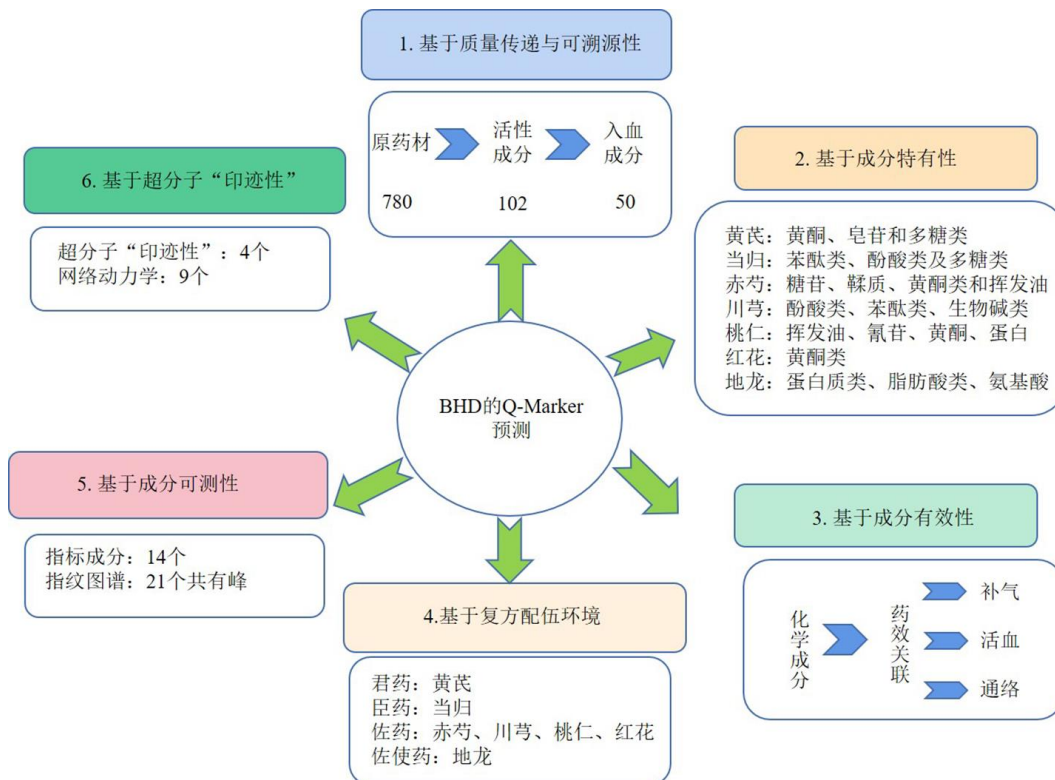


图2 BHD 的 Q-Marker 发现的研究路径

Fig. 2 Research approach of Q-Marker discovery of BHD

3.1 质量传递与溯源

Wang 等^[57]以 BHD 中药物“黄芪”“当归”“赤芍”“川芎”“红花”“地龙”为关键词,通过数据库共找到 780 个成分,并以口服生物利用度 $\geq 30\%$,类药性 ≥ 0.18 进一步筛选得到 102 个活性成分,其中黄芪 21 个、红花 23 个、当归 4 个、赤芍 29 个、川芎 9 个、桃仁 23 个、地龙 5 个。最后通过网络药理学分析得到与抗缺血性脑中风密切相关的 16 个关键成分如 β -胡萝卜素、山柰酚、木犀草素,槲皮素、羟基红花黄色素 A、黄芪甲苷和 10 个关键靶点如 IL-6、TNF- α 等。

中药成分众多,但只有被吸收入血的成分才能产生发挥药效作用。Wen 等^[58]采用 UPLC-Q-TOF/MS 从正常大鼠尿液中鉴定得到 50 个成分,包括 5 种异黄酮成分、3 种皂苷成分、和其他 4 种类型的成分等 12 个原型成分和 22 个代谢产物,代谢产物可分为异黄酮和苯酞类,主要来自黄芪、当归和川芎。沈晓等^[59]采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 对 BHD 在正常和脑缺血再灌注大鼠脑组织和血浆的吸收成分进行鉴定,发现正常脑组织和血浆中分别有 5 个和 7 个化合物,而造模脑组织和血浆中却只有 2 个和 3 个化合物,均只有 1 个共同成分毛蕊异黄酮苷,说明正常和造模血浆和脑组织成分存在差异。姚维一等^[3]基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 在 BHD 给药后人血浆和人尿液样本分别鉴定出 34 和 23 个化合物,主要分为黄酮类(芦丁、毛蕊异黄酮、芒柄花素、毛蕊异黄酮苷和槲皮素等)、苯酸类(阿魏酸、绿原酸、没食子酸等)、苯酞类(洋川芎内酯 A、藜本内酯和洋川芎内酯 H)和皂苷类(黄芪皂苷 III 等)。Yang 等^[60]基于 HPLC-DAD-MS 在 BHD 给药后猪血清中鉴定出 9 个化合物,以黄酮类化合物为主。黄海艳等^[61]在大鼠含药血浆中发现了 30 个入血成分,其中 10 个为血浆固有成分,1 个为溶剂峰,19 个为药源性成分,而水提液中被鉴定的 6 个成分未在血浆中被检测出,提示原型药物被肠道菌群转化为代谢产物。

综上,基于质量传递与溯源,可追踪 BHD 内 780 个有效成分到 102 个活性成分,再结合 50 个入血成分综合考量,由此确定 BHD 可能的 Q-Marker。

3.2 成分特有性

3.2.1 黄芪成分的特有性分析 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *A.*

membranaceus (Fisch.) Bge. 的干燥根,主要含有苯酞类挥发油、黄酮、皂苷、多糖、氨基酸、微量元素及其他类(酚酸、脂肪烃类、生物碱)。黄酮、皂苷和多糖类是其药效成分,其中黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花苷、芒柄花素、槲皮素等成分具有特有性^[62-63],可作为黄芪的 Q-Marker。

3.2.2 当归成分的特有性分析 当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,主要含有苯酞类挥发油、单萜和倍半萜类、芳香类化合物、脂肪烃及其衍生物、多糖、有机酸、氨基酸、微量元素及其他类(三萜和甾体、生物碱、核苷、维生素)。苯酞类、酚酸类及多糖类具有多种药理活性,其中阿魏酸、藜本内酯、洋川芎内酯 A、I、H、正丁基苯酞等具有很强的特有性^[64-66],可作为当归的 Q-Marker。

3.2.3 赤芍成分的特有性分析 赤芍为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根,主要含有挥发油、单帖糖苷类、三萜类、黄酮、鞣质、酚酸类、糖类、甾体化合物、其他类(醇类、生物碱等)。单帖糖苷类、鞣质、黄酮类和挥发油为主要有效成分,苷类如芍药苷、氧化芍药苷、芍药苷内酯等具很强专属性^[20,67],可作为赤芍的 Q-Marker。

3.2.4 川芎成分的特有性分析 川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎,主要含有挥发油(苯酞类、烯萜和烯醇类)、酚酸类、生物碱类、多糖类、其他类(萜类、甾体类、黄酮类)。酚酸类、苯酞类、生物碱类是发挥药理作用的物质基础,其特有性成分和当归类似,包括川芎嗪、阿魏酸、阿魏酸松柏酯、Z-藜本内酯、洋川芎内酯 A、I、H 等^[68-69],可作为川芎的 Q-Marker。

3.2.5 桃仁成分的特有性分析 桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *P. davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子,含有挥发油、苷类、黄酮及其苷类、甾醇及其苷类、氨基酸、脂肪酸类、桃仁蛋白、其他类(微量元素、萜类)。其药效成分为挥发油、氰苷、黄酮、桃仁蛋白,主要以苦杏仁苷为其质量评价指标但专属不高,野樱苷的专属性较苦杏仁苷高^[70-71]。综上,苦杏仁苷和野樱苷可作为桃仁的 Q-Marker。

3.2.6 红花成分的特有性分析 红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花,含有黄酮及其

苷、生物碱、聚炔、亚精胺、木脂素、甾醇类、多糖类。黄酮类。其中醌式查耳酮类化合物如羟基红花黄色素 A、红花黄色素是红花发挥药理作用的物质基础,也为其他植物中较少见的成分,专属性好且含量高^[3],可作为红花的 Q-Marker。

3.2.7 地龙成分的特有性分析 地龙为钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier)、通俗环毛蚓 *P. vulgaris* Chen、威廉环毛蚓 *P. guillelmi* (Michaelsen) 或栉盲环毛蚓 *P. pectinifera* Michaelsen 的干燥体,含有蛋白质及多肽类、酶类、氨基酸及二肽类、核苷类、脂肪酸类、甾体化合物、溶血磷脂和无机元素。主要药效成分为蛋白质类、酶类、脂肪酸类、氨基酸,其中纤溶活性蛋白、蚓激酶、蚯蚓纤溶酶、次黄嘌呤、肌苷等专属性很强^[25]。因此,蚓激酶、次黄嘌呤及肌苷可作为地龙的 Q-Marker。

3.3 成分与药效关联

3.3.1 基于体内成分与药效关联的 Q-Marker 预测分析 黄酮类成分毛蕊异黄酮苷、毛蕊异黄酮、芦丁和胡萝卜素可降低损伤大鼠脑细胞流动性;羟基红花黄色素 A、山柰酚可通过抑制血小板聚集抗血栓^[72];芒柄花素、芒柄花苷可抗缺血性损伤^[73-74]。苯酸类的阿魏酸、没食子酸降低血管渗透可保护神经细胞线粒体功能而降低神经细胞损伤;苯甲酸类、洋川芎内酯抗氧化^[75]。苷类如黄芪甲苷、芍药苷、苦杏仁苷可抑制血管平滑肌细胞^[76];6-羟基山柰酚-O-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷抗血小板聚集,改善血液流变学^[77];没食子芍药苷、刺芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷上调血管内皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的分泌,促进血管生成^[78]。生物碱类如川芎嗪具有活血祛瘀、抑制血小板聚集、扩张血管、改善血液循环、缓解疼痛等作用^[79]。BHD 有效成分黄芪甲苷、阿魏酸、绿原酸、毛蕊异黄酮苷、川芎嗪、芦丁、丹皮酚还能显著改善细胞膜流动性从而改善细胞损伤^[80]。

3.3.2 基于体外成分与药效关联的 Q-Marker 预测分析 Zhang 等^[81]基于大鼠外翻肠囊和人结肠癌 Caco-2 细胞单层模型,阐明 BHD 发挥抗脑缺血的化合物为黄芪甲苷、毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、刺芒柄花素、芒柄花苷等。郑华珠^[82]采用神经元样 PC12 细胞膜固相色谱法联合 UPLC-MS/MS 检测并初步鉴定 BHD 与 PC12 细胞特异结合的效应成分,揭示其发挥神经保护的效应成分可能为 6-羟基山柰

酚-3,6-二-O-葡萄糖苷、6-羟基山柰酚-3,6,7-三-O-葡萄糖苷和毛蕊异黄酮苷。此外,还通过红细胞膜固相色谱法,阐明 BHD 发挥“行血活血”功效的作用物质基础可能为毛蕊异黄酮、芍药内酯苷、6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮苷等。廖丰蕴^[83]运用脑微血管内皮细胞膜固相色谱法筛选 BHD 与脑微血管内皮细胞膜亲和性较高的活性成分,药效验证确定毛蕊异黄酮苷、芍药苷、芒柄花苷、没食子酰芍药苷、7,2'-二羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷均能不同程度对抗脑微血管内皮细胞损伤。王玎^[78]运用血小板细胞膜固相色谱法筛选 BHD 的“行血”药效物质基础,确定了 BHD 抗血栓和活血化瘀的 5 个色谱峰,其中 2 个为芍药苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷。Liao 等^[84]采用血小板结合实验、固相萃取和 HPLC-MS/MS 研究 BHD 介导抗血小板的活性成分,筛选与血小板结合亲和力最强的 5 个化合物为 6-羟基山柰酚-二-O-葡萄糖苷、芍药苷、毛蕊异黄酮苷、没食子酰芍药苷和芒柄花苷。Yu 等^[85]采用 RBC 膜结合试验结合 SPE 和质谱探讨 BHD 基于红细胞膜病变的抗脑中风物质基础,发现毛蕊异黄酮、毛蕊异黄酮苷、芍药苷和 6-hydroxy behenol-3,6-di-O-glucoside 是其潜在的药效物质。吴银爱^[86]建立神经元样 PC12 细胞膜固相色谱法筛选 BHD 发挥“神经保护”药效成分,并得到特异结合的 6 种成分为 6-羟基山柰酚-3,6,7-三-O-葡萄糖苷、6-羟基山柰酚-3,6-二-O-葡萄糖苷、毛蕊异黄酮苷、没食子酰芍药苷、芒柄花素-7-O-β-D-葡萄糖苷和 7,2'-羟基-3',4'-二甲氧基异黄烷。

3.4 复方配伍环境

BHD 方中各药协同发挥补气、活血、通络的功效。正如《医林改错评注》所说:“方中重用黄芪补气,使气足而血行,经络通畅;配合当归尾、赤芍、川芎、桃仁、红花活血祛瘀,地龙通经络,共同起到补气活血、逐瘀通络的作用”。生黄芪为君药,当归尾为臣药,赤芍、川芎、桃仁、红花为佐药,地龙为使药。大量补气药与少量活血药相配,因此对 BHD 拆方研究时常把黄芪单独拎出来作为补气组,与活血组和通络组或两两的组合与全方的药效或指标成分含量进行对比研究,研究的层面有基于君臣佐使配伍、黄芪剂量研究等。大量研究者比较了 BHD 及其拆方的药效,均发现 BHD 比拆方的药效更强,说明黄芪与活血药组的配伍使用具有“气旺以促血行”之功^[87-90]。雷明^[72]通过比较 BHD 复方

颗粒与单味药材中的黄芪甲苷与羟基红花黄色素 A 的含量, BHD 复方颗粒体内代谢后这 2 个成分的含量高于单味药材组, 说明黄芪和红花配伍能增强 BHD 的补气活血功效。探讨不同剂量黄芪配伍的 BHD 对缺血性脑卒中恢复期患者血液流变学及疗效的影响, 当大剂量使用黄芪时, 更能显著改善患者的血液流变学, 有利于缺血性脑卒中患者病情改善和神经功能恢复^[73-74]。

3.5 成分可测性

3.5.1 成分含量可测性 根据《中国药典》2020 年版记载, BHD 这 7 味药材需进行含量测定的成分有黄芪甲苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸、芍药苷、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A。王玮等^[75]采用 UPLC-MS/MS 法对 BHD 抗动脉粥样硬化 8 个效应成分如羟基红花黄色素、芍药内酯苷、芍药苷、苦杏仁苷、黄芪甲苷等进行含量测定, 该方法重复性、回收率好。王露等^[76]采用超高效液相色谱-串联质谱法同时测定 BHD 中苦杏仁苷、芍药苷、阿魏酸、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、槲皮素及芒柄花素这 6 种成分的含量, 该法专属性强、快速灵敏。饶晓玲等^[91]基于 HPLC 法同时测定 BHD 中川芎嗪和阿魏酸的含量, 本测定方法可靠简便, 专属性强, 重现性好。王玘^[78]建立 HPLC 法并用于对 BHD 提取液中苦杏仁苷、芍药苷、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、阿魏酸进行定量, 该法方便、准确, 能同时分析这 4 种成分的含量。Liu 等^[79]对其中的 12 个生物活性成分如毛蕊异黄酮苷、芒柄花苷、毛蕊异黄酮、黄芪甲苷 IV、黄芪甲苷 I 等进行定量分析。Shaw 等^[80]采用 LC-MS/MS 技术对 BHD 的 9 个成分如黄芪皂苷 I、黄芪皂苷 II、黄芪甲苷、刺芒柄花素、芒柄花苷等进行定量分析, 该方法灵敏、准确、重现性好, 便于质量控制。

3.5.2 谱动力学和谱效动力学 Zhang 等^[92]建立多成分谱动力学数学模型, 并对 BHD 中黄芪甲苷、芍药苷、苦杏仁苷、川芎嗪、阿魏酸的药动学参数和总量统计矩参数进行计算, 发现黄芪甲苷与全方的总量统计矩相似度最高, 推测是 BHD 的 Q-Marker。余健焯^[93]研究单体成分芒柄花苷和芍药苷在 MCAO 模型大鼠体内的药动学过程, 说明 BHD 抗脑缺血损伤作用可能与其体内抗氧化作用有关。陈思阳^[94]建立 PK-PD 数学模型, 探讨 8 个入血成分(藜本内酯、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、芒柄花素、阿魏酸、羟基红花黄色素 A、3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀

烷、胡萝卜苷、苦杏仁苷)与 9 个效应靶点之间的量-时-效关系, 说明这 8 个成分主要对 ICAM-1、MMP9、TNF- α 等靶点起效应。

3.6 基于超分子“印迹性”和网络动力学的抗缺血性脑卒中物质基础研究

杨岩涛^[95]建立 4 成分(川芎嗪、芍药苷、苦杏仁苷及阿魏酸)与 4 靶点(Caspase-3、VEGF、TNF- α 、IL-6)的网络谱效动力学数学模型, 以平衡常数表征成分与靶点间“印迹模板”的“印迹性”作用大小, 说明这 4 成分 4 靶点在 BHD 抗脑缺血网络体系中具有相对较高的地位。樊启猛^[96]针对 BHD 抗脑缺血的 20 个成分和 20 个靶点进行网络动力学研究, 测定成分群与靶点群间的网络作用平衡常数, 获得平衡常数矩阵, 再求算特征值和特征向量, 依据特征值与特征向量的对应关系, 按贡献率排序, 得到累计贡献率达 95% 的 9 个成分和 13 个靶点, 这 9 个关键成分即刺芒柄花苷、羟基红花黄色素 A、3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷、胡萝卜苷、洋川芎内酯 H、藜本内酯、苦杏仁苷、异黄芪皂苷 I、毛蕊异黄酮。

综上, BHD 中的黄芪甲苷、黄芪皂苷 I、毛蕊异黄酮葡萄糖苷、毛蕊异黄酮、芒柄花素、芒柄花苷、槲皮素、阿魏酸、川芎嗪、藜本内酯、芍药苷、苦杏仁苷、羟基红花黄色素 A 这 13 个成分具有药理活性, 专属性高、可测性强、便于质量控制可作为 BHD 的 Q-Marker。

4 结语与展望

近年来, Q-Marker 的预测分析已用于多种中药及其复方, 包括肉豆蔻、细辛、天舒胶囊、当归四逆散等中药和复方^[97-100]。本文基于其传递与溯源的属性, 以复方有效性为核心, 成分可测性和成分特有性为条件, 并结合复方的配伍环境和超分子“印迹性”对其 Q-Marker 进行预测分析, 寻找与 BHD 药效关联强、专属性高、可测性好的 Q-Marker (包括黄酮类、皂苷类和生物碱类), 为 BHD 进一步研究和开发、质量评价体系建立和完善提供参考依据。

目前关于 BHD 化学成分和药理作用的文献较繁杂, 缺乏不同研究指标之间的关联, 应对已有文献信息进行整合、凝练、总结、升华。化学成分主要针对黄酮、皂苷、生物碱类成分, 而对其他有效成分如多糖、挥发油等研究较少; 研究表明黄芪多糖和当归多糖等具有显著的增强免疫作用, 故这些化合物的深入研究可丰富 BHD 的临床应用及新药

开发依据。此外，单一成分或靶点与机体的纵向关联研究较多，不同成分与靶点之间的横向联系及其与脑缺血的病理特征联动机制研究较少；多以单成分单靶点的思路进行研究，缺乏成分与成分间、成分与靶点间的作用机理研究；且定性研究多，定量研究少，成分与靶点的贡献率大小一直未能突破，这个问题也是实现中医药现代化的卡脖子关键技术。中药复方以多成分作用于多靶点，整体协同发挥药效，因此成分与靶点间的作用机理不可忽视。

围绕着成分与靶点(Q-Marker)作用机制研究，本课题组也在致力于从生物超分子化学和定量药理学角度将中药成分与靶点群进行关联成“印迹模板”并进一步根据“印迹模板”性质进行整合，最终从定性和定量2个层面验证药效成分和靶点的作用关系：首先采用匹配频数统计矩法分离出“印迹模板”，再采用分子连接性指数和总量统计矩参数表征“印迹模板”特征，并进一步对“印迹模板”特征、“印迹模板”印迹性(色谱参数)和药效靶点进行关联，从整体上找寻与药效及“印迹模板”印迹性关联性最强的成分与靶点群，锁定药效“印迹模板”；进一步通过中药定量谱学如谱动力学、谱效学、谱效动力学、网络动力学等数学模型对药效“印迹模板”(成分与靶点群)贡献率大小进行排序^[56,101-102]。这种印迹性的中药及复方质量评价方法的建立将能够极大地缩小实验验证的难度，从整体上对筛选得到的成分与靶点群贡献率进行排序，寻找和验证 BHD 质量控制指标，为其研制成中药新药奠定基础。此外，多组学技术如基因组学、蛋白组学、转录组学、翻译组学、代谢组学、微生物组学、本草物质组学也能从整体上阐明中药复方微观作用本质。

故本文对 BHD 化学成分和药理作用进行系统综述，寻找关键的成分与靶点群，下一步将运用本团队建立的超分子印迹性质量评价方法，进一步锁定和验证关键的 Q-Marker，全面揭示中药多成分在体内产生药效的物质基础及作用机制，最终揭示中药复方整体效应的科学本质及其内涵，推动 BHD 质量标准建立。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 曹东敏, 黄广泉, 胡旭光, 等. 基于核壳色谱技术的补阳还五汤指纹图谱构建及共有峰液质分析 [J]. 中草药, 2019, 50(21): 5239-5245.

[2] Liu E H, Qi L W, Peng Y B, *et al.* Rapid separation and

identification of 54 major constituents in Buyang Huanwu Decoction by ultra-fast HPLC system coupled with DAD-TOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(8): 828-842.

[3] 姚维一, 王春, 龚弟鸿, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 快速鉴定补阳还五汤及其在人血浆和尿液中药物化学成分 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(14): 1719-1725.

[4] 张淑娟, 张育贵, 牛江涛, 等. 黄芪的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(2): 151-155.

[5] 薛倩倩, 李爱平, 李科, 等. 黄芪的质量评价研究概述及质量标志物研究策略初探 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(12): 2459-2463.

[6] 李伟霞, 泥文娟, 王晓艳, 等. 当归化学成分、药理作用及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 40-47.

[7] 马艳春, 吴文轩, 胡建辉, 等. 当归的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药学报, 2022, 50(1): 111-114.

[8] 冯慧敏, 李玥, 罗旭东, 等. 当归化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(4): 159-166.

[9] 何泽源, 张妍妍, 林楠, 等. 赤芍化学成分和药理作用及质量标志物的预测分析 [J]. 中药材, 2020, 43(12): 3075-3080.

[10] 杨玉赫, 徐雪娇, 李陈雪, 等. 赤芍化学成分及药理作用研究新进展 [J]. 化学工程师, 2021, 35(9): 42-44.

[11] 任伟光, 郭丽丽, 张翠英. 川芎的研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(9): 3307-3314.

[12] 蒲忠慧, 代敏, 彭成, 等. 川芎生物碱的物质基础及药理作用研究进展 [J]. 中国药房, 2020, 31(8): 1020-1024.

[13] 张妍妍, 韦建华, 卢澄生, 等. 桃仁的化学成分、药理作用及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(1): 234-241.

[14] 王仁芳, 范令刚, 高文远, 等. 桃仁化学成分与药理活性研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(6): 426-429.

[15] 李响, 俱蓉, 李硕. 红花化学成分药理作用研究进展及质量标志物预测分析 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(5): 928-939.

[16] 李思维, 郝二伟, 杜正彩, 等. 广地龙化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. 中草药, 2022, 53(8): 2560-2571.

[17] 宋颖军, 李旭, 刘小舟, 等. 补阳还五汤通过调控 PI3K/Akt、JAK2/STAT3 信号促进 BMSC 趋化迁移对外伤性脊髓损伤大鼠神经元活性及认知功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(17): 4206-4213.

[18] 李东红, 胥芷灵, 徐翠珊, 等. 补阳还五汤治疗中风的有效成分及作用机制研究 [J]. 中医学报, 2021, 36(7):

- 1545-1550.
- [19] 代雅洁, 刘振权, 江洋, 等. 补阳还五汤入脑成分治疗缺血性中风潜在机制的网络药理学分析与验证 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(5): 799-806.
- [20] 欧明娥, 唐利文, 邓常清. 补阳还五汤有效组分对血管内皮细胞抗血栓功能及蛋白激酶C的影响 [J]. 中草药, 2008, 39(10): 1514-1520.
- [21] 刘婉沂, 张英丰, 周欣, 等. 补阳还五汤抗脑缺血的作用机制研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(3): 411-418.
- [22] 姚晖, 张继平. 补阳还五汤抗血栓实验研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5): 95-97.
- [23] 侯晓婵, 高维娟. 补阳还五汤治疗缺血性卒中机制研究进展 [J]. 河北中医, 2020, 42(12): 1916-1920.
- [24] 张伟, 吴露, 陈北阳, 等. 补阳还五汤及有效组分对大鼠增生血管内皮细胞外基质蛋白表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(1): 169-173.
- [25] 曹浪, 邓常清. 补阳还五汤苷类有效组分及其有效成分配伍对血管平滑肌细胞增殖及相关信号转导通路的影响 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(10): 1889-1897.
- [26] Faden A I, Demediuk P, Panter S S, *et al.* The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury [J]. *Science*, 1989, 244(4906): 798-800.
- [27] 路芳, 蒋芦荻, 陈艳昆, 等. 基于神经保护探讨补阳还五汤抗脑缺血损伤的多靶点作用机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(9): 744-749.
- [28] 田倩倩, 刘建春, 王晓庆, 等. 补阳还五汤抗炎作用研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(4): 876-878.
- [29] 刘叙阳. 基于“气能行血”理论研究补阳还五汤对血管内皮细胞TLR4、PI3K和LOX-1的影响 [D]. 延吉: 延边大学, 2021.
- [30] 尚卫兵, 朱博冉, 张海楼, 等. 加味补阳还五汤对防治动脉粥样硬化的Toll样受体7及其下游信号转导通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1767-1773.
- [31] She Y, Shao L, Zhang Y R, *et al.* Neuroprotective effect of glycosides in Buyang Huanwu Decoction on pyroptosis following cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 242: 112051.
- [32] 蓝艳. 补阳还五汤对气虚血瘀型缺血性脑卒中患者血浆基质金属蛋白酶影响 [J]. 福建中医药, 2013, 44(1): 21-22.
- [33] 甘海燕, 李琳, 杨琰, 等. 补阳还五汤调控小胶质细胞/巨噬细胞极化抑制大鼠脑缺血后炎症反应研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2019, 43(1): 1-6.
- [34] 刘芳, 陈乃宏, 胡耀梅, 等. 补阳还五汤类方对氧化应激PC12模型细胞CDK5及凋亡因子的影响 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(12): 1758-1764.
- [35] 郑华珠, 王利胜, 孟英姣. 补阳还五汤通过上调Sirt1抑制脑微血管内皮细胞氧糖剥夺再灌注诱导氧化应激损伤 [J]. 中药药理与临床, 2017, 33(2): 9-13.
- [36] 郑晓宇, 张业昊, 宋文婷, 等. 补阳还五汤对脑缺血后神经血管单元影响的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5226-5232.
- [37] 张运克, 车志英, 李可. 补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞对脑缺血大鼠血脑屏障通透性的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(7): 1548-1553.
- [38] 卢永康, 彭康, 朱传武, 等. 补阳还五汤对中风后遗症“气虚血瘀”大鼠模型能量代谢的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(11): 2280-2283.
- [39] 孙立倩, 赵雅宁, 李建民, 等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血/再灌注后p38 MAPK磷酸化、COX2表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(10): 1450-1452.
- [40] 周华军, 唐涛, 钟建华, 等. 补阳还五汤对脑出血大鼠脑内促血管生成素-1及其受体mRNA表达的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(4): 343-347.
- [41] 周岚. 补阳还五汤促进周围神经损伤修复的药理研究 [J]. 河南中医, 2016, 36(4): 735-738.
- [42] 刘超. 补阳还五汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2004.
- [43] 刘芳, 王宇红, 邵乐, 等. 补阳还五汤精简方对大鼠中动脉阻塞模型大鼠海马组织Cdk5的调控 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(8): 1176-1181.
- [44] 赵欣, 姬孟艳, 董强. 补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠神经元自噬的保护作用及机制分析 [J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(9): 910-914.
- [45] 刘俊娥, 张继平. 补阳还五汤抗脑缺血神经细胞凋亡实验研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(9): 110-112.
- [46] 胡小勤, 付蓉, 曾学文, 等. 补阳还五汤对高血压病气虚血瘀证内皮细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(12): 22-27.
- [47] 游宇, 李林, 侯贝贝, 等. 补阳还五汤抗ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化作用与调控巨噬细胞自噬的机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 2-6.
- [48] 赵冯岩, 杨浩澜, 朱炎贞, 等. 基于网络药理学从铁死亡途径研究补阳还五汤调控缺血性脑卒中的作用机制 [J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(7): 1065-1072.
- [49] 陈博威, 唐荣梅, 易健, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠海马组织circRNA-miRNA-mRNA转录网络的影响 [J]. 中草药, 2022, 53(1): 143-153.
- [50] 陈博威, 徐雅倩, 唐荣梅, 等. 基于miRNA微阵列探讨补阳还五汤对脑缺血大鼠神经血管单元的保护机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2022, 33(3): 333-341.
- [51] 陈博威, 刘柏炎, 黄昕, 等. 补阳还五汤对急性脑梗死患者血清外泌体lncRNA表达谱的研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2021, 23(6): 1988-1996.

