

【 实验研究 】

基于 HIF-1 信号通路探究人参固本丸延缓皮肤衰老作用机制

冯雪琴, 王 硕, 吴佩潼, 张凯月, 申嘉明, 胡学生, 李春楠, 吕经纬, 高晓晨*, 孙佳明*

长春中医药大学 吉林省人参科学研究院, 吉林 长春 130117

摘 要: 目的 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术、网络药理学、分子对接、分子动力学模拟和实验验证, 探究人参固本丸的物质基础及延缓皮肤衰老的作用机制。方法 根据正、负离子模式下质谱信息、质荷比、二级碎片离子等信息结合相关文献, 推测鉴定化学成分。采用网络药理学方法, 通过 Swiss Target Prediction 数据库获取人参固本丸的作用靶点, Genecards 数据库筛选皮肤衰老靶点, 取交集靶点, 利用蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 分析核心靶点的关键通路。根据网络药理学结果, 选择 *P* 值排名第 1 的 HIF-1 信号通路及其对应的人参固本丸中化合物进行分子对接及分子动力学模拟。应用 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞皮肤衰老模型, CCK-8 法评价人参固本丸 (25、50、100、200、400、600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及其含药血清 (1%、5%、10%、20%、40%) 对 HaCaT 细胞存活率的影响; 给予人参固本丸 (50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 后, DCFH-DA 避光染色检测活性氧 (ROS) 含量, 检测细胞划痕愈合率, 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 法检测衰老相关基因、炎症衰老相关分泌型基因、HIF-1 信号通路中核心靶点的 mRNA 水平。结果 从人参固本丸中鉴定出 95 个化合物; 网络药理学分析出 12 个核心靶点, 筛选出 HIF-1 信号通路及对应的核心靶点蛋白激酶 B (AKT1)、丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK3)、信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、B 淋巴细胞瘤-2 (BCL2)、白细胞介素 (IL)-6、低氧诱导因子 1A (HIF1A)。分子对接和分子动力学模拟验证活性成分 5, 7-二羟基-6, 8, 4'-三甲氧基黄酮、(+)-松脂醇、亚油酸、伪原薯蓣皂苷、*N*-对香豆酰酪胺和 HIF-1 信号通路核心靶点亲和力良好, 构象稳定。体外实验表明, 与模型组比较, 人参固本丸可促进 HaCaT 细胞增殖、提高愈合率、降低 ROS 水平 ($P<0.05$ 、 0.01), 人参固本丸组 MAPK3、STAT3、IL-6、HIF1A、AKT1、肿瘤坏死因子 (*TNF*)- α 、*p53*、*p21*、*p16* mRNA 水平表达显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 表皮生长因子受体 (EGFR)、B 淋巴细胞瘤-2 (BCL2) mRNA 水平表达升高 ($P<0.05$ 、 0.01)。结论 人参固本丸中的化学成分可能通过调控 AKT1、MAPK3、STAT3、EGFR、BCL2、IL-6、HIF1A 靶点, 降低 ROS、炎症水平, 延缓皮肤衰老。

关键词: 人参固本丸; 皮肤衰老; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; 网络药理学; 分子对接; HIF-1 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)01-0011-17

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.002

Explore mechanism of Renshen Guben Pills in delaying skin aging based on HIF-1 signal pathway

FENG Xueqin, WANG Shuo, WU Peitong, ZHANG Kaiyue, SHEN Jiaming, HU Xuesheng, LI Chunnan, LÜ Jingwei, GAO Xiaochen, SUN Jiaming

Jilin Ginseng Academy, Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective Based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS technology, network pharmacology, molecular docking, molecular dynamics simulation, and experimental validation, to explore the components and delay skin aging mechanism of Renshen Guben Pills. **Methods** According to the mass spectrum information, mass-to-charge ratio, secondary fragment ions and other information in positive and negative ion modes, combined with related literature, the compounds in Renshen Guben Pills were speculated and identified. Using the method of network pharmacology, the target of chemical components of Renshen Guben Pills was obtained

收稿日期: 2024-07-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074127); 吉林省发展和改革委员会项目 (2023C027-2)

作者简介: 冯雪琴, 硕士研究生。E-mail: Fxq5691@126.com

*通信作者: 高晓晨, 副主任药师。E-mail: gao_xiaochen@hotmail.com

孙佳明, 教授, 博士生导师。E-mail: Sun_jiaming2000@163.com

through SwissTargetPrediction database, and the target of skin aging was obtained through Genecards database, and the two targets were mapped to take the intersection target. Using PPI and KEGG to analyze the key pathways of core targets. Molecular docking and molecular dynamics simulation were used to confirm the relationship between chemical components and core targets. Using the H_2O_2 -induced HaCaT cell skin aging model, the effects of Renshen Guben Pills (25, 50, 100, 200, 400, 600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and their drug-containing serum (1%, 5%, 10%, 20%, 40%) on the survival rate of HaCaT cells were evaluated by the CCK-8 method. After administration of Renshen Guben Pills (50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), the content of ROS was detected by DCFH-DA staining in the dark, and the cell scratch healing rate was also measured. The mRNA levels of aging-related genes, inflammatory aging-related secretory phenotypes and core targets in HIF-1 signaling pathway were detected by qRT-PCR. **Results** The results showed that 95 compounds were identified from Renshen Guben Pills, 12 core targets were identified through network pharmacology analysis, and the HIF-1 signaling pathway and its corresponding core targets AKT1, MAPK3, STAT3, EGFR, BCL2, IL-6, and HIF1A were selected. Molecular docking and molecular dynamics simulations confirmed that the active ingredients 5, 7-dihydroxy-6, 8, 4'-trimethoxyflavone, (+)-pinoselin, linoleic acid, pseudostellarin glycoside, *N*-*p*-coumaroyltyrosine, and the HIF-1 signaling pathway core targets had good affinity and stable conformation. *In vitro* experiments showed that compared with the model group, Renshen Guben Pills could promote the proliferation of HaCaT cells, increase the healing rate, and reduce the level of ROS ($P < 0.05, 0.01$). The levels of mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), interleukin (IL)-6, hypoxia-inducible factor 1A (HIF1A), protein kinase B (AKT1), tumor necrosis factor (TNF)- α , *p53*, *p21* and *p16* mRNA expression were significantly lower in the Renshen Guben Pills group ($P < 0.05, 0.01$), while the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and B-cell lymphoma 2 (BCL2) mRNA was higher ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** The chemical components in Renshen Guben Pills may regulate AKT1, MAPK3, STAT3, EGFR, BCL2, IL-6, and HIF1A targets, reduce ROS and inflammation levels, and delay skin aging.

Key words: Renshen Guben Pills; skin aging; UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS; network pharmacology; molecular docking; HIF-1 signal pathway

皮肤衰老也称皮肤老化,是最直接、最常见反映人体衰老的器官变化,主要表现为皮肤松弛、皱纹增多、皮肤弹性降低。皮肤的氧化损伤是造成皮肤衰老的主要原因之一。氧化应激主要由活性氧(ROS)引起,导致DNA损伤、线粒体功能障碍,破坏细胞结构与功能,并介导炎症反应^[1]。在衰老的情况下,皮肤微环境中上调的促炎因子会引发和加剧细胞衰老并分泌衰老相关表型因子,包括炎症细胞因子、生长因子等,导致衰老皮肤被大量炎症因子浸润^[2]。

人参固本丸记载于《叶氏录验方》,按天(天冬)、地(生地黄、熟地黄)、人(人参)配制,为末,炼蜜为丸,空腹用温酒或盐汤送下,诸药味甘补益,共奏补血益气、生精固本、延年益寿之药效。研究发现,人参固本丸具有明显的抗疲劳、抗氧化能力,增加小鼠皮肤表皮、真皮厚度,抑制皮肤组织中弹力纤维和胶原蛋白的降低,延缓皮肤衰老^[3-5]。但关于人参固本丸的有效成分及如何延缓皮肤衰老的作用机制尚不明确。

本研究采用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术对人参固本丸的化学成分进行系统分析。以指认出的化学成分为基础,通过网络药理学研究人参固本丸延缓皮肤衰老的核心靶点及作用机制,进一步

使用分子对接和分子动力学模拟进行虚拟验证分析。并结合体外实验多个指标深入探究,以期阐明人参固本丸延缓皮肤衰老的药效物质基础和作用机制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱串联 Q-Exactive Orbitrap 四级杆-静电场轨道高分辨质谱仪(Thermo Scientific 公司); CO_2 培养箱(Thermo 公司); 酶标仪(美谷分子仪器有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪(美国应用生物系统公司)。

1.2 药物与主要试剂

人参、生地黄、熟地黄、天冬、麦冬购自吉林省宏检大药房有限公司,经长春中医药大学孙佳明教授鉴定均符合《中国药典》2020 年版一部的要求;乙腈、甲酸、水(色谱级),Fisher 公司,其他试剂均为分析纯;30%过氧化氢(H_2O_2),上海麦克林科技股份有限公司;DCFH-DA 荧光探针,北京索莱宝科技有限公司。

1.3 实验细胞

人永生化角质形成细胞(HaCaT)购于赛百慷生物技术股份有限公司。细胞培养于含有 10%胎牛血清、1%青-链霉素的 DMEM/F12 培养基的培养瓶

中, 放置在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱。

1.4 实验动物

SPF 级别雄性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(辽) 2020-0001。大鼠饲养环境温度 18~22 °C、湿度 40%~70%, 12 h 明暗循环可控, 自由进食饮水。动物实验经长春中医药大学动物伦理委员会批准(批准号 2020105)。

2 方法

2.1 人参固本丸样品的制备

人参固本丸由人参、生地黄、熟地黄、天冬、麦冬组成, 按 1:2:2:2:2 的配比进行制备。70% 乙醇超声 2 次, 每次 1 h, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩除去溶剂, 蒸干。取干膏用 70% 甲醇配制成质量浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的样品溶液, 离心取上清, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得人参固本丸样品溶液, 作为液质分析样品。将人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 作为人参固本丸的质控标准, 经紫外-可见分光光度法测得人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re 的总质量分数为 13.85%。

2.2 人参固本丸含药血清的制备

12 只 SD 大鼠随机分成对照组、人参固本丸(8.1 g·kg⁻¹, 根据复方比例以及药材在药典里面的限量, 并结合血清药物化学换算成大鼠给药剂量)组, 每天 ig 给药 1 次, 连续 3 d, 对照组大鼠 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液。末次给药前禁食 12 h, 末次给药 1 h 后麻醉大鼠, 于无菌状态下腹主动脉采血, 置于无抗凝剂的采血管中, 室温静置 30 min, 待血清析出后, 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 分装, 置于-80 °C 的冰箱中冷冻保存待用。

2.3 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 检测条件

2.3.1 色谱条件 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相: 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0~20 min, 98%~51% A; 20~30 min, 51%~10% A; 30~45 min, 10%~0% A; 45~55 min, 0% A; 55~56 min, 0%~98% A; 56~66 min, 98% A。体积流量 0.3 mL·min⁻¹; 进样量 10 μL; 柱温 30 °C。

2.3.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 检测模式: 正离子、负离子检测模式; Full MS 分辨率 m/z 70 000; dd-MS 分辨率 m/z 17 500; 扫描范围 m/z 100~1 500; 雾化器温度 300 °C; 干燥气温度 350 °C; 毛细管电压 3.5 kV; 碎裂电压 220 V; 锥孔电压 65 V。

2.4 网络药理学分析

2.4.1 成分和疾病靶点获取 将液质分析指认成分输入 Pubchem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 Canonical SMILES 号并下载 2D 结构, 通过 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库获取成分靶点。运用 Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>), 以“Skin aging” 为关键词, 获取疾病靶点。

2.4.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI) 分析网络构建和核心靶点筛选 为了进一步明确人参固本丸延缓皮肤衰老的具体作用机制。使用 jvenn(<https://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 在线绘制韦恩图, 获取人参固本丸延缓皮肤衰老交集靶点。将交集靶点输入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/cgi/input.pl>) 进行 PPI 分析。下载“TSV” 格式文件, 导入 Cytoscape 3.10.1 软件中, 以分别大于中介中心性(BC)、接近中心性(CC)、点度中心性(DC) 的平均值为指标筛选核心靶点。

2.4.3 基因本体(GO) 和京都基因与基因组百科全书(KEGG) 分析 将核心靶点输入 metascape(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 数据库, 以 $P<0.05$ 为筛选条件, 进行 GO 和 KEGG 通路富集分析。通过微生信平台对结果可视化处理, 构建“药味-成分-靶点-通路-疾病” 网络。

2.5 分子对接

运用 AutoDock Vina 1.2.2 将配体成分与受体蛋白分子对接, 根据计算出的结合能大小, 分析配体与受体结合的稳定程度。并通过 Pymol 2.0 作图将受体与配体结合方式进行可视化处理, 显示出配体受体通过氢键、氨基酸残基的结合。

2.6 分子动力学模拟

将分子对接结果作为初始结构, 采用 Gromacs 2022.2 软件对体系进行模拟。力场选择 Charmm36 力场, 水模型选择 TIP3P 模型, 对体系进行溶剂化、离子平衡。最后采用正则系统(NVT) 和等温等压系统(NPT) 平衡体系, 然后在常温常压下进行 100 ns 的分子动力学模拟。分子动力学计算完成后, 通过均方根偏差(RMSD)、均方根涨落(RMSF)、回旋半径(RG) 分析分子动力学轨迹的结构特性。

2.7 细胞实验

2.7.1 H₂O₂ 诱导 HaCaT 细胞衰老模型的构建 取 HaCaT 细胞以每孔 1×10^6 个接种于 96 孔板, 分为对照组、不同浓度的 H₂O₂ (25、50、100、200、

400、600、800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 2 h 后每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 孵育 1 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.7.2 人参固本丸及含药血清对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞衰老的保护作用 按“2.7.1”项下方法, 用 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 诱导 2 h, 加入不同质量浓度人参固本丸 (25、50、100、200、400、600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 及不同体积分数人参固本丸含药血清 (1%、5%、10%、20%、40%) 培养 24 h, 对照组不造模不加药, 模型组不加药。加入 10 μL CCK-8 溶液, 孵育 1 h, 酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

2.7.3 ROS 检测 将处于对数生长期的 HaCaT 细胞以每孔 1×10^6 个的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h, 用 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 诱导 2 h, 加入不同质量浓度人参固本丸 (50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 处理 24 h, 对照组不造模不加药, 模型组不加药。用 PBS 洗涤细胞, 加入 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 避光染色 20 min, PBS 洗涤 3 次, 荧光显微镜下观察 ROS 水平。

2.7.4 细胞划痕 细胞接种同“2.7.3”项, 使用 200 μL 枪头垂直于底部直线划线, 弃上清, PBS 清洗 3 次。按“2.7.3”项下方法造模、给药后继续培养, 倒置显微镜下观察 0、24 h 的细胞迁移情况。

Image Pro Plus6.0 软件计算划痕愈合率。

2.7.5 实时荧光定量-PCR (qRT-PCR) 检测相关基因水平 细胞接种、造模、给药同“2.7.3”项, 从 HaCaT 细胞中提取总 RNA, 测定 260、280 nm 处 A 值, 计算其纯度和浓度。采用 qRT-PCR 检测衰老相关基因 $p53$ 、 $p21$ 、 $p16$, 炎性衰老相关基因肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-6, HIF-1 信号通路中的核心靶点丝裂原激活的蛋白激酶 (MAPK3)、信号传导及转录激活蛋白 3 (STAT3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、B 淋巴细胞瘤-2 (BCL2)、 IL-6 、低氧诱导因子-1A (HIF1A)、蛋白激酶 B (AKT1) mRNA 的表达情况。根据测得已知浓度, 计算所需 RNA 含量, 进行去除基因组 DNA 反应、反转录反应、PCR 扩增反应。以 GAPDH 作为内参进行基因标准化处理, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行分析。相关靶点蛋白上下游引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequence

引物名称	上游引物序列 (5'→3')	下游引物序列 (5'→3')
$p53$	GCTGCTCAGATAGCGATGGTCT	CAACCTCAGGCGGCTCATAG
$p21$	CCTGTCACGTGCTTGTACCCCTTGT	AGTGGTAGAAATCTGTTCATGCTGG
$p16$	AGGTCATGATGATGGGCAGC	CATGGTTACTGCCTCTGGTGC
$\text{TNF-}\alpha$	GCTGCACTTTGGAGTGATCG	ATGAGGTACAGGCCCTCTGA
IL-6	TTCGGTCCAGTTGCCTTCTC	AGTGCCTCTTTGCTGCTTTCA
STAT3	GAGAAGGACATCAGCGGTAAG	CAGTGGAGACACCAGGATATTG
EGFR	AGTCGGGCTCTGGAGGAAAA	CCAAGGACCACCTCACAGTTAT
BCL2	ATCGCCCTGTGGATGACTGA	GAGACAGCCAGGAGAAATCAAAC
HIF1A	TGATTGCATCