

• 数据挖掘与循证医学 •

基于 BiGRU-复合时序注意力网络的补阳还五汤多成分多靶点动态时空响应机制研究

刘 灿^{1,2,3}, 贺 鹏¹, 譙 茹^{1,2,3}, 何文君^{1,2}, 贺福元^{1,2,3*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 中药成药性与制剂制备湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

3. 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

摘要: **目的** 建立基于双向门控循环单元(bidirectional gated recurrent unit, BiGRU)与时序注意力机制的可解释深度学习模型, 解析补阳还五汤干预脑缺血过程中多成分-多靶点的动态时空响应机制。**方法** 构建大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型, 于给药后多个时间点采集血浆和脑组织样本, 分别采用 UPLC-MS/MS 测定 14 种补阳还五汤活性成分血药浓度, ELISA 检测 15 个脑组织关键靶点表达水平, 构建多成分-多靶点时序数据集。基于滑动窗口策略建立 BiGRU-时序注意力网络, 并结合留一批次交叉验证(leave-one-batch-out cross-validation, LOBO-CV)及 Bootstrap 重抽样评价模型性能与稳定性, 同时解析模型提示的高贡献时间点、潜在相关成分及响应靶点特征。**结果** 模型在 LOBO-CV 中表现出良好的预测性能, 各测试集 R^2 均大于 0.80, 均方误差(mean squared error, MSE)均小于 0.20。时间注意力分析识别给药后 10 h 为模型关注度较高的时间节点(注意力峰值为 0.602 6); 梯度归因分析筛选出丹皮酚、毛蕊异黄酮和芒柄花黄素为主要驱动成分, 脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)、蛋白激酶 G II 型(protein kinase G type II, PKG2)和钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II(calmodulin-dependent protein kinase II, CAMK2)为关键响应靶点。Bootstrap 重抽样结果显示, 10 h 关键时间窗的识别频率达到 90%, 提示模型具有较好的稳定性。**结论** 建立了基于 BiGRU 与时序注意力机制的补阳还五汤多成分-多靶点动态时空解析方法, 尝试为补阳还五汤抗脑缺血作用机制研究提供新的时序证据, 并为中药复方动态药理机制研究提供参考。

关键词: 补阳还五汤; 缺血性卒中; 双向门控循环单元; 时序注意力; 深度学习; 丹皮酚; 毛蕊异黄酮; 芒柄花黄素

中图分类号: TP18; R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)18-7347-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.18.022

Dynamic spatiotemporal response mechanisms of multi-component and multi-target effects of Buyang Huanwu Decoction based on BiGRU-integrated temporal attention network

LIU Can^{1,2,3}, HE Peng¹, QIAO Ru^{1,2,3}, HE Wenjun^{1,2}, HE Fuyuan^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Provincial Key Laboratory of Drugability and Preparation Modification of TCM, Changsha 410208, China

3. Laboratory of Supramolecular Mechanism and Mathematical Characterization of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To establish an interpretable deep learning model based on a bidirectional gated recurrent unit (BiGRU) and a temporal attention mechanism to elucidate the dynamic spatiotemporal response mechanisms of the multi-component-multi-target interactions underlying the effects of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) against ischemic stroke (IS). **Methods** A rat model of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was established. Plasma and brain tissue samples were collected at multiple time points after administration. Plasma concentrations of 14 active components of BYHWD were quantified by UPLC-MS/MS, and the expression

收稿日期: 2026-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(82274215); 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30453); 湖南省研究生科研创新项目(CX20251190); 湖南中医药大学 2022 年度校级“揭榜挂帅”专项(2022-XJJB001)

作者简介: 刘 灿, 博士研究生, 从事超分子机制与数理特征化研究。E-mail: liucan@stu.hnucm.edu.cn

***通信作者:** 贺福元, 教授, 博士生导师, 从事中药药剂、药理与药性的现代化理论/技术与方法(超分子化学)研究。

E-mail: pharshmsharking@163.com

levels of 15 key targets in brain tissue were determined by ELISA to construct a multi-component–multi-target time series dataset. A BiGRU-based temporal attention network was established using a sliding window strategy, and leave-one-batch-out cross-validation (LOBO-CV) combined with bootstrap resampling was employed to evaluate model performance and stability. The model was further interpreted to identify highly contributive time points, potential key components, and responsive target features. **Results** The model demonstrated good predictive performance in LOBO-CV, with an R^2 value greater than 0.80 and a mean squared error (MSE) below 0.20 across all test sets. Temporal attention analysis identified 10 h post-administration as a time point receiving high model attention, with an attention peak value of 0.602 6. Gradient attribution analysis identified paeonol, calycosin, and formononetin as the major driving components, while brain derived neurotrophic factor (BDNF), protein kinase G type II (PKG2), and calmodulin-dependent protein kinase II (CAMK2) were identified as the key responsive targets. Bootstrap resampling showed that the 10 h critical time window was identified with a frequency of 90%, indicating good model stability. **Conclusion** This study established a BiGRU and temporal attention-based approach for dynamic time series analysis of the multi-component–multi-target actions of BYHWD. The proposed method provides new temporal evidence for elucidating the mechanisms underlying the anti-IS effects of BYHWD and offers a reference for investigating the dynamic pharmacological mechanisms of traditional Chinese medicine formulas.

Key words: Buyang Huanwu Decoction; ischemic stroke; bidirectional gated recurrent unit; temporal attention; deep learning; paeonol; calycosin; formononetin

缺血性卒中长期位居全球致死与致残性疾病前列,其临床负担沉重,几乎贯穿神经系统疾病防治研究的整个过程^[1-2]。脑缺血发生之时,能量代谢迅速失衡,炎症网络被激活,氧化应激持续累积,细胞凋亡程序逐步放大^[3-5]。多重病理环节彼此交织,共同塑造了脑损伤的复杂进程。因此,单一靶点策略在往往难以完全覆盖疾病发展的全貌^[6]。

补阳还五汤源于清代王清任《医林改错》,历经长期的临床实践,其益气活血、通络复元的治疗理念在缺血性卒中防治领域展现出较高的应用价值^[7]。从现代研究视角来看,这一经典方剂的优势在于其整体调控能力,而非依赖某一孤立机制。其中的黄芪甲苷、芒柄花素、川芎嗪等活性成分共同构成了复杂的药效网络,在体内并行作用于炎症调控、神经保护、血管生成及细胞存活等多个生物过程^[8-10]。中药复方在体内的吸收、分布、代谢和排泄(absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME)是一个高度动态的过程^[11-12],仅仅探明其含有哪些成分或能干预哪些靶点是远远不够的,探究多成分药动学(pharmacokinetics, PK)浓度的时序变化如何驱动多靶点药效学(pharmacodynamics, PD)网络的时空演变,即揭示“PK-PD 动态联合规律”是阐明补阳还五汤等复杂组方现代科学内涵的核心与关键。

