

基于网络药理学和体内实验的抗衰老片抗衰老作用及机制探讨

杨茹¹, 金强², 徐颖¹, 叶冠^{1*}

1. 上海医药集团中药研究所有限公司, 上海 201203

2. 杭州胡庆余堂药业有限公司, 浙江 杭州 311100

摘要: **目的** 基于网络药理学和体内实验探讨抗衰老片抗衰老的作用机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)筛选抗衰老片中组方药材的主要化学成分及其靶点, 并通过文献检索、Pubchem对抗衰老片中药材的主要成分进行补充, 经SwissTargetPrediction数据库预测靶点; 通过GeneCards、OMIM数据库获取衰老相关靶点; 通过Venny2.1.0平台获得抗衰老片成分与衰老的共同靶点; 基于STRING数据库和Cytoscape 3.8.0软件构建药物与疾病共同靶点的蛋白质相互作用网络(PPI); 基于R语言进行基因本体(GO)生物功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。以秀丽隐杆线虫为实验对象, 观察抗衰老片对N2野生型秀丽隐杆线虫寿命及百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体CB1370、CF1038、MQ1333、MQ887、TJ1052寿命的影响, 探究抗衰老片抗衰老的作用及潜在的作用机制。**结果** 筛选出抗衰老片221个活性成分和1232个预测靶点, 衰老相关靶点12081个, 抗衰老片成分和疾病的共同靶点1020个。KEGG富集分析结果主要涉及磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、晚期糖基化终末产物/晚期糖基化终末产物受体(AGE/RAGE)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路等。线虫实验结果表明, 抗衰老片可延长正常情况下及百草枯诱导下的N2野生型秀丽隐杆线虫的寿命, 提高秀丽隐杆线虫对百草枯的耐性; 与相应各对照组相比, 抗衰老片无法延长突变体TJ1052和CF1038在氧化应激下的寿命, 但突变体CB1370、MQ1333和MQ887在氧化应激下的寿命可被延长。**结论** 抗衰老片对秀丽隐杆线虫具有延长寿命的作用, 其潜在的机制可能依赖于PI3K信号通路和叉头转录因子(FOXO)信号通路, 而不依赖于胰岛素受体信号通路和线粒体相关信号通路。

关键词: 抗衰老片; 衰老; 氧化应激; 网络药理学; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路; 叉头转录因子(FOXO)信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)10-2104-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.10.006

Anti-aging effects of Kangshuailao Tablet based on network pharmacology and *in vivo* experiments

YANG Ru¹, JIN Qiang², XU Ying¹, YE Guan¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Pharmaceuticals Holding Co., Ltd., Shanghai 201203, China

2. Hangzhou Huqingyutang Pharmaceuticals Co., Ltd., Hangzhou 311100, China

Abstract: **Objective** To explore the anti-aging mechanism of Kangshuailao Tablet (KSLT) based on network pharmacology and *in vivo* experiments. **Methods** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) was used to screen the main chemical components and their targets of Chinese materia medica in KSLT and the major components of Chinese materia medica in KSLT were supplemented by literature and Pubchem, and the targets of supplemented components were predicted by the SwissTargetPrediction. Aging-related targets were obtained from the database of GeneCards and OMIM. Common targets of KSLT and aging were got by Venny2.1.0. The protein-protein interaction (PPI) network of the common targets of drugs and diseases was constructed based on the STRING and Cytoscape 3.8.0 software. Gene ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out based on R language. To explore the anti-aging effect and potential mechanism of KSLP, N2 wild-type *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*)

收稿日期: 2023-05-10

基金项目: 上海市科委专项“上海医药战略大品种二次开发”(15DZ1900100)

第一作者: 杨茹(1995—), 女, 硕士, 主要从事中药和天然药物的研究。E-mail: yangru@sphchina.com

*通信作者: 叶冠(1974—), 男, 博士, 教授级高级工程师, 主要从事中药和天然药物的研发工作。E-mail: yeg@sphchina.com

were performed to observe the anti-aging effect of KSLT on the life span, and the potential anti-aging mechanism of KSLT was investigated by paraquat-induced N2 wild-type *C. elegans* and mutants CB1370, CF1038, MQ1333, MQ887 and TJ1052. **Results** There were 221 active ingredients, 1 232 predicted targets in KSLT, 12 081 targets in aging-related targets, and 1 020 common targets of KSLT and aging. The selected signaling pathways of KEGG pathway analysis mainly included phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway, advanced glycation end products/receptor for advanced glycation end products (AGE/RAGE) signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, etc. The experimental results showed that KSLT prolonged the lifespan of *C. elegans* and improved the tolerance of *C. elegans* to paraquat. Compared with the corresponding control groups, KSLT was unable to extend the lifespan of mutants TJ1052 and CF1038 under oxidative stress, but the lifespan of mutants CB1370, MQ1333, and MQ887 was prolonged by KSLT under oxidative stress. **Conclusion** KSLT had anti-aging effects on *C. elegans*, and the underlying might depend on PI3K and forkhead box protein O (FOXO) signaling pathways, but not on insulin receptors signaling pathway and mitochondria-related signaling pathways.

Key words: Kangshuailao Tablet; aging; oxidative stress; network pharmacology; phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway; forkhead box protein O (FOXO) signaling pathways

衰老是一个不可避免的过程,通常被定义为大多数生物以依赖时间的方式逐渐功能衰退^[1]。然而,衰老不仅是正常的人类衰老,而且还与某些疾病风险的增加相关^[2]。McCay等^[3]发现在没有营养不良的情况下限制热量可以延长大鼠的寿命,并在之后的研究中发现限制热量对灵长类动物也可以延长寿命^[4]。于是,人们开始意识到衰老是可以调控的,随着研究的逐渐深入,衰老研究已经从衰老表型研究过渡到了遗传途径研究。目前关于衰老的理论和假说颇多,但仍未有一种理论能解释所有的衰老现象^[5]。此外,随着世界人口老龄化趋势的不断发展,在不久的将来,全球多达20%的人口将超过60岁,这将导致更高的医疗成本和更多的社会负担^[6]。因此,如何延缓衰老进程、减少与年龄相关的疾病的潜在危险因素是非常迫切的。

近年来的研究表明中药的多成分、多靶点、多通路的特性在治疗慢性疾病方面发挥较大的优势。抗衰老片由我国明代宫廷秘方衍化而来,由生地、黄、红参、麦冬、天冬、地骨皮和茯苓6味药材以409:167:26:26:26:77的比例制备的复方片剂^[7]。其中,生地、黄清热凉血、养阴生津;红参大补元气、复脉固脱,麦冬养阴生津、润肺清心;天冬养阴润燥、清肺生津;地骨皮清肺降火、凉血;茯苓健脾宁心^[8]。诸药合用,共奏益气补血、养阴生津、宁心安神之功。抗衰老片在临床已使用多年,用于中、老年体弱者因气阴两虚所致的神疲乏力、心悸气短、少气懒言、头晕目眩、耳鸣健忘、烦躁失眠等症状。现代药理研究表明抗衰老片可改善D-半乳糖诱导的衰老大鼠的学习记忆能力,延缓自由基导致的脑组织的脂质过氧化^[9],也可提高实验性肾阳虚小鼠的免疫功能^[10]。此外,抗衰老片还可通过调节肠道菌群来

改善中年、老年小鼠以及高脂饮食小鼠的代谢功能^[11-12]。然而,抗衰老片干预衰老的作用机制仍未明确。因此,本研究通过网络药理学和秀丽隐杆线虫(简称线虫)实验来探讨抗衰老片抗衰老的作用机制,以为中医药防治衰老和抗衰老片的开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 抗衰老片抗衰老的网络药理学分析

1.1.1 抗衰老片成分及其作用靶点的筛选、收集 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)检索抗衰老片组方中药生地、黄、红参、麦冬、天冬、地骨皮和茯苓6味药材的活性成分,并通过文献调研、Pubchem对抗衰老片中药材的成分进行补充。利用SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测靶点;物种选择为“Homo Sapiens”,利用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)查找靶点对应的基因简称,合并、去重,得到抗衰老片活性成分的靶点数据集。

1.1.2 衰老的疾病靶点和治疗靶点的收集 在GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)数据库分别输入疾病名称“aging”“senescence”进行检索,合并、去重后获得衰老靶点集,并利用Venny2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)在线工具平台与抗衰老片的作用靶点集取交集,获得抗衰老片治疗衰老的潜在靶点。

1.1.3 蛋白质相互作用(PPI)网络图及中药-活性成分-核心靶点网络图的构建 将“1.1.2”项中获得的交集靶点导入STRING数据库(<https://www.string-db.org/>),物种选择“Homo sapiens”,设置置信度为 ≥ 0.9 ,获

得核心靶点。将核心靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件,绘制 PPI 网络图。将核心靶点导入 Cytoscape 3.8.0 软件中获得中药-活性成分-核心靶点关联网络图。

1.1.4 核心靶点基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 将“1.1.3”项筛选后的核心靶点利用 R 3.6.3、ClusterProfiler 3.14.3^[13]、ggplot 2.3.3.0、DOSE 3.12.0^[14]、enrichplot 1.6.1 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,并绘制 GO 及 KEGG 富集分析图。

1.2 抗衰老片对线虫的影响

1.2.1 实验动物 N2 野生型线虫及突变体 CB1370 [*daf-2(e1370)*]、CF1038 [*daf-16(mu86)*]、MQ1333 [*nuo-6(qm200)*]、MQ887 [*isp-1(qm150)*]、TJ1052 [*age-1(hx546)*]均由美国明尼苏达大学秀丽线虫遗传中心(CGC)提供。

1.2.2 药物与试剂 抗衰老片(规格:每片 0.34 g,批号:2007001,正大青春宝药业有限公司);二氯百草枯(化学名:1,1'-二甲基-4,4'-二吡啶二氯化物水合物,分子式: $C_{12}H_{14}Cl_2N_2 \cdot xH_2O$;批号:36541, Sigma 公司);维生素 C(VC,批号:a92902, Sigma 公司);盐酸二甲双胍片(规格:每片 0.5 g,批号:A506198,中美上海施贵宝制药有限公司);5-氟脱氧尿(FUDR,批号:F0503; Sigma 公司);氯化钠(批号:V900058, Sigma 公司);琼脂粉[批号:A505255-0250,生工生物工程(上海)股份有限公司];蛋白胨(批号:LPO042,英国 OXOID 公司);胰蛋白胨(批号:LP0042,英国 OXOID 公司);酵母提取物(批号:LP0021;英国 OXOID 公司);CM-H2-DCFDA(批号:D6883, Sigma 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:P0010S,碧云天生物技术有限公司)。氯化钙、胆固醇、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、硫酸镁等均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2.3 仪器 MIR254 生化培养箱(日本 SANYO 公司);SZ61 体视显微镜(日本 OLYMPUS 公司);MIR-553 恒温培养箱(日本 SANYO 公司);SMZ18 荧光显微镜(NIKON 公司);燕燕牌超净台(吴县市净化工程研究所);MS206DU 精密天平(Mettler Tolerdo)。

1.2.4 线虫生长培养基(NGM)的配制 称取 3.00 g NaCl、2.50 g 蛋白胨、15.00 g 琼脂置于 2 L 的锥形瓶中,再加入 970 mL ddH₂O,轻轻摇匀,高温高压灭菌后,待培养基温度降至 60℃左右,依次加入 1.0 mL 5 mg·mL⁻¹胆固醇、1.0 mL 1 mol·L⁻¹ CaCl₂、1.0 mL

1 mol·L⁻¹ MgSO₄、25.0 mL 1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄,摇匀后,无菌状态铺板,室温保存,备用。

1.2.5 S 液体培养基的配制 称取 5.85 g NaCl、6.00 g KH₂PO₄、1.00 g K₂HPO₄,加入 1 L ddH₂O,轻轻晃动混匀,高温高压灭菌后,加入 10 mL 1 mol·L⁻¹柠檬酸钾、10 mL 微量金属溶液、3 mL 1 mol·L⁻¹ CaCl₂、3 mL 1 mol·L⁻¹ MgSO₄、1 mL 5 mg·mL⁻¹胆固醇,混匀,备用。

1.2.6 M9 缓冲液的配制 称取 0.60 g KH₂PO₄、3.00 g Na₂HPO₄·12H₂O、1.00 g NaCl,加入 ddH₂O 至 200 mL,高温高压灭菌后加入 1 mol·L⁻¹ MgSO₄ 200 μL,混匀,备用。

1.2.7 线虫同步化 将 30 条线虫成虫转移到含新鲜大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基培养皿上,产卵 2 h 后,将成虫移走,留下同步化的卵,培养 3 d 变为成虫后进行后续实验。

1.2.8 抗衰老片对 N2 野生型线虫毒性的测定 取抗衰老片 1 片,磨成粉,精确吸取 6.8 mL 超纯水,涡旋,超声,使其溶解完全,配制成 50 mg·mL⁻¹ 母液,用 S 液体培养基(含 400 μmol·L⁻¹ FUDR)稀释至 10.000 0、2.000 0、0.400 0、0.080 0、0.016 0、0.003 2、0 mg·mL⁻¹。将用 S 液体培养基(含 400 μmol·L⁻¹ FUDR)稀释的含不同质量浓度的抗衰老片水溶物加入到 48 孔板中,每孔 200 μL。在 20℃下,将同步化后的培养 3 d 的 N2 野生型线虫,挑入 48 孔板中,每孔 30 条,2 d 后统计线虫存活率。

1.2.9 抗衰老片对 N2 野生型线虫寿命的影响 将同步化后的 N2 野生型线虫随机分为 5 组,分别为对照组,抗衰老片低、中、高质量浓度(0.08、0.40、2.00 mg·mL⁻¹)组和二甲双胍组(二甲双胍用 S 液体培养基配制,50 mmol·L⁻¹)。按照分组将不同溶液加入到 96 孔板中,每孔 80 μL。将同步化后的 N2 野生型线虫挑入到 96 孔板中,每孔 15 条,每 1~2 天统计线虫存活率,观察至无线虫生存,结束实验。

1.2.10 抗衰老片对百草枯诱导的 N2 野生型线虫寿命的影响 将同步化后的 N2 野生型线虫随机分为 5 组,分别为百草枯组,抗衰老片低、中、高质量浓度(0.08、0.40、2.00 mg·mL⁻¹)组和 VC(用 S 液体培养基配制,10 μg·mL⁻¹)组。按照分组将不同溶液加入到 48 孔板中,每孔 200 μL,其中百草枯组加入 S 液体培养基。将同步化后的 N2 野生型线虫挑入到 48 孔板中,每孔 30 条,培养 48 h 后,用 M9 缓冲液将线虫清洗 3 次以除去大肠杆菌 OP50 和药物。清洗后,每孔加入 200 μL 用 S 液体培养基配制的 50 mmol·L⁻¹ 百