- [52] 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念 [J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- [53] 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.
- [54] Liu C X, Cheng Y Y, Guo D A, *et al.* A new concept on quality marker for quality assessment and process control of Chinese medicines [J]. *Chin Herb Med*, 2017, 9(1): 3-13.
- [55] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, *et al.* Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 349-356.
- [56] 李海英, 贺琪珺, 邓凯文, 等. 基于超分子“气析”理论构建中药质量标志物的印迹性新评价体系 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4771-4778.
- [57] Wang K, Lei L, Cao J Y, *et al.* Network pharmacology-based prediction of the active compounds and mechanism of Buyang Huanwu Decoction for ischemic stroke [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1050.
- [58] Wen X D, Liu E H, Yang J, *et al.* Identification of metabolites of Buyang Huanwu Decoction in rat urine using liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 67/68: 114-122.
- [59] 沈晓, 郑华珠, 孟英姣, 等. 补阳还五汤吸收入脑及入血成分的 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2): 8-13.
- [60] Yang D H, Cai S Q, Liu H Y, *et al.* On-line identification of the constituents of Buyang Huanwu Decoction in pig serum using combined HPLC-DAD-MS techniques [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2006, 831(1/2): 288-302.
- [61] 黄海艳, 祝赫, 韩彬, 等. 补阳还五汤血浆指纹图谱的建立 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(15): 96-99.
- [62] 邓常青, 唐映红, 贺福元. 补阳还五汤各有效成分部位及其组方对小鼠脑缺血的影响 [J]. 湖南中医学院学报, 1999(4): 1-3.
- [63] 陈瑞芬. 补阳还五汤有效部位对大鼠脑缺血再灌注后炎症相关因子和 Capase 表达的作用 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2005.
- [64] 吴常青, 汪春彦, 邵旭, 等. 补阳还五汤有效部位对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 114-117.
- [65] 张淑萍, 梁燕, 邓常青. 补阳还五汤和其有效部位对大鼠脑缺血再灌注后 IL-1 β 及相关因子表达的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2007, 27(2): 24-27.
- [66] 黄胜, 袁莉, 陈安, 等. 补阳还五汤及其四类有效部位对脊髓损伤大鼠大脑运动皮质的神经保护作用 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(9): 36-39.
- [67] 杨静. 补阳还五汤及主要有效部位对大鼠动脉血栓形成 TXA₂、PGI₂ 的作用及抗血小板的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [68] 刘旺华, 张秋雁, 李花, 等. 补阳还五汤有效成分部位对大鼠脑缺血后白细胞浸润的影响 [J]. 湖南中医学院学报, 2003(6): 1-3.
- [69] 张军, 陈汀波, 陈军, 等. HPLC 法同时测定补阳还五汤中毛蕊异黄酮苷、芍药苷、羟基红花黄色素 A 的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(4): 373-375.
- [70] 王健, 孙瑜, 陈磊, 等. 芒柄花素的现代研究进展 [J]. 山西中医学院学报, 2017, 18(5): 74-76.
- [71] 李锐, 付铁军, 及元乔, 等. 膜荚黄芪与蒙古黄芪化学成分的高效液相色谱-质谱研究 [J]. 分析化学, 2005, 33(12): 1676-1680.
- [72] 雷明. 补阳还五汤及黄芪红花“益气活血”功效物质基础的移行分析 [D]. 广州: 广东药学院, 2015.
- [73] 朱丽, 李静. 不同剂量黄芪配伍的补阳还五汤对缺血性脑卒中患者血液流变学及疗效的影响 [J]. 陕西中医, 2014, 35(9): 1145-1147.
- [74] 王震, 卢小燕, 刘璐. 不同剂量黄芪配伍的补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的临床疗效及其对神经功能和血液流变学的影响 [J]. 临床合理用药杂志, 2021, 14(9): 1-3.
- [75] 王玮玮, 姜丽, 张启云, 等. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化 8 个效应成分 UPLC-MS/MS 测定方法研究 [J]. 药物分析杂志, 2021, 41(1): 29-41.
- [76] 王露, 宗宁峰, 姜漫, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定补阳还五汤中 6 种成分含量 [J]. 国际中医中药杂志, 2019, 41(2): 177-181.
- [77] 饶晓玲, 谢虹虹, 廖卫国. HPLC 同时测定补阳还五汤中的川芎嗪、阿魏酸含量 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(S1): 21-22.
- [78] 王玎. 血小板固相色谱法对补阳还五汤“行血”药效成分的探索研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [79] Liu E H, Qi L W, Cheng X L, *et al.* Simultaneous determination of twelve bioactive constituents in Buyang Huanwu Decoction by HPLC-DAD-ELSD and HPLC-TOF/MS [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(2): 125-131.
- [80] Shaw L H, Chen W M, Tsai T H. Identification of multiple ingredients for a Traditional Chinese Medicine preparation (Bu-Yang-Huan-Wu-Tang) by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry [J]. *Molecules*, 2013, 18(9): 11281-11298.
- [81] Zhang W W, Feng X U, Wang D, *et al.* Buyang Huanwu Decoction ameliorates ischemic stroke by modulating multiple targets with multiple components: *In vitro* evidences [J]. *Chin J Nat Medicines*, 2018, 16(3):9.
- [82] 郑华珠. 红细胞膜固相色谱法进行补阳还五汤“行血活

- 血”效应成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2018.
- [83] 廖丰蕴. 脑微血管内皮细胞膜固相色谱法进行补阳还五汤中效应成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [84] Liao F Y, Yu A M, Yu J Y, *et al.* Identification of active ingredients mediating anti-platelet aggregation effects of Buyang Huanwu Decoction using a platelet binding assay, solid phase extraction, and HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1092: 320-327.
- [85] Yu A M, Zheng H Z, Yan X L, *et al.* Erythrocyte membrane affinity chromatography, solid-phase extraction and UPLC-QTOF-MS/MS to screen active ingredients of Buyang Huanwu Decoction [J]. *RSC Adv*, 2019, 9(50): 29217-29224.
- [86] 吴银爱. 神经元样 PC12 细胞膜固相色谱法进行补阳还五汤效应成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [87] 赵燕玲, 曲友直. 补阳还五汤及拆方对脑缺血后髓过氧化物酶活性及神经细胞凋亡的影响 [J]. *中国中医急症*, 2007, 16(3): 317-318.
- [88] 李淑贞, 杨桂染, 杨艳梅, 等. 补阳还五汤及拆方预处理对 MIRI 家兔心功能的影响 [J]. *西南国防医药*, 2010, 20(1): 13-16.
- [89] 李淑贞, 闫瑞霞, 刘娜. 补阳还五汤及拆方预处理对心肌缺血再灌注损伤兔一氧化氮和心肌酶的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(16): 3072-3074.
- [90] 崔翰博, 韩涛, 张东钰, 等. 补阳还五汤及拆方对代谢综合征模型大鼠胰岛素、TXA₂ 水平的影响 [J]. *山东中医药大学学报*, 2011, 35(5): 446-447.
- [91] 饶晓玲, 谢虹虹, 廖卫国. HPLC 同时测定补阳还五汤中的川芎嗪、阿魏酸含量 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2016, 16(S1): 21-22.
- [92] Zhang Y T, Xiao M F, Liao Q, *et al.* Application of TQSM polypharmacokinetics and its similarity approach to ascertain Q-Marker by analyses of transitivity *in vivo* of five candidates in Buyanghuanwu Injection [J]. *Phytomedicine*, 2018, 45: 18-25.
- [93] 余健焯. 补阳还五汤在脑缺血损伤大鼠药动学和抗氧化动力学研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [94] 陈思阳. 补阳还五汤谱动力学与谱效动力学关联性的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [95] 杨岩涛. 补阳还五汤抗脑缺血靶点网络系统的特征研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [96] 樊启猛. 补阳还五汤成分靶点作用域的网络动力学研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [97] 刘润润, 孙爱清, 于小钧, 等. 肉豆蔻化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(14): 4682-4700.
- [98] 华新振, 刘丛颖, 贺梦媛, 等. 细辛化学成分和药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(12): 4019-4035.
- [99] 顾潇, 李臻阳, 商娟, 等. 天舒胶囊化学成分、药理作用和临床应用的研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(8): 2686-2697.
- [100] 王明慧, 马飞, 田崇娅, 等. 当归四逆汤化学成分、药理作用和临床应用的研究进展及质量标志物 (Q-Marker) 的预测分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 991-1001.
- [101] 潘雪, 樊启猛, 余格, 等. 基于超分子“印迹模板”特性的中药质量标志物研究模式的思考 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4569-4575.
- [102] 贺福元, 周宏灏, 罗杰英. 多成分药物代谢网络动力学数学模型建立及参数分析 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(12): 1321-1331.

[责任编辑 赵慧亮]