以深度学习为代表的人工智能技术在处理如多时间点、多批次、非线性与复杂时序的药动学数据方面展现出传统动力学模型难以企及的优势。传统的基于生理学的药动学(physiologically-based

pharmacokinetic, PBPK)模型在处理少数几种成分时表现良好,但面对中药复方的巨大参数空间时,往往会面临维度灾难。相比之下,深度时序网络能够以数据驱动的方式自适应地学习变量间的非线性映射关系^[13-14]。特别是双向门控循环单元(bidirectional gated recurrent unit, BiGRU)能够同时捕捉药物在体内过程中属于正向的动态信息和反向的时序依赖关系^[15-16]。时间注意力机制的引入,在很大程度上改变了传统模型对所有时间节点分配平均关注度的局限,使其更适合解析真实生物体系中的复杂行为^[17]。

尽管计算机技术研究发展迅速,但是当前关于中药复方机制的研究仍存在瓶颈。网络药理学研究更像是在做静态映射,所得出的成分-靶点网络缺乏真实生理和时间维度的动态过程,无法还原复方的整体协同效果^[18]。当尝试引入深度学习解析大规模时序数据时,动物实验固有的高成本与小样本特性极易导致复杂神经网络过拟合。同时,深度学习的“黑盒”属性使得研究者往往只能得到一个高精度的预测结果,却无法逆向解析出具体的生物学机制,导致计算模型在实际药学与生物学指导上的应用价值大打折扣。

本研究提出一种基于复合时序注意力网络的动态时空响应机制解析框架(图1),尝试揭示补阳还五汤干预缺血性卒中机制研究。通过构建补阳还五汤多成分 PK 与脑缺血多靶点 PD 的时序数据集,引入滑动窗口,结合 BiGRU 与时序注意力模块进行高维时空特征编码,对补阳还五汤干预脑缺血卒

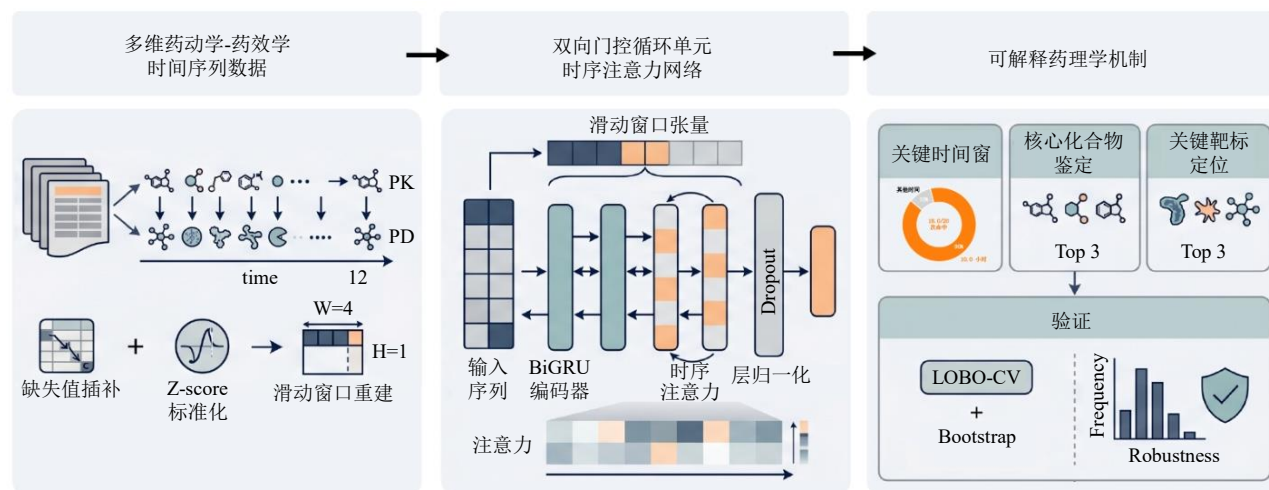


图 1 多维时间序列深度学习框架示意图

Fig. 1 Schematic diagram of deep learning framework for multidimensional time series

中的高贡献时间节点、潜在相关成分及响应特征靶点进行识别与分析。通过留一批交叉验证 (leave-one-batch-out cross-validation, LOBO-CV) 和 Bootstrap 重抽样分析, 对模型预测结果的稳定性进行评价, 结合梯度归因方法提高模型结果的可解释性, 为补阳还五汤抗脑缺血潜在动态作用机制的研究提供新的分析思路和实验参考。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

甲酸 (上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号 C2203135)、乙腈 (Tedia 公司, 批号 24046180) 和甲醇 (Tedia 公司, 批号 24036065) 均为色谱纯。水为娃哈哈纯净水, 0.22 μm 尼龙微孔滤膜。丹皮酚 (批号 110708-201407)、黄芪甲苷 (批号 110781-201616)、阿魏酸 (批号 110773-201614)、芍药苷 (批号 110736-201842)、芒柄花素 (批号 111703-201504)、槲皮素 (批号 100081-201610) 均来源于中国食品药品检定研究院; 毛蕊异黄酮 (批号 Y14J8Y39707)、毛蕊异黄酮葡萄糖苷 (批号 111920-201606)、川芎嗪 (批号 KJ0622CA14)、洋川芎内酯 H (批号 S25GB162334)、氧化芍药苷 (批号 N26GB169459)、刺芒柄花苷 (批号 P03A10F84910) 和苯甲酰芍药苷 (批号 P21A9568357) 均来源于上海源叶生物科技有限公司; 洋川芎内酯 I (乐美天医药科技有限公司, 批号 DSTDY00901)。所有对照品的质量分数均大于 98%。

B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、

Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)、氨基末端激酶 3 (jun kinase 3, JNK3)、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、蛋白激酶 G II 型 (protein kinase G type II, PKG2)、钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II (calmodulin-dependent protein kinase II, CAMK2)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)、脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF)、热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP-70)、神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、死亡相关蛋白激酶 1 (death-associated protein kinase 1, DAPK1)、血管内皮生长因子受体-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 大鼠酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒均购自上海抚生生物科技有限公司, 批号分别为 20241009A08、20241009B30、20241009D13、20241009B40、20241009C98、20241009B42、20241009B36、20241009B28、20241009B46、20241009A58、20241009A52、20241009B34、20241009B80、20241009C11 和 20241009C85。

1.2 动物与伦理

120 只雄性 SD 大鼠购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 体质量 (220 $\pm$ 20) g。动物饲养于

湖南中医药大学实验动物中心的 SPF 环境中（动物许可证号 ZS-202506170027），自由进食饮水，光照周期为 12 h 光照和 12 h 黑暗。

采用 Longa^[19]的方法构建大鼠大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion, MCAO）模型。每个时间点采用不同大鼠进行终点取样，每个时间点纳入 6 只造模成功的大鼠作为生物学重复。腹主动脉采集血浆，采血完成后迅速开颅取脑，完整分离脑组织样本，于-80℃保存待测。在后续数据分析中，将 17 个时间点对应的 6 个生物学重复分别连接形成 6 条独立时间序列，并作为 BiGRU 模型中的 6 个生物学批次进行 LOBO-CV。所有实验均在湖南中医药大学实验动物中心进行，并经机构动物伦理委员会批准（批准号 SLBH-202504010003，2025 年 4 月 1 日）。