草枯溶液,持续观察至无线虫生存,结束实验。线虫死亡的标准以用金属丝触身体不动为准。

1.2.11 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫体内活性氧(ROS)水平的影响 将同步化的N2野生型线虫随机分为4组,分别为百草枯组和抗衰老片低、中、高质量浓度(0.08、0.40、2.00 mg·mL⁻¹)组。按照“1.2.10”项方法进行加药及清洗处理后,每孔加入200 μL用S液体培养基配制的50 mmol·L⁻¹百草枯溶液处理48 h。然后用M9缓冲液配制的5 μmol·L⁻¹CM-H₂-DCFDA处理3 h后,转移到2%琼脂垫载玻片上固定,置于荧光显微镜下观察线虫体内ROS水平(激发光波长495 nm,发射光波长537 nm)。图片利用Image J软件进行分析。

1.2.12 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及相关突变体寿命的影响

(1)*age-1*基因的突变体TJ1052:N2和TJ1052线虫各分为2组,每组80条,分别为对照组(N2-对照、TJ-对照)、抗衰老片中剂量给药组(N2-0.4 mg·mL⁻¹抗衰老片、TJ-0.4 mg·mL⁻¹抗衰老片),共计4组。按照分组将不同溶液加入到48孔板中,每孔200 μL。其中对照组加入S液体培养基。将同步化后的N2和TJ1052线虫挑入到48孔板中培养48 h后,用M9缓冲液将线虫清洗3次来除去大肠杆菌OP50和药物。清洗后,每孔加入200 μL用S液体培养基配制的50 mmol·L⁻¹百草枯溶液,持续观察至无线虫生

存,结束实验。

(2)*daf-16*基因的突变体CF1038(CF)、*daf-2*基因的突变体CB1370(CB)、*nuo-6*基因的突变体MQ1333(MQ1)、*isp-1*基因的突变体MQ887(MQ8):分别将N2和各突变体线虫各分为2组,分组加药及后续处理方法同“1.2.12(1)”。

1.2.13 统计学分析 应用GraphPad Prism (7.0)软件进行分析,毒性评价、ROS荧光强度的比较分析应用单因素方差分析,寿命实验和抗氧化能力差异比较应用Log-rank(Mantel-Cox)Test。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抗衰老片抗衰老的网络药理学分析

2.1.1 抗衰老片活性成分及靶点的确定 通过TCMSP数据库和已公开的文献检索、去重,剔除未找到靶点的活性成分后,最终获得抗衰老片活性成分221个。根据TCMSP检索并筛选[筛选标准:口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18]获得抗衰老片活性成分27个。此外,根据《中国药典》2020年版^[8]及文献发表的6味药材活性明确的化合物进行补充,共补充19个化合物^[15-36],见表1。抗衰老片221个活性成分检索到相关靶点1 232个,通过Genecards、OMIM数据库共得到衰老相关靶点12 081个,通过Venny2.1.0在线平台获得抗衰老片和衰老的交集靶点1 020个(图1)。

表1 抗衰老片中的主要活性成分

Table 1 Major active ingredients of Kangshuailao Tablet

MOL ID	化合物名称	OB/%	DL	药材来源
MOL002819	catalpol(梓醇)	5.07	0.44	地黄
MOL003730	rehmannioside A(地黄苷A)	25.95	0.87	地黄
MOL003735	aucubin(桃叶珊瑚苷)	4.17	0.33	地黄
MOL003727	rehmannioside C(地黄苷C)	10.23	0.86	地黄
MOL003690	ajugol(益母草苷)	16.87	0.32	地黄
MOL004557	geniposide(京尼平苷)	14.64	0.44	地黄
MOL003333	verbascoside(毛蕊花糖苷)	2.94	0.62	地黄
MOL003700	dihydrocatalpol(二氢梓醇)	3.58	0.44	地黄
MOL012340	globulol(蓝桉醇)	81.60	0.12	红参
MOL002032	DNOP(邻苯二甲酸二正辛酯)	40.59	0.40	红参
MOL005344	ginsenoside Rh ₂ (人参皂苷Rh ₂)	36.32	0.56	红参
MOL001949	panaxynol(人参炔醇)	42.44	0.10	红参
MOL012329	20(S)-ginsenoside Rg ₃ [20(S)-人参皂苷Rg ₃]	29.69	0.77	红参
MOL012333	ginsenoside Rg ₂ (人参皂苷Rg ₂)	20.12	0.82	红参
MOL012335	ginsenoside Rg ₃ (人参皂苷Rg ₃)	29.69	0.77	红参
MOL005401	ginsenoside Rg ₅ (人参皂苷Rg ₅)	39.56	0.79	红参
MOL006728	ginsenoside Rb ₃ (人参皂苷Rb ₃)	29.69	0.77	红参

续表1

MOL000358	beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75	红参、麦冬、天冬、地骨皮
MOL000546	diosgenin(薯蓣皂苷元)	80.88	0.81	麦冬、天冬
MOL000263	oleanolic acid(齐墩果酸)	29.02	0.76	麦冬
MOL000449	stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76	麦冬、天冬、地骨皮、茯苓
MOL000472	emodin(大黄素)	24.40	0.24	麦冬、地骨皮
MOL000771	p-coumaric acid(对羟基肉桂酸)	43.29	0.04	麦冬
MOL001729	chrysophanol(大黄酚)	18.64	0.21	麦冬
MOL000098	quercetin(槲皮素)	46.43	0.28	天冬
MOL000360	ferulic acid(阿魏酸)	39.56	0.06	天冬、地骨皮
MOL003889	methylprotodioscin(甲基原薯蓣皂苷)	35.12	0.86	天冬
MOL003891	pseudoprotodioscin(伪薯蓣皂苷)	37.93	0.87	天冬
MOL001645	linoleyl acetate(醋酸芳樟酯)	42.10	0.20	地骨皮
MOL002219	atropine(阿托品)	34.53	0.21	地骨皮
MOL002228	kulactone(苦楝萜酮内酯)	45.44	0.82	地骨皮
MOL001689	acacetin(金合欢素)	34.97	0.24	地骨皮
MOL002222	sugiol(柳杉酚)	36.11	0.28	地骨皮
MOL000296	hederagenin(常春藤皂苷元)	36.91	0.75	地骨皮
MOL002224	aurantiamide acetate(金色酰胺醇酯)	58.38	0.59	地骨皮
MOL001790	linarin(蒙花苷)	39.84	0.71	地骨皮
MOL002218	scopolin(东莨菪苷)	56.45	0.39	地骨皮
MOL008998	cerevisterol(啤酒甾醇)	39.52	0.77	茯苓
MOL000289	pachymic acid(茯苓酸)	33.63	0.81	茯苓
MOL000297	tumulosic acid(土莫酸)	29.88	0.81	茯苓
MOL000275	trametenolic acid(栓菌酸)	38.71	0.80	茯苓
MOL000276	dehydropachymic acid(去氢茯苓酸)	35.11	0.81	茯苓
MOL000300	dehydroeburicoic acid(去氢齿孔酸)	44.17	0.83	茯苓
MOL000291	poricoic acid B(茯苓新酸B)	30.52	0.75	茯苓
MOL000292	poricoic acid C(茯苓新酸C)	38.15	0.75	茯苓
MOL000290	poricoic acid A(茯苓新酸A)	30.61	0.76	茯苓

OB-生物利用度;DL-类药性

OB-oral bioavailability; DL-drug-likeness

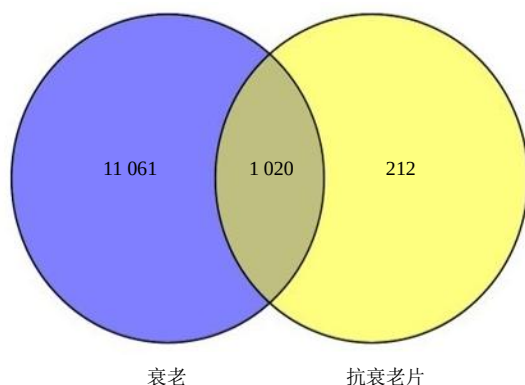


图1 抗衰老片成分靶点与衰老疾病靶点的韦恩图
Fig. 1 Venn diagram of targets of ingredients of Kangshuailao Tablet and disease targets of senescence

2.1.2 PPI网络及中药-活性成分-核心靶点网络图 交集靶点1 020个导入STRING数据库,物种选择“Homo sapiens”,设置置信度为 ≥ 0.9 ,获得核心靶点70个。将70个核心靶点导入Cytoscape 3.8.0软件构建PPI网络图,见图2,度值前10的核心靶点分别为:SRC、TP53、AKT1、HSP90AA1、CTNNB1、TNF、STAT3、MTOR、JUN和MAPK3。采用Cytoscape 3.8.0软件构建中药-活性成分-核心靶点调控网络图,见图3,以度值大于2倍度值中位数筛选核心成分,共获得28个核心成分,分别为薯蓣皂苷元、地黄苷A、苦楝萜酮内酯、金合欢素、啤酒甾醇、阿托品、去氢齿孔酸、毛蕊花糖苷、金色酰胺醇酯、大黄酚、槲皮素、茯苓新酸C、阿魏酸、土莫酸、栓菌酸、桃叶珊瑚苷、人参皂苷Rg₅、β-谷甾醇、齐墩果

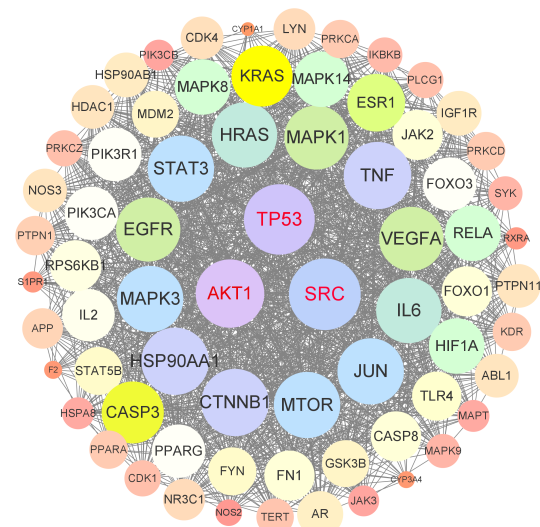


图2 核心靶点PPI网络

Fig. 2 PPI network of core targets

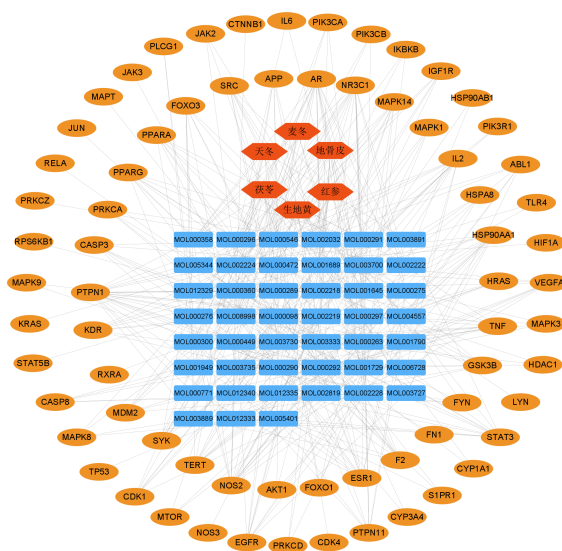


图3 中药-活性成分-核心靶点网络

Fig. 3 Network of Chinese material medica-active components-core targets

酸、二氢梓醇、梓醇、常春藤皂苷元、大黄素、甲基原薯蓣皂苷、甲基原薯蓣皂苷、柳杉酚、茯苓酸和去氢茯苓酸。

2.1.3 核心靶点GO生物功能和KEGG通路富集分析 对筛选后的70个核心靶点进行GO功能分析,分别选取生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)前10条GO term绘制富集分析图(图4)。对抗衰老片抗衰老的核心靶点进行KEGG富集分析(图5),结果KEGG通路主要涵盖了癌症中的蛋白聚糖、人类巨细胞病毒感染、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、乙型肝炎、晚期糖基化终末产物/晚期

糖基化终末产物受体(AGE/RAGE)信号通路在糖尿病并发症中的作用、趋化因子信号通路、表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂耐药、T细胞受体信号通路、甲状腺激素信号通路、细胞程序性死亡-配体1(PD-L1)在癌症中的表达和细胞程序性死亡受体(PD-1)检查点通路、内分泌抵抗、脂质和动脉粥样硬化、PI3K/Akt信号通路等。

2.2 抗衰老片对线虫的影响

2.2.1 抗衰老片对N2野生型线虫的毒性评价 如图6所示,质量浓度为0.003 2~10.000 0 mg·mL⁻¹的抗衰老片组与对照组(0 mg·mL⁻¹)相比,N2线虫存活率差异不显著($P>0.05$),表明抗衰老片在质量浓度为0.003 2~10.000 0 mg·mL⁻¹时对N2野生型线虫没有明显毒性。

2.2.2 抗衰老片对N2野生型线虫寿命的影响 与对照组比较,抗衰老片组和二甲双胍组的平均寿命均有所延长,见图7。抗衰老片低、中、高质量浓度组的平均寿命分别为(23.10±0.61)、(25.05±0.60)、(28.55±0.62)d,分别延长了8.62%($P>0.05$)、17.77%($P<0.01$)和34.23%($P<0.01$),二甲双胍组的平均寿命为(24.46±0.67)d,延长了15%($P<0.01$)。

2.2.3 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫寿命的影响 如图8所示,抗衰老片低、中、高质量浓度组的平均寿命分别为(3.670±0.007)、(5.640±0.015)、(6.850±0.012)d,与百草枯组比较,分别延长了3.93%($P>0.05$)、58.82%($P<0.01$)和59.75%($P<0.01$),VC组的平均寿命为(4.74±0.017)d,延长了36.05%($P<0.01$)。

2.2.4 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫体内ROS的影响 氧化应激是引起机体衰老的重要原因之一^[5],而ROS是引起氧化应激的主要原因。因此,采用CM-H2-DCFDA来检测抗衰老片组和百草枯组线虫体内ROS水平的差异。如图9所示,与百草枯组比较,抗衰老片中质量浓度组能显著降低百草枯诱导的线虫体内ROS水平($P<0.01$)。

2.2.5 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及相关突变体寿命的影响 选择0.4 mg·mL⁻¹的质量浓度进一步分析抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及相关突变体寿命的影响。对age-1基因的突变体TJ1052寿命的影响结果见图10,N2-对照组和N2-0.4 mg·mL⁻¹抗衰老片组线虫的寿命分别是(3.970±0.012)、(5.220±0.016)d,两组间比较,差异显著($P<0.01$)。TJ-对照组和TJ-0.4 mg·mL⁻¹