1.3 含药血浆成分含量测定

1.3.1 补阳还五汤、血浆样品和对照品的制备

（1）补阳还五汤的制备：补阳还五汤由黄芪（批号 RS25022001）、当归（批号 NG25021701）、赤芍（批号 ZR24112606）、川芎（批号 XH25012108）、红花（批号 ZR24121705）、桃仁（批号 2412300072）、地龙（批号 2409274）按 60：9：9：6：9：9：9 的比例组成。所有药材均购自湖南中医药大学第一附属医院，并由湖南中医药大学药学院石继连教授鉴定，符合《中国药典》2025 年版规定。混合药材以 8：1（体积/质量）的比例浸泡于蒸馏水中 1 h，然后将混合物煮沸并在武火下保持 0.5 h，随后用文火保持 1 h。此提取过程重复 2 次，合并滤液，浓缩至相当于生药浓度 1.85 g/mL，并在 4℃下保存备用。基于前期文献检索及补阳还五汤化学成分研究结果，优先纳入已证实存在于补阳还五汤、具有明确化学结构及可获得对照品，并具有与缺血性卒中相关活性的成分，最终确定 14 种化学成分作为代表性分析物进行含药血浆中的定量测定。

（2）血浆样品的制备：精密吸取 200 μL 血浆样品，加入甲醇 600 μL，充分涡旋混合后，于 4℃，12 000 r/min 离心 15 min。取上清，氮气吹干，加入 100 μL 甲醇复溶，超声完全溶解后，于 4℃、12 000 r/min，再次离心 15 min，取上清，装入进样小瓶待测。

（3）对照品的制备：每种对照品均用 70%甲醇溶解，并依次稀释为 6 个校准浓度，用于定量分析血浆中代表性成分。所有样品和对照品溶液均通过

0.22 μm 尼龙膜滤过。

1.3.2 UPLC-MS/MS 条件 采用配备电喷雾离子源（ESI）的 Waters Xevo TQD 三重四极杆质谱仪进行液质分析。离子源温度设定为 400℃，氮气为雾化气和辅助气，氦气为碰撞气。鞘气体积流量为 1 000 L/h，碰撞气体积流量为 50 L/h，毛细管电压保持在 2 500 V。

色谱分离在 Waters ACQUITY UPLC® H-Class 系统上进行，BEH Shield RP₁₈（50 mm×2.1 mm，1.7 μm）色谱柱。流动相为 0.01%甲酸水溶液和乙腈，梯度洗脱，洗脱条件见表 1。体积流量为 0.3 mL/min，柱温为 35℃，进样量 1 μL。

1.4 靶点筛选及其含量测定

缺血性卒中优先筛选与炎症反应、细胞凋亡、神经营养、信号转导等关键病理过程密切相关的 15 个代表性靶点进行 ELISA 检测，具体筛选依据见表 2。脑组织从-80℃中取出，解冻后按照 1：4 加入 PBS 缓冲液，并转移至 15 mL 离心管中。使用全自动匀浆仪在冷浴条件下研磨得到匀浆，4℃、4 000 r/min 离心 10 min，取上清备用。按照“1.1”项中

表 1 液相色谱梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions for liquid chromatography

t/min	0.01%甲酸水/%	乙腈/%
0~3	99.0	1.0
3~4	99.0~93.0	1.0~7.0
4~8	93.0~87.5	7.0~12.5
8~12	87.5~75.0	12.5~25.0
12~20	75.0~20.0	25.0~80.0
20~22	20.0~99.0	80.0~1.0
22~26	99.0	1.0

表 2 15 个缺血性卒中相关药效学靶点的生物学功能及选择依据
Table 2 Biological functions and selection rationale of 15 targets related to ischemic stroke

靶点	生物学功能	参考文献
TNF-α、IL-6、炎症反应		20
JAK2、P38MAPK		
HSP-70、nNOS	氧化应激	21
Bcl-2、DAPK1、神经元凋亡		22-24
JNK3、PI3K		
BDNF、CAMK2	神经修复	25
VEGFR-2、MMP-9	血管生成与血脑屏障	26-27
PKG2	信号转导	28

试剂盒厂家说明书操作。反应终止后于 450 nm 波长测定各孔吸光度 (A) 值, 并根据标准曲线计算靶点浓度。

1.5 多维时序数据集的构建与预处理

考虑到时间序列的连续性, 本研究采用双向线性插值法, 并结合前向填充与后向填充策略, 对偶发缺失值进行补全。对于血药和靶点的浓度变化在数量级上的差异 (ng 与 pg 数量级差异), 对各特征维度实施了独立的 Z -score 标准化处理, 以尽量消除量纲差异带来的影响, 并降低深度学习模型在反向传播过程中出现梯度风险。

$$x_{\text{norm}} = (x - \mu) / (\sigma + \delta) \quad (1)$$

其中, x 为原始特征值, μ 和 σ 分别为对应特征在训练集中的均值与标准差, x_{norm} 为标准化后的特征值, $\delta = 1 \times 10^{-8}$ 为防止除零错误的平滑项。为防止数据泄露, 标准化参数的拟合严格限制在训练批次内进行。

1.6 滑动窗口时序样本重构

为探究药物成分影响下游靶点的机制, 引入了滑动窗口策略重构时序样本。时间窗长度 (W) 设置为 4, 即涵盖过去 4 个时间点的历史状态, 预测步长 (H) 为 1。对于任一批次内按时间顺序排列的序列, 记第 t 个时间点的成分浓度向量为 $c_t \in R^C$, 其中 $C=14$, 对应靶点浓度向量为 $s_t \in R^T$, $T=15$ 。为保留采样时序信息, 将绝对时间变量进行标准化后作为附加特征, 记为 τ_t 。则在任一滑动窗口内, 模型输入如下表示。

$$X_t = \begin{bmatrix} c_{t-W+1} & \tau_{t-W+1} \\ c_{t-W+2} & \tau_{t-W+2} \\ \vdots & \vdots \\ c_t & \tau_t \end{bmatrix} \in R^{W \times (C+1)} \quad (2)$$

其预测目标定义为下一时刻的靶点浓度向量 y_t , 即 $y_t = s_{t+H} \in R^T$, R 表示实数。

1.7 复合时序注意力网络架构

本研究构建结合 BiGRU 与时间注意力机制的深度学习架构, 尝试解决多成分-多靶点中药复方网络存在高度非线性、动态的时空特征^[20-21]。输入序列 X_t 被送入双层 BiGRU 编码器。BiGRU 能够同时提取药物体内代谢的正向动力学延展特征与反向时间依赖约束, 输出结合了上下文信息的隐含状态序列 $h_t \in R^{W \times D}$ (D 为隐藏层维度)。为使模型能够自主聚焦于对药效网络干预最关键的时间节点, 研究设计

了时间注意力模块。注意力权重 α_t 的计算过程如下。

$$e_t = W_2 \tanh(W_1 h_t + b_1) + b_2 \quad (3)$$

$$\alpha_t = \frac{\exp(e_t)}{\sum_{j=1}^W \exp(e_j)} \quad (4)$$

$$C_{\text{content}} = \sum_{t=1}^W \alpha_t h_t \quad (5)$$

其中, e_t 为第 t 个时间步的注意力评分, h_t 为第 t 个时间步的隐藏状态向量。聚合向量 C_{content} 依次经过层归一化、Dropout (值设置为 0.20) 及多层感知机 (multi-layer perceptron, MLP) 的非线性映射, 最终输出靶点网络的预测轨迹。

模型采用均方误差 (mean squared error, MSE) 作为损失函数, 使用 Adam 优化器进行参数更新 (L2 正则化权重衰减系数为 1×10^{-4} , 初始学习率为 1×10^{-3})。

1.8 核心时空机制的解释性提取算法

在模型收敛后, 为突破深度学习模型“黑盒”属性, 本研究进一步构建了融合时间注意力权重与梯度归因的解释性提取算法, 用于识别配伍体系干预靶点网络的高贡献时间点和潜在相关成分。

在时间维度上, 提取模型对全体滑动窗口样本的注意力权重, 最高的时间点定义为高贡献时间窗, 揭示补阳还五汤发挥主要调控效应的核心时间段。于该关键时间窗内进一步采用梯度乘输入方法进行成分归因分析。对模型输出关于输入特征的梯度进行反向传播, 并将梯度值与对应输入值相乘, 得到各成分特征的显著性得分 (S_i), 其计算公式如下。

$$S_i = \left| \frac{\partial \hat{y}}{\partial x_i} \cdot x_i \right| \quad (6)$$

其中, $\hat{y}$ 表示模型预测输出, x_i 表示第 i 个输入成分特征。之后按显著性得分排序, 选取排名前 3 的成分作为驱动该关键时间窗靶点网络波动的核心药效物质基础。为确定补阳还五汤的下游效应因子, 提取该时间窗内模型预测偏离度最高的前 3 个靶点, 即标准化预测响应强度绝对值最大的靶点, 作为关键响应靶点。

1.9 交叉验证与 Bootstrap 稳定性评估

鉴于体内实验样本量有限, 而且不同批次之间通常存在较明显的生物学波动, 本研究采用 LOBO-CV 策略^[29]。在每一轮的训练中, 均将 1 个完整且彼此独立的批次单独作为外部测试集, 其余批次则用于模型训练和内部验证。尽量避免测

试批次在参数学习和标准化处理过程中被提前泄露，从而使模型在跨批次条件下的泛化表现更接近真实情况。同时，小样本条件下模型容易受到偶然拟合的影响。本研究进一步引入 Bootstrap 重抽样策略来检验结果的稳定性。具体做法是对训练批次进行有放回抽样，并在不同抽样扰动下重复执行模型训练与机制提取过程 20 次。每一次重抽样都会重新构建训练集、重新拟合模型参数，并分别提取模型贡献较高的时间节点、潜在相关成分及高贡献响应靶点。随后，统计这些机制特征在全部重复实验中的出现频率，以此对其稳定

性作出定量判断。

2 结果

2.1 时序数据集特征分析

本研究的数据集整合了补阳还五汤干预缺血性卒中的多成分药动学 PK 与多靶点药效学 PD 时空序列。数据集包含 6 个独立生物学批次，每个批次都在 0.08~12 h 的 17 个时间点上同步测定了 14 种核心活性成分血药浓度与 15 个关键靶点的表达水平，形成高维、多变量、跨时间尺度的复杂动态网络。成分和靶点的标准曲线方程与线性范围见表 3、4。黄芪甲苷、洋川芎内酯 H、洋川芎内酯 I、川芎嗪、

表 3 14 种成分的标准曲线
Table 3 Standard curves for 14 components

序号	化合物	线性方程	R ²	线性范围/(ng·mL ⁻¹)
1	丹皮酚	y=1 249.5 x-123 984	0.998 9	0.108 9~543
2	黄芪甲苷	y=91.698 x-55.825	0.999 8	4.64~9 280
3	阿魏酸	y=173.75 x+5 648.7	0.993 8	0.106 7~1 067
4	毛蕊异黄酮	y=227.96 x+28 552	0.998 9	0.202 4~1 012
5	毛蕊异黄酮葡萄糖苷	y=7.735 x+1 120.5	0.999 3	4.7~9 400
6	芒柄花素	y=175.59 x-10 111	0.998 5	5.11~10 220
7	川芎嗪	y=391.03 x+287 766	0.993 6	0.091 9~919
8	洋川芎内酯 H	y=185.14 x+44 270	0.997 9	0.603~6 030
9	氧化芍药苷	y=10.085 x-12.91	0.998 7	10.1~10 100
10	洋川芎内酯 I	y=0.941 3 x+8.328 2	0.999 9	0.114 6~573
11	槲皮素	y=1.258 3 x-184.89	0.999 2	1.292~1 292
12	芒柄花黄素	y=874.66 x-5 763.7	0.999 9	0.511~1022
13	刺芒柄花苷	y=309.35 x+167.9	0.995 1	4.525~9 050
14	苯甲酰芍药苷	y=280.88 x-1 205.4	0.991 2	0.46~920

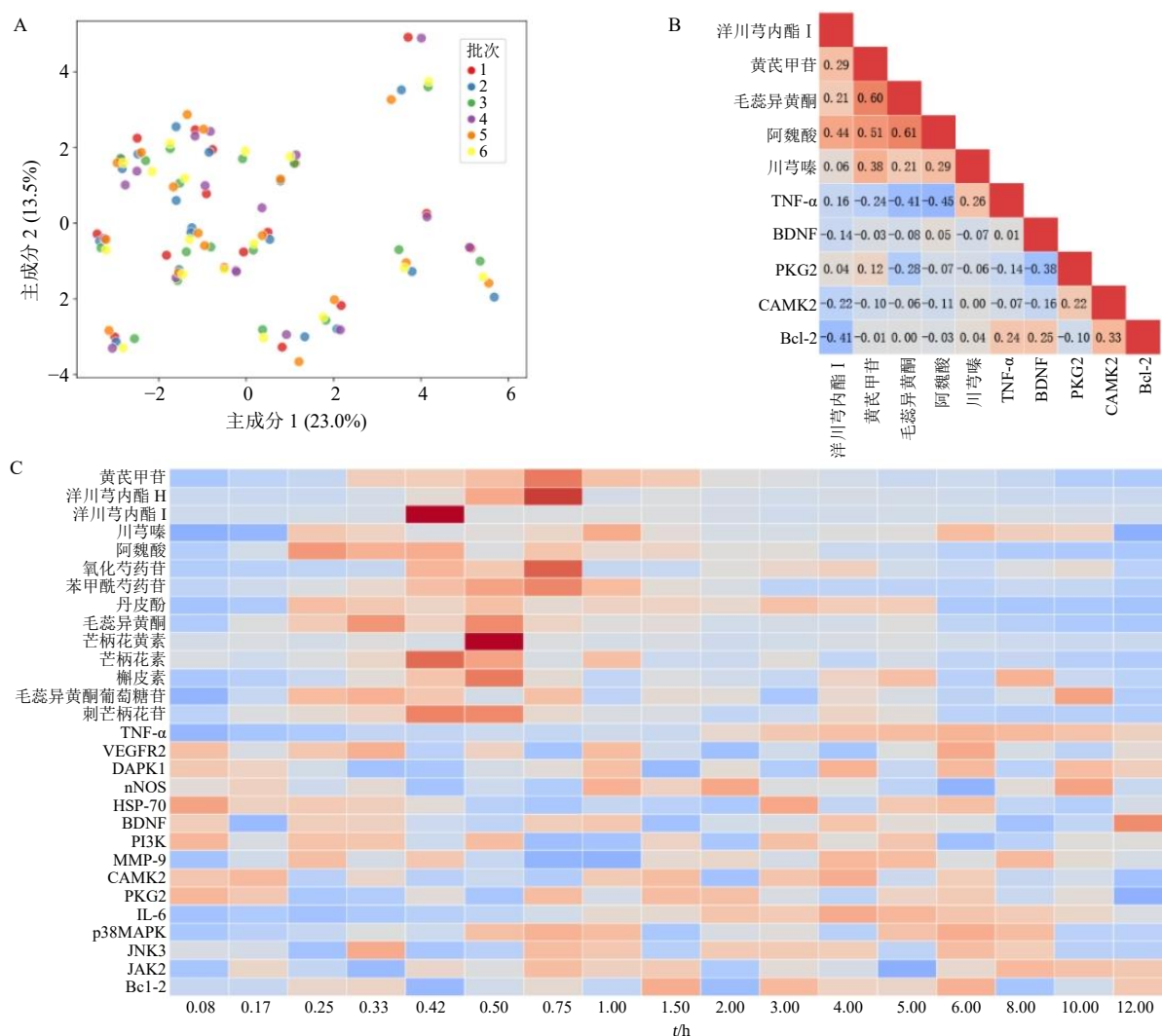
表 4 15 个靶点的标准曲线
Table 4 Standard curves for 15 targets

序号	靶点名称	线性方程	R ²	线性范围
1	Bcl-2	y=101.790 1 x-4.375 9	0.998 2	12.5~200 μg·L ⁻¹
2	JAK2	y=12.683 7 x-0.644 9	0.997 6	1.5~24 pg·mL ⁻¹
3	JNK3	y=36.505 7 x-1.733	0.997 6	5~80 pg·mL ⁻¹
4	P38MAPK	y=19.127 4 x-1.393 3	0.996 4	2.5~40 pmol·L ⁻¹
5	IL-6	y=61.753 0 x-3.675 0	0.996 9	7.5~120 pg·mL ⁻¹
6	PKG2	y=0.904 7 x-0.049 5	0.996 4	0.125~2 ng·mL ⁻¹
7	CAMK2	y=74.552 1 x-5.912	0.997 5	10~160 pg·mL ⁻¹
8	MMP-9	y=43.234 3 x-2.405 4	0.997 3	5~80 μg·L ⁻¹
9	PI3K	y=134.496 0 x-9.253 3	0.996 9	15~240 pmol·L ⁻¹
10	BDNF	y=78.891 4 x-6.143 3	0.995 3	10~160 ng·L ⁻¹
11	HSP-70	y=271.823 1 x-20.846 5	0.996 2	30~480 ng·L ⁻¹
12	nNOS	y=4.281 8 x-0.322 9	0.996 3	0.5~8 μmol·L ⁻¹
13	DAPK1	y=35.391 8 x-2.287 7	0.997 3	5~80 pg·mL ⁻¹
14	VEGFR-2	y=103.816 0 x-7.097 6	0.997 1	12.5~200 pg·mL ⁻¹
15	TNF-α	y=186.529 2 x-13.571 5	0.996 1	22.5~360 ng·L ⁻¹

阿魏酸、氧化芍药苷、苯甲酰芍药苷、丹皮酚、毛蕊异黄酮、芒柄花黄素、芒柄花素、槲皮素、毛蕊异黄酮葡萄糖苷和刺芒柄花苷质量分数分别为 0.015 7%、0.093 9%、0.015 2%、0.024 1%、0.122 0%、0.023 5%、0.030 9%、0.008 4%、0.073 4%、0.020 7%、0.038 8%、0.012 6%、0.158 0%和 0.039 1%。

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 结果见图 2-A。全部样本在前 2 个主成分中呈现出较为清晰的聚集特征, 其中 PC1 和 PC2 分别解释了总方差的 23.0%和 13.5%。从分布形态来看, 不同批次样本并未出现明显分离, 而是以交叉

分布为主, 这一现象在某种程度上说明各批次之间的重复性较好, 数据整体也保持了较高的一致性。为突出主要药效物质与关键响应靶点之间的关联特征, 并提高相关性矩阵的可读性, 选取 5 个关键成分和 5 个关键作用靶点进行展示, 如图 2-B 所示。相关性分析表明, 黄芪甲苷、毛蕊异黄酮及阿魏酸等成分之间呈中等程度正相关, 相关性分布在 0.44~0.61, 暗示其可能构成主要暴露模块。同时, 不同成分与 TNF- α 、BDNF、PKG2、CAMK2 及 Bcl-2 等靶点之间的相关方向和强度并不一致, 这种差异也反映补阳还五汤对缺血性卒中的调控并不是对单一靶点、沿着单一通路展开, 是多成分、多信



A-6 批次药动数据主成分分析; B-成分靶点相关性分析; C-成分靶点的全时序热图。

A-principal component analysis of the pharmacokinetic data from six biological batches; B-correlation analysis between the components and targets; C-heatmap of component-target relationships over the entire time course.

图 2 PCA 及成分与靶点的相关性分析

Fig. 2 PCA and correlation analysis of components with targets

号通路同时参与的结果。时序热图(图 2-C)则把这种动态关系拉回时间轴。多数成分在给药后 0.33~1 h 迅速分布、升高并达到峰值,随后逐渐下降。而靶点响应则普遍存在时间延迟,炎症及凋亡相关靶点多在 2~8 h 的中后期波动明显,神经营养相关靶点则逐渐增强。

2.2 时序模型的预测性能评估

BiGRU 对 15 个靶点浓度变化的预测值均能与

实验真实值很好拟合(图 3)。模型在不同批次数据均保持了较为稳定的预测性能(图 4-A)。各批次测试集的 MSE 整体维持在较低水平($MSE < 0.2$), R^2 数值则保持在 0.80 以上,说明模型能够较好地刻画补阳还五汤干预后,血药成分与脑组织中的下游靶点之间的动态响应关系。训练损失与验证损失均在快速下降后收敛,二者之间未出现明显分离,模型在训练过程中未发生显著过拟合(图 4-B)。

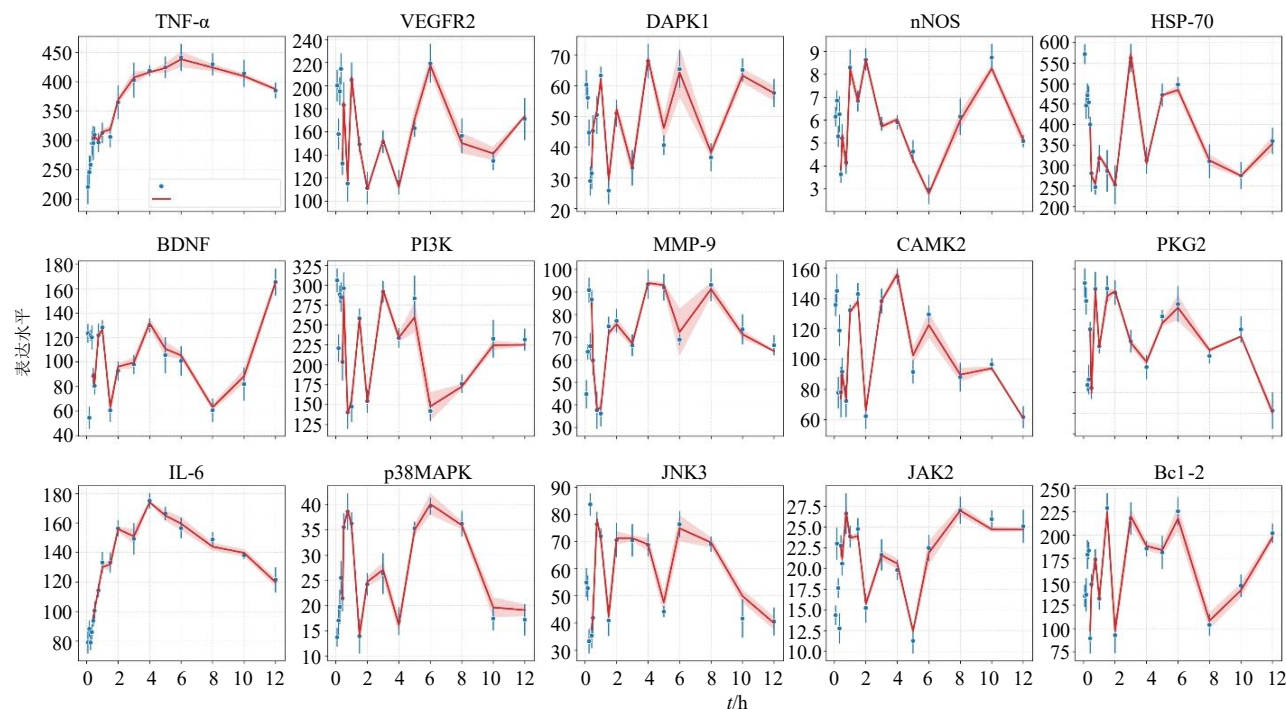


图 3 BiGRU 预测 15 个靶点浓度变化与真实值对比

Fig. 3 Comparison between BiGRU-predicted and observed concentrations of 15 targets

2.3 补阳还五汤抗缺血性卒中的关键时间窗定位

在确认模型具有较好预测能力后,本研究进一步查看了时间注意力权重的分布情况,以寻找补阳还五汤可能发挥主要调控作用的时间段。结果显示,模型并没有将权重平均分配到各个时间点上,而是明显向少数时间点集中(图 4-C)。在全部样本的平均注意力分布中,给药后 10 h 对应的时间点获得了最高注意力得分,峰值为 0.602 6。从整体时间趋势看,注意力权重在早期和中期虽有波动,但在 10 h 附近达到显著峰值,说明该时间点在成分-靶点联合过程中具有更高的信息贡献度。

2.4 影响药理作用的核心物质基础与关键靶点

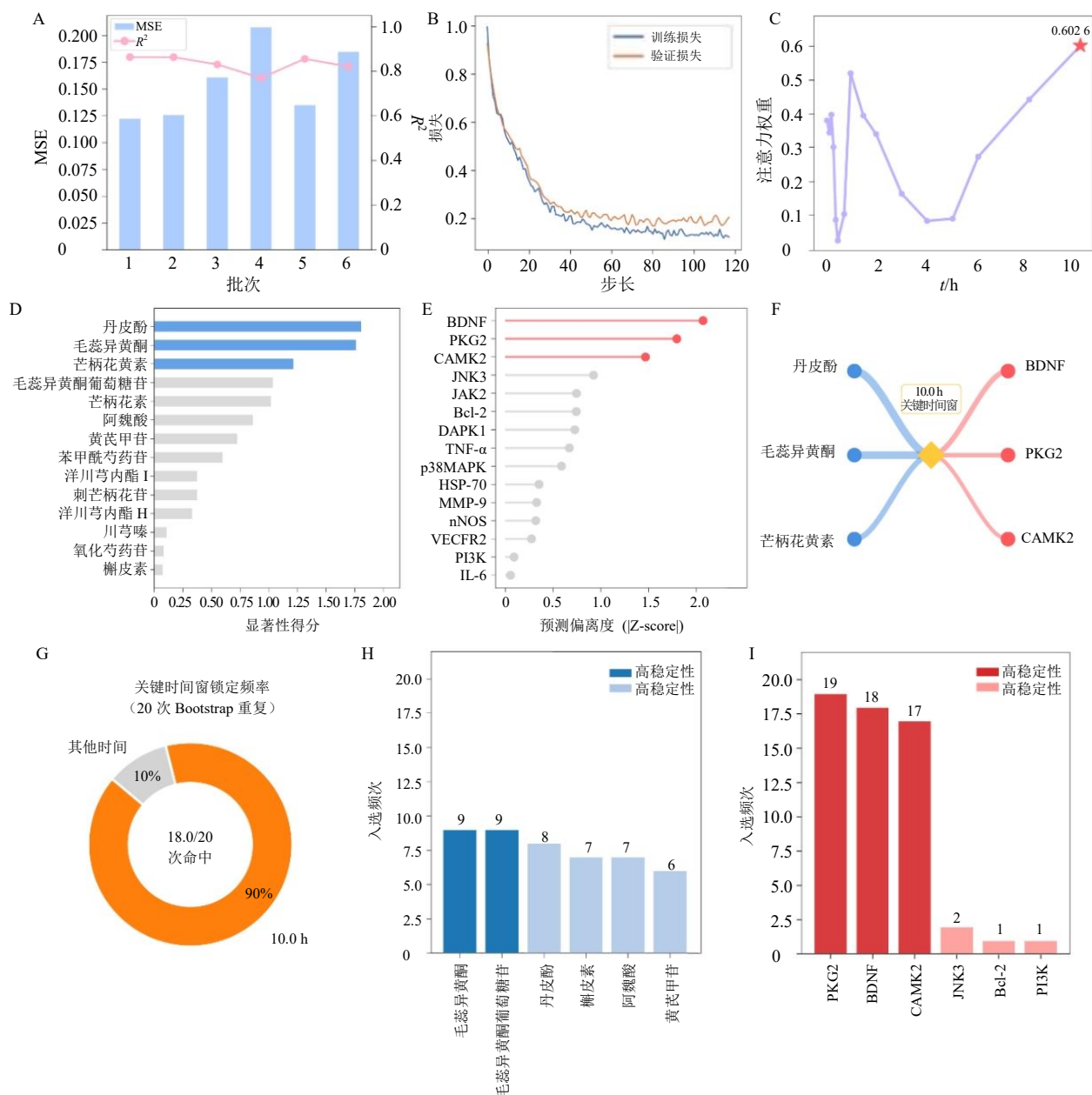
研究进一步采用梯度乘输入归因法,对该关键时间窗内的输入特征进行分析,以识别驱动模型输出的核心成分。结果表明,在 10 h 关键时间窗内,