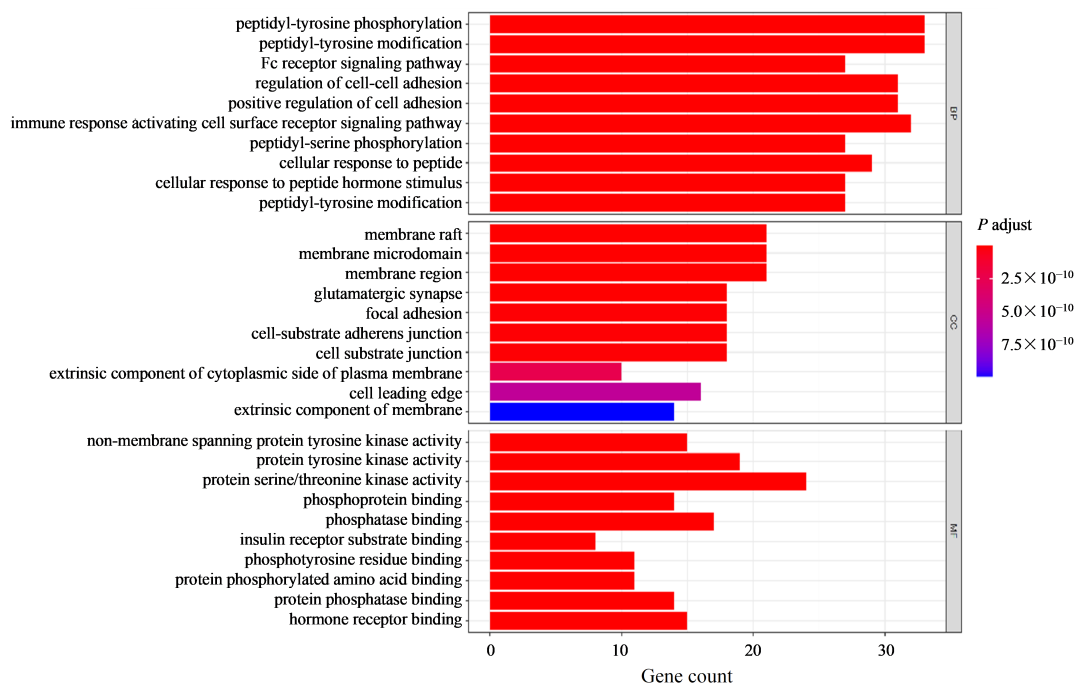


图4 GO富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis

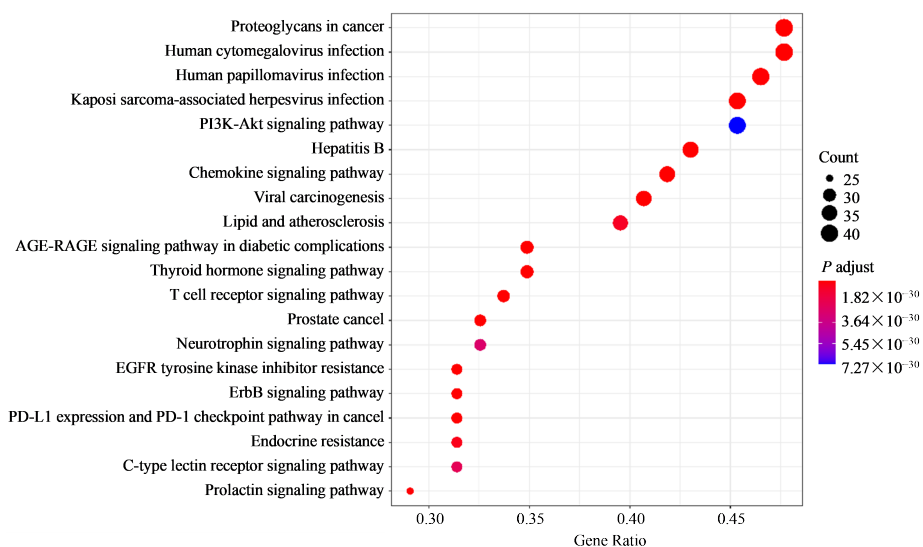


图5 KEGG富集分析

Fig. 5 KEGG enrichment analysis

抗衰老片组线虫的寿命分别为 (8.23 ± 0.02) 、 (8.62 ± 0.015) d, 两组间比较, 差异不显著($P > 0.05$)。实验结果表明抗衰老片可提高线虫对百草枯的耐性, 可能依赖于PI3K信号通路。

抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体CF1038寿命的影响结果如图11所示, CF-对照组和CF- $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗衰老片组线虫的寿命分别为 (3.26 ± 0.01) 、 (3.36 ± 0.01) d, 两组间比较, 差异不显著($P > 0.05$), 表明抗衰老片可提高线虫对百草

枯的耐性, 可能依赖于FOXO信号通路。

抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体CB1370寿命的影响结果如图12所示, CB-对照组和CB- $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抗衰老片组线虫的寿命分别为 (7.63 ± 0.28) 、 (8.29 ± 0.29) d, 两组间比较, 差异显著($P < 0.05$), 表明抗衰老片可提高线虫对百草枯的耐性, 不依赖于胰岛素受体信号通路。

抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体MQ1333、MQ887寿命的影响结果如图13所

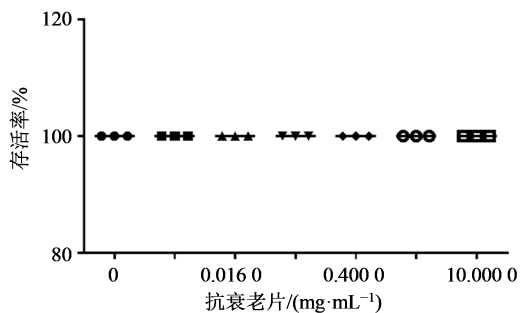


图6 抗衰老片对线虫的毒性评价

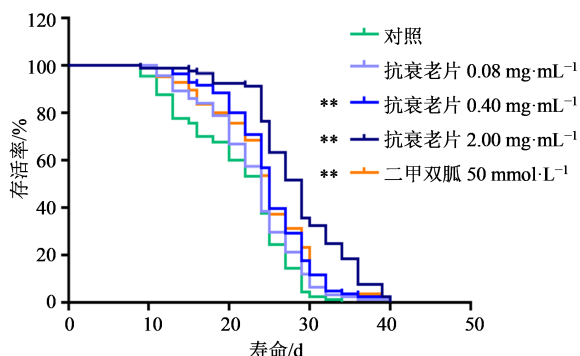
Fig. 6 Toxicological evaluation of Kangshuailao Tablet on N2 wild-type *Caenorhabditis elegans*与对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group

图7 抗衰老片对N2野生型线虫寿命的影响

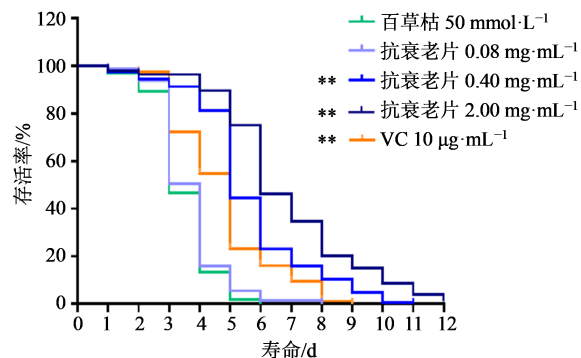
Fig. 7 Effect of Kangshuailao Tablet on lifespan of N2 wild-type *C. elegans*与百草枯组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs paraquat group

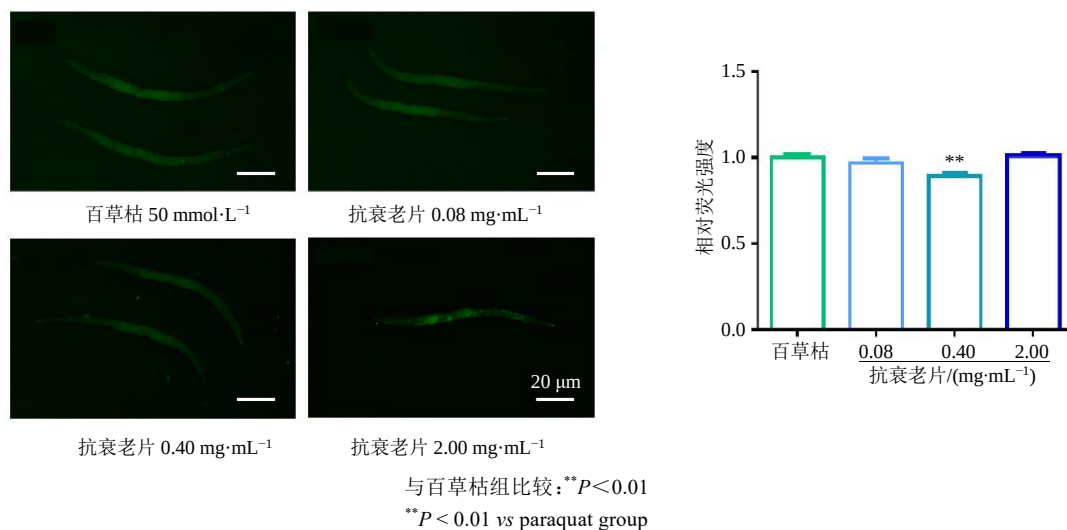
图8 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫寿命的影响

Fig. 8 Effect of Kangshuailao Tablet on lifespan of paraquat-induced N2 wild-type *C. elegans*

示, MQ1-对照组和MQ1-0.4 mg·mL⁻¹抗衰老片组线虫的寿命分别为(3.11±0.07)、(4.420±0.009)d, 两组间比较, 差异显著($P < 0.01$)。MQ8-对照组和MQ8-0.4 mg·mL⁻¹抗衰老片组线虫的寿命分别为(3.59±0.014)、(4.030±0.015)d, 两组间比较, 差异显著($P < 0.01$)。结果表明抗衰老片可提高线虫对百草枯的耐性, 不依赖于线粒体相关信号通路。

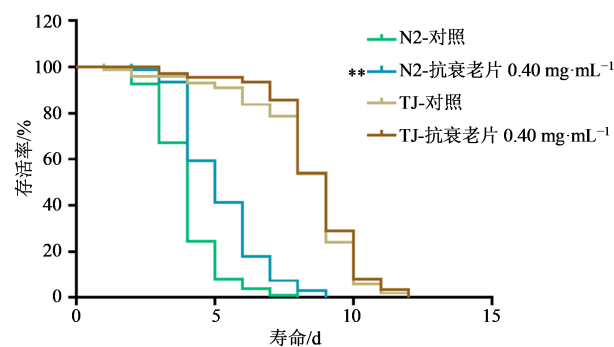
3 讨论

衰老的特点是生理完整性的逐渐丧失, 并始终伴随着许多人类老年性疾病的风险, 如神经退行性

与百草枯组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs paraquat group图9 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫体内ROS水平的影响($\times 80, \bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 9 Effect of Kangshuailao Tablet on ROS levels of paraquat-induced N2 wild-type *C. elegans* ($\times 80, \bar{x} \pm s, n=3$)

疾病、心血管疾病、2型糖尿病和各种癌症^[37]。随着人口老龄化的不断发展, 人们越来越认识到如何延缓衰老进程、减少与年龄相关的疾病的潜在危险因素来让人们更长久地保持健康是迫切需要的。抗

衰老片是在我国明代宫廷秘方“益寿永贞膏”的基础上开发的中成药复方制剂^[7]。然而, 关于抗衰老片对衰老的作用机制尚不可知。衰老是多种因素共同作用的结果, 涉及到机体各个系统结构、功能

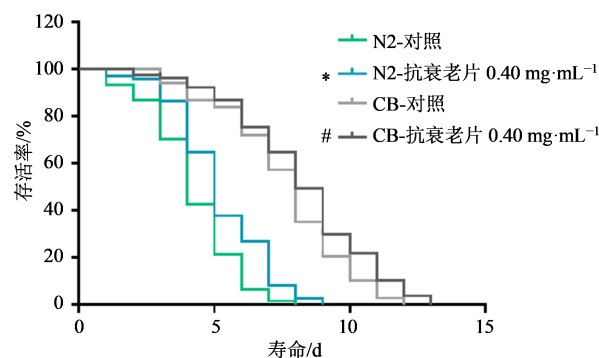


与N2-对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs N2-control group

图10 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体TJ1052寿命的影响

Fig. 10 Effect of Kangshuailao Pian on lifespan of paraquat-induced N2 wild-type *C. elegans* and mutant TJ1052

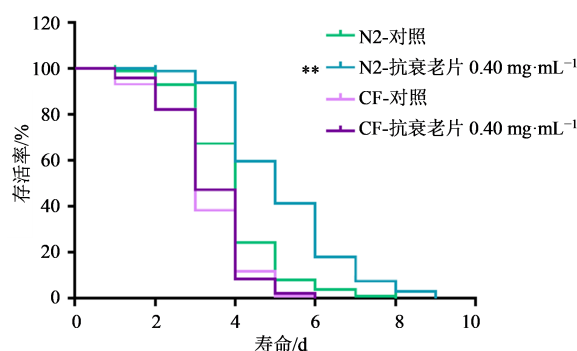


与N2-对照组比较: * $P < 0.05$; 与CB-对照组比较: # $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs N2-control group; # $P < 0.05$ vs CB-control group

图12 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体CB1370寿命的影响

Fig. 12 Effect of Kangshuailao Pian on lifespan of paraquat-induced N2 wild-type *C. elegans* and mutant CB1370

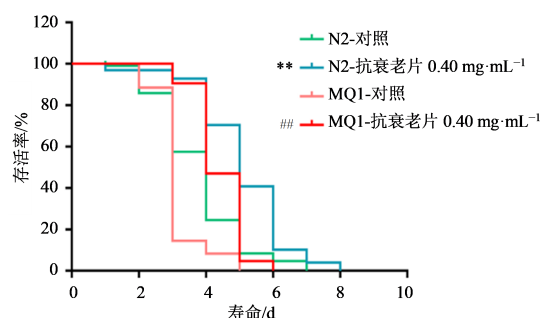


与N2-对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs N2-control group

图11 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体CF1038寿命的影响

Fig. 11 Effect of Kangshuailao Pian on lifespan of paraquat-induced N2 wild-type *C. elegans* and mutant CF1038



与N2-对照组比较: ** $P < 0.01$; 与MQ1-对照组或MQ8-对照组比较: ## $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs N2-control group; ## $P < 0.01$ vs MQ1-control group or MQ8-control group

图13 抗衰老片对百草枯诱导的N2野生型线虫及突变体MQ1333、MQ887寿命的影响

Fig. 13 Effect of Kangshuailao Tablet on lifespan of paraquat-induced N2 wild-type *C. elegans*, mutant MQ1333 and MQ887

的改变,是一个相当复杂的生物过程。目前关于衰老的理论颇多。在中医学上,衰老有五脏虚弱、肾虚、脾胃虚弱、阴阳失调、肝郁和痰浊血瘀等衰老学说^[38-40]。在现代医学上,衰老有自由基、线粒体DNA损伤、遗传程序、端粒、生物膜损伤、染色体突变、细胞凋亡和废物累积等学说^[2,41-42]。其中,自由基学说是最具代表的学说之一。自由基学说认为机体内产生自由基与自由基清除系统之间的平衡随着年龄的增长被破坏,导致自由基过剩或自由基清除能力下降,从而引发衰老等多种疾病^[41]。氧自由基是研究较多的自由基。因此,选择氧化应激来探讨抗衰老片抗衰老的潜在机制。PPI、GO和KEGG结果发现抗衰老片抗衰老的关键靶点是AKT1、STAT3、MAPK1、MAPK3、mTOR、JUN、

EGFR和FOXO3等,涉及的主要通路是PI3K/Akt、AGE/RAGE、MAPK、JAK/STAT通路等。PI3K/Akt信号通路是细胞内重要信号转导通路之一,在细胞

的增殖、存活、分化、生长和凋亡等多种生理和病理过程中起到重要作用^[43]。PI3K/Akt信号传导的下游靶点是Nrf2^[44],参与Nrf2磷酸化过程^[45],而Nrf2/

HO-1 是经典的抗氧化应激的通路。因此, PI3K/Akt/Nrf2 通路可能是衰老和与氧化应激相关的其他疾病的治疗靶点。Zhang 等^[46]发现激活 PI3K/Akt/Nrf2 通路可改善 D-半乳糖诱导的衰老小鼠模型的行为障碍和神经功能缺陷。FOXO 信号通路是整合衰老相关不同信号通路如 PI3K/Akt、JNK、AMPK、mTOR 及生殖等信号通路的关键下游调控因子,在衰老和长寿中起着至关重要的作用^[37]。FOXO 在哺乳动物中有 4 个 FOXO 基因: FOXO1、FOXO3、FOXO4 和 FOXO6,这 4 个 FOXO 基因在结构和功能及相互调控方面具有高度的相似性。而 FOXO 在无脊椎动物中只有一个 FOXO 基因,在线虫中被命名为 *daf-16*。FOXO/DAF-16 是影响老化和氧化的重要分子。Wang 等^[47]发现激活 FOXO/DAF-16 信号通路可减少氧化应激、延长线虫的寿命。

基于 PPI、GO 靶点富集和 KEGG 通路富集结果和文献调研以及实验结果,本研究选择与氧化应激相关的信号传导途径如 FOXO/DAF-16、PI3K、胰岛素受体信号通路、线粒体相关信号通路进行初步验证。采用 *daf-16* 基因的突变体 CF1038、*age-1* 基因(PI3K 在线虫直系同源物)的突变体 TJ1052、*daf-2* 基因的突变体 CB1370(胰岛素受体在线虫中的同源物)、*nuo-6* 基因的突变体 MQ1333(线粒体复合物 I 在线虫中的直系同源物)、*isp-1* 基因的突变体 MQ887(线粒体复合物 III 在线虫中的直系同源物)初步探究抗衰老片对百草枯诱导的衰老的作用。实验结果表明抗衰老片提高线虫对百草枯的耐性,可能依赖于 PI3K、FOXO 信号通路,而不依赖于胰岛素受体信号通路和线粒体相关信号通路。

本研究基于网络药理学,初步揭示了抗衰老片抗衰老的作用机制,为中医药防治衰老和抗衰老片的开发提供依据。本研究还存在一些不足,实验仅选择氧化应激机制进行初步验证,未能深入研究以及分析其他衰老相关的作用机制,将在以后的研究中继续深入挖掘。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 沈干. 我国老年医学近年临床研究的热点 [J]. 中国临床保健杂志, 2016, 19(1): 1-3.
Shen G. Hot spots in clinical research of geriatrics in China in recent years [J]. Chin J Clin Healthc, 2016, 19(1): 1-3.
- [2] da Costa J P, Vitorino R, Silva G M, et al. A synopsis on aging-Theories, mechanisms and future prospects [J]. Ageing Res Rev, 2016, 29: 90-112.
- [3] McCay C M, Maynard L A, Sperling G, et al. Retarded growth, life span, ultimate body size and age changes in the albino rat after feeding diets restricted in calories [J]. J Nutr, 1939, 18(1): 1-13.
- [4] Campisi J, Kapahi P, Lithgow G J, et al. From discoveries in ageing research to therapeutics for healthy ageing [J]. Nature, 2019, 571(7764): 183-192.
- [5] 原慧萍, 杨泽. 氧化应激与衰老研究进展 [J]. 中国老年保健医学, 2015, 13(5): 14-17.
Yuan H P, Yang Z. Oxidative stress and aging [J]. Chin J Geriatr Care, 2015, 13(5): 14-17.
- [6] Hansen M, Kennedy B K. Does longer lifespan mean longer healthspan? [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(8): 565-568.
- [7] 龚舒情. 复方中药抗衰老片药效评价及相关机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2020.
Gong S Q. Study on the efficacy and related mode of action of traditional Chinese medicine formula Kang-Shuai-Lao-Pian [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [9] 陶涛, 潘永明, 冷晓霞, 等. 抗衰老片对衰老大鼠学习记忆和自由基代谢的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(6): 751-753.
Tao T, Pan Y M, Leng X X, et al. Effects of anti-aging tablets on learning and memory and free radical metabolism in aging rats [J]. J Zhejiang Univ Tradit Chin Med, 2009, 33(6): 751-753.
- [10] 鲁珽, 潘永明, 冷晓霞, 等. 抗衰老片对实验性肾阳虚小鼠免疫功能的影响 [J]. 甘肃中医学院学报, 2011, 28(2): 8-11.
Lu T, Pan Y M, Leng X X, et al. Effects of Anti-aging Tablets on immune function of experimental mice models with deficiency of the kidney-Yang [J]. J Gansu Coll Tradit Chin Med, 2011, 28(2): 8-11.
- [11] Gong S Q, Ye T T, Wang M X, et al. Profiling the mid-adult cecal microbiota associated with host healthy by using herbal formula *Kang Shuai Lao Pian* treated mid-adult mice [J]. Chin J Nat Med, 2020, 18(2): 90-102.
- [12] Gong S Q, Ye T T, Wang M X, et al. Traditional Chinese medicine formula *Kang Shuai Lao Pian* improves obesity, gut dysbiosis, and fecal metabolic disorders in high-fat diet-fed mice [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 297.
- [13] Yu G C, Wang L G, Han Y Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284-287.