丹皮酚、毛蕊异黄酮和芒柄花黄素的显著性得分位居前列,分别为 1.810、1.763 和 1.217(图 4-D),明显高于其他成分。结合这一分布可以看出,这些分子很可能是该时点下游靶点响应的主要贡献者。

在靶点端,模型对下一时点响应强度的归因结果显示,BDNF、PKG2 和 CAMK2 的预测偏离度最高,分别为 2.072、1.797 和 1.468(图 4-E),说明这些靶点在该关键时间窗内对药物干预最为敏感。成分-靶点关联示意图(图 4-F)显示,补阳还五汤在关键时间点可能主要通过上述成分对神经保护及信号转导相关靶点产生较强调控作用。

2.5 基于 Bootstrap 的时空药理机制稳定性检验

为检验关键时间窗、成分、靶点识别结果是否稳定,本研究进一步进行了 20 次 Bootstrap 有放回重抽样分析。结果显示,关键时间窗在 20 次重复训



A-留一批交叉验证结果; B-训练过程中训练集与验证集损失变化曲线; C-全局时间注意力权重分布图; D-基于梯度乘输入归因分析筛选的关键时间窗内核心驱动成分排序; E-关键时间窗下响应最显著靶点排序图; F-核心成分-关键靶点关联网络图; G-Bootstrap 重抽样稳定性分析中关键时间窗识别频率分布; H-核心成分的入选频率; I-关键靶点的入选频率。

A-results of LOBO-CV; B-training and validation loss curves during model training; C-distribution of global temporal attention weights; D-ranking of the key driving components within the critical time window identified by gradient $\times$ input attribution analysis; E-ranking of the most responsive targets within the critical time window; F-network of the core components and key responsive targets; G-frequency distribution of the identified critical time window based on Bootstrap resampling; H-selection frequency of the core components; I-selection frequency of the key responsive targets.

图 4 补阳还五汤抗缺血性卒中的时序模型预测性能评估、关键时间窗定位、核心物质基础和关键靶点及稳定性检验

Fig. 4 Evaluation of temporal model prediction performance, localization of critical time windows, core material basis, key targets and stability test of Buyang Huanwu Decoction against ischemic stroke

练中, 10 h 时间点有 18 次被判定为峰值时间点, 占比达到 90% (图 4-G)。在成分层面, 毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮葡萄糖苷在多次重抽样中始终保持

较高出现频次, 提示它们在模型归因排序中的位置相对稳定 (图 4-H)。效应靶点层面也呈现出类似趋势, PKG2、BDNF 和 CAMK2 的重复入选情况最为

突出,分别出现在 19、18 和 17 次重复中(图 4-I)。

3 讨论

本研究围绕补阳还五汤干预脑缺血的动态药理过程,构建了一个融合多成分 PK 与多靶点 PD 的双向时序注意力网络。结合时间注意力和梯度归因方法,从时间、成分和靶点 3 个角度梳理了复方的作用机制。与传统网络药理学主要回答“哪些成分可能作用于哪些靶点”不同,其将成分暴露、靶点响应和时间变化放到同一个框架下一起看。这样处理之后,复方在体内的作用过程就不再只是静态连线,而更像一段真实展开的动态过程,也更贴近中药复方实际发挥作用的方式。

从数据层面来看,本研究构建的多维时序数据集具有较强的药理学信息密度。14 种代表性成分覆盖了补阳还五汤中较具代表性的黄酮类、酚酸类、苷类及内酯类成分,15 个靶点则涵盖了炎症、凋亡、神经营养、信号转导及血管生成等与缺血性脑损伤密切相关的生物学过程。PCA 结果显示,不同批次样本整体交叉分布而非完全分离,说明批次间重复性总体可接受。时序热图进一步提示,成分暴露峰值普遍早于靶点响应,符合先暴露、后信号转导、再到功能响应的药效学逻辑。这种先后顺序恰恰是复杂中药机制研究中最难被静态方法捕捉的部分。

在模型结构上,BiGRU 联合时间注意力比较适合处理小样本、多变量、非线性且具有时间依赖的数据。BiGRU 可以同时利用前向和后向的时序信息,这对中药体内过程的时延、滞后和累积效应相当重要。时间注意力则进一步避免模型对所有时间点都一碗水端平,使关键时间窗更容易被识别出来。LOBO-CV 结果也支持这一点,模型在不同批次下仍保持了较好的预测性能($R^2 > 0.80$),但其稳定性和泛化能力仍需在更大规模外部队列中进一步验证。模型训练过程中损失函数的平稳收敛,也从侧面说明所构建的时间窗口、特征编码方式和网络结构具有一定合理性。值得指出的是,本研究所建立的 BiGRU 模型完全基于动物实验获得的 PK-PD 时序数据。模型输入为 UPLC-MS/MS 测定的 14 种活性成分血药浓度,预测目标为 ELISA 检测得到的 15 个脑组织关键靶点表达水平,因此模型预测结果能够与真实动物实验数据直接对应。模型在 LOBO-CV 中保持较高预测精度(R^2 均 > 0.80),说明其能够较好地学习补阳还五汤多成分暴露与多靶点响应之间的动态映射关系,也为后续关键时间

窗、核心成分及关键靶点的识别提供了可靠的数据支撑。当前模型主要用于识别多成分 PK 与多靶点 PD 时序数据中的高贡献响应模式,模型反映的是不同特征在动态映射过程中的贡献程度。时间信息与成分-靶点关联特征对模型的相对贡献仍需结合进一步通过对比模型分析策略和外部数据进行深入解析。

本研究结果提示,补阳还五汤对缺血性卒中相关靶点网络的主要响应峰值出现在给药后约 10 h,而非早期即达到最大。这一结果是模型基于动物实验 PK-PD 时序数据自主学习得到的注意力分布。结合时序热图可见,多数活性成分在给药早期达到暴露峰值,而脑组织靶点变化主要发生于中后期,提示成分暴露与药效响应之间存在一定时间滞后,与药物先暴露、后信号转导、再产生生物学效应的药效学规律一致。结合成分 ADME 的时间过程,这一时间窗可能对应于活性成分逐步进入有效暴露阶段,并推动炎症调控、神经保护及修复相关通路集中响应。

在物质基础方面,丹皮酚、毛蕊异黄酮和芒柄花黄素在关键时间窗内表现出较高的贡献度。三者分别与抗炎、抗氧化、改善微循环及神经保护等作用相关,与补阳还五汤的配伍思路基本吻合^[23-25]。在靶点层面,BDNF、PKG2 和 CAMK2 在关键时间窗内敏感性最高,提示补阳还五汤可能主要通过神经保护、信号转导与可塑性调控发挥作用,兼具抗损伤和促修复的双相调控特征^[29-31]。

本研究也存在一定局限。对于关键成分的筛选可能遗漏部分低丰度活性成分,模型尚未整合药物 ADME 过程、组织分布及代谢酶等生理学信息,因此对复杂体内过程的生物学解释能力仍有进一步提升空间。本研究采用终末取血方式,不同时间点非同一动物的连续动态监测,因此可能受到个体差异及动物间生物学变异影响,从而引入潜在的时序重构偏倚。尽管已采取相应措施降低小样本条件下模型过拟合风险并评估模型稳定性,但其预测性能和泛化能力仍有待在更大规模的独立外部队列中进一步验证。未来结合不同模型的比较和消融实验分析,可进一步明确时间特征与成分-靶点关联特征在动态响应模式识别中的作用,从而提高模型解释的完整性。并且可以进一步扩大样本量,引入脑区分层或单细胞水平验证,并结合 PBPK 模型、生理学约束及多组学数据,以及分子对接、通路扰动、基因敲降等实验开展因果验证,以进一步深化对补

阳还五汤抗脑缺血作用机制的解析。

4 结论

本研究初步建立了基于双向门控循环单元与时序注意力机制的补阳还五汤动态药理分析框架，实现了对缺血性脑中风干预过程的时序建模。模型分析提示给药后 10 h 可能为补阳还五汤干预脑缺血过程中的高贡献响应时间点，丹皮酚、毛蕊异黄酮和芒柄花黄素可能为潜在相关成分，BDNF、PKG2 和 CAMK2 可能为高贡献响应靶点。为解析补阳还五汤抗脑缺血作用机制提供了新的时序分析思路，其在中药复方动态药理机制研究中的应用价值仍有待进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 钟靛, 吴敏, 林姮, 等. 全球与中国缺血性脑卒中的疾病负担变化趋势及 DALYs 预测 (1990—2021) [J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2026, 20(4): 40-46.
- [2] 亓鹏浩. 补阳还五汤治疗脑中风的理论溯源及研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2025, 52(7): 208-212.
- [3] Qin C, Yang S, Chu Y H, *et al.* Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 215.
- [4] Zhang X N, Li H Y, Zhao Y W, *et al.* Neuronal injury after ischemic stroke: Mechanisms of crosstalk involving necroptosis [J]. *J Mol Neurosci*, 2025, 75(1): 15.
- [5] Iordache M P, Buliman A, Costea-Firan C, *et al.* Immunological and inflammatory biomarkers in the prognosis, prevention, and treatment of ischemic stroke: A review of a decade of advancement [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(16): 7928.
- [6] Zhang J W, Niu J J, Zhao J W, *et al.* Deciphering the disease ecosystem of ischemic stroke via multi-omics and prospects for therapeutic strategies [J]. *Front Neurosci*, 2026, 20: 1740084.
- [7] 吕智燚, 王飞, 何钦, 等. 补阳还五汤合黄连解毒汤加减治疗糖尿病脑病的磁共振波谱与代谢指标评估研究 [J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(10): 118-123.
- [8] Rao Y J, Li J J, Qiao R F, *et al.* Tetramethylpyrazine and Astragaloside IV have synergistic effects against spinal cord injury-induced neuropathic pain via the OIP5-AS1/miR-34a/Sirt1/NF- κ B axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 115: 109546.
- [9] Liang Y, Deng S Q, Li Y, *et al.* Synergistic neuroprotection of artesunate and tetramethylpyrazine in ischemic stroke, mechanisms of blood-brain barrier preservation [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(16): 7979.
- [10] 王春芳, 杨曜铭, 张新, 等. 基于网络药理学及分子对接技术研究中风协方 II 号治疗中风后遗症的机制 [J]. 四川中医, 2025, 43(12): 138-148.
- [11] 张鑫, 刘民, 黄艺珊, 等. 中药及其方剂药动学的发展历程和展望 [J]. 中草药, 2025, 56(15): 5605-5615.
- [12] Li C, Jia W W, Yang J L, *et al.* Multi-compound and drug-combination pharmacokinetic research on Chinese herbal medicines [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(12): 3080-3095.
- [13] Regazzoni F, Pagani S, Salvador M, *et al.* Learning the intrinsic dynamics of spatio-temporal processes through latent dynamics networks [J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 1834.
- [14] Zheng W D, Hu J. Multivariate time series prediction based on temporal change information learning method [J]. *IEEE Trans Neural Netw Learn Syst*, 2023, 34(10): 7034-7048.
- [15] Zhang Y T, Zhou W J, Huang L J, *et al.* Efficient microbubble trajectory tracking in ultrasound localization microscopy using a gated recurrent unit-based multitasking temporal neural network [J]. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 2024, 71(12): 1714-1734.
- [16] Parwati F A, Wiharja K, Kurniawan I. Application of graph neural network to predict drug-drug interactions on warfarin based on molecular properties and molecular mechanism [C] // 2024 International Conference on Data Science and Its Applications (ICoDSA). Kuta, Bali, Indonesia: IEEE, 2024: 311-316.
- [17] Sun C C, Li C H, Lin X, *et al.* Attention-based graph neural networks: A survey [J]. *Artif Intell Rev*, 2023, 56(2): 2263-2310.
- [18] 张朋飞, 胡蕴慧, 陈琪, 等. 网络药理学应用于医疗机构中药制剂研究与转化专家共识 [J]. 中国药事, 2026, 40(5): 535-549.
- [19] Longa E Z, Weinstein PR, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [20] Jiang M M, Yin P L, Bai X D, *et al.* Proinflammatory and anti-inflammatory genes in stroke pathogenesis [J]. *Curr Pharm Des*, 2020, 26(34): 4220-4233.
- [21] Song K, Li Y Y, Zhang H L, *et al.* Oxidative stress-mediated blood-brain barrier (BBB) disruption in neurological diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4356386.
- [22] Mao R, Zong N N, Hu Y J, *et al.* Neuronal death mechanisms and therapeutic strategy in ischemic stroke [J]. *Neurosci Bull*, 2022, 38(10): 1229-1247.
- [23] Duan Z D, Peng Y Q, Xu D Y, *et al.* Scutellarin alleviates

- neuronal apoptosis in ischemic stroke via activation of the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(5): 2175.
- [24] Kuan C Y, Whitmarsh A J, Yang D D, *et al.* A critical role of neural-specific JNK3 for ischemic apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15184-15189.
- [25] Wang Y C, Yang Z, Wang J L, *et al.* Brain-body interactions in ischemic stroke: VNS reprograms microglia and FNS enhances cerebellar neuroprotection [J]. *Stroke*, 2025, 56(10): e267-e278.
- [26] Valable S, Montaner J, Bellail A, *et al.* VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: Both effects decreased by Ang-1 [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(11): 1491-1504.
- [27] Hu Y, Zheng Y M, Wang T, *et al.* VEGF, a key factor for blood brain barrier injury after cerebral ischemic stroke [J]. *Aging Dis*, 2022, 13(3): 647-654.
- [28] Burgoyne J R, Oka S I, Ale-Agha N, *et al.* Hydrogen peroxide sensing and signaling by protein kinases in the cardiovascular system [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18(9): 1042-1052.
- [29] Gupta A K, Gupta S, Mehan S, *et al.* Exploring the connection between BDNF/TrkB and AC/cAMP/PKA/CREB signaling pathways: Potential for neuroprotection and therapeutic targets for neurological disorders [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(11): 14627-14659.
- [30] Tokumitsu H, Sakagami H. Molecular mechanisms underlying Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase kinase signal transduction [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11025.
- [31] Peng M J, Li C, Zhang X X, *et al.* Research progress on the structure and physiological functions of PKG [J]. *Biomed Eng Commun*, 2025, 4(3): 16.

[责任编辑 潘明佳]