- [14] Yu G C, Wang L G, Yan G R, et al. DOSE: An R/Bioconductor package for disease ontology semantic and enrichment analysis [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(4): 608-609.
- [15] Gu M, Yuan Y P, Qin Z N, et al. A combined quality evaluation method that integrates chemical constituents, appearance traits and origins of raw *Rehmanniae Radix* pieces [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(7): 551-560.
- [16] Liu W, Yin D X, Zhang T, et al. Phytochemical profiles and antioxidant activity of *Rehmannia glutinosa* from different production locations [J]. *Chem Biodivers*, 2020, 17(8): e2000341.
- [17] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1772-1784.
Chen J P, Zhang K X, Liu Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [18] Wang B W, Jiang Y, Yao Z L, et al. Aucubin protects chondrocytes against IL-1 β -induced apoptosis *in vitro* and inhibits osteoarthritis in mice model [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 3529-3538.
- [19] Li H, Yang D H, Zhang Y, et al. Geniposide suppresses NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via the AMPK signaling pathway to mitigate myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1):73.
- [20] 樊伟旭, 詹志来, 侯芳洁, 等. 红参的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(1): 137-149.
Fan W X, Zhan Z L, Hou F J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Ginseng Radix* et *Rhizoma Rubra* [J]. *Nat Product Res Developm*, 2021, 33(1): 137-149.
- [21] Mworia J K, Kibiti C M, Ngugi M P, et al. Antipyretic potential of dichloromethane leaf extract of *Eucalyptus globulus* (Labill) and *Senna didymobotrya* (Fresenius) in rats models [J]. *Heliyon*. 2019, 5(12): e02924.
- [22] Wang Z J, Nie B M, Chen H Z, et al. Panaxynol induces neurite outgrowth in PC12D cells via cAMP- and MAP kinase-dependent mechanisms [J]. *Chem Biol Interact*, 2006, 159(1): 58-64.
- [23] Cui J, Shan R, Cao Y, et al. Protective effects of ginsenoside Rg₂ against memory impairment and neuronal death induced by A β 25-35 in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113466.
- [24] Liu X, Jiang Y, Yu X, et al. Ginsenoside-Rb₃ protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury via the inhibition of apoptosis in rats [J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(6): 1751-1756.
- [25] Choi J H, Jang M, Nah S Y, et al. Multitarget effects of Korean Red Ginseng in animal model of Parkinson's disease: Antiapoptosis, antioxidant, antiinflammation, and maintenance of blood-brain barrier integrity [J]. *J Ginseng Res*, 2018, 42(3): 379-388.
- [26] Liu T, Zhao L, Hou H L, et al. Ginsenoside 20(S)-Rg₃ suppresses ovarian cancer migration via hypoxia-inducible factor 1 α and nuclear factor-kappa B signals [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(5): 101042831769222.
- [27] 李小辉, 袁名睿, 陆雪萍, 等. 麦冬的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2021, 52(13): 3804-3809.
Li X H, Yuan M R, Lu X P, et al. Study on chemical constituents of *Ophiopogon japonicus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(13): 3804-3809.
- [28] 彭婉, 马骁, 王建, 等. 麦冬化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(2): 477-488.
Peng W, Ma X, Wang J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ophiopogon japonicas* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(2): 477-488.
- [29] Liu J, Liu J, Meng C, et al. Oleanolic acid alleviates ANIT-induced cholestatic liver injury by activating Fxr and Nrf2 pathways to ameliorate disordered bile acids homeostasis [J]. *Phytomedicine*, 2022, 102:154173.
- [30] Wang Y, Liu Q, Cai J, et al. Emodin prevents renal ischemia-reperfusion injury via suppression of CAMKII/DRP1-mediated mitochondrial fission [J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 916:174603.
- [31] Ayazoglu Demir E, Mentese A, Kucuk H, et al. p-Coumaric acid alleviates cisplatin-induced ovarian toxicity in rats [J]. *J Obstet Gynaecol Res*, 2022, 48(2): 411-419.
- [32] Zhang J, Kang H, Wang L, et al. Chrysophanol ameliorates high-fat diet-induced obesity and inflammation in neonatal rats [J]. *Pharmazie*, 2018, 73(4): 228-233.
- [33] Zhang D, Jing B, Chen Z, et al. Ferulic acid alleviates sciatica by inhibiting peripheral sensitization through the RhoA/p38MAPK signalling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154420.
- [34] Wang M, Wang S, Hu W J, et al. *Asparagus cochinchinensis*: A review of its botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and applications [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1068858.
- [35] 陆礼和, 陆雪萍, 袁名睿, 等. 地骨皮化学成分研究进展 [J]. *云南化工*, 2021, 48(8): 8-14.
Lu L H, Lu X P, Yuan M R, et al. Research progress on chemical constituents of lycii cortex [J]. *Yunnan Chem*

- Technol, 2021, 48(8): 8-14.
- [36] 左军, 祁天立, 胡晓阳. 茯苓化学成分及现代药理研究进展 [J]. 中医药学报, 2023, 51(1): 110-114.
- Zuo J, Qi T L, Hu X Y. Research progress in chemical constituents and modern pharmacology of *Poria cocos* [J]. Acta Chin Med Pharmacol, 2023, 51(1): 110-114.
- [37] Sun X J, Chen W D, Wang Y D. DAF-16/FOXO transcription factor in aging and longevity [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 548.
- [38] 李国林, 印大中. 近代衰老理论研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(8): 824-827.
- Li G L, Yin D Z. Research progress of modern aging theory [J]. Chin J Gerontol, 2008, 28(8): 824-827.
- [39] 李海英, 王亮, 朱凌凌. 中医学视野下女子抗衰老理论研究 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(10): 4907-4910.
- Li H Y, Wang L, Zhu L L. Research on female anti-aging theory based on traditional Chinese medicine [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(10): 4907-4910.
- [40] 庞溢媛, 秦雪梅, 杜冠华, 等. 基于衰老假说的黄芩黄酮药理作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3207-3216.
- Pang Y Y, Qin X M, Du G H, et al. Research progress on pharmacological effects and mechanisms of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* based on aging hypotheses [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2019, 50(13): 3207-3216.
- [41] 孙晓康, 张艳艳, 张晓元, 等. 衰老机制及抗衰老治疗的研究进展 [J]. 食品与药品, 2022, 24(1): 74-80.
- Sun X K, Zhang Y Y, Zhang X Y, et al. Progress on aging mechanism and anti-aging treatment [J]. Food Drug, 2022, 24(1): 74-80.
- [42] Trubitsyn Alexander G. The mechanism of programmed aging: The way to create a real remedy for senescence [J]. Curr Aging Sci, 2020, 13(1): 31-41.
- [43] Marte B M, Downward J. PKB/Akt: Connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond [J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22(9): 355-358.
- [44] Martin D, Rojo A I, Salinas M, et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression through the phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway and the Nrf2 transcription factor in response to the antioxidant phytochemical carnosol [J]. J Biol Chem, 2004, 279(10): 8919-8929.
- [45] Lai T T, Yang C M, Yang C H. Astaxanthin protects retinal photoreceptor cells against high glucose-induced oxidative stress by induction of antioxidant enzymes via the PI3K/akt/Nrf2 pathway [J]. Antioxidants, 2020, 9(8): 729.
- [46] Zhang Y, Liu B, Chen X, et al. Naringenin ameliorates behavioral dysfunction and neurological deficits in a d-galactose-induced aging mouse model through activation of PI3K/akt/Nrf2 pathway [J]. Rejuvenation Res, 2017, 20(6): 462-472.
- [47] Wang H, Zhang S, Zhai L, et al. Ginsenoside extract from ginseng extends lifespan and health span in *Caenorhabditis elegans* [J]. Food Funct, 2021, 12(15): 6793-6808.

[责任编辑 刘东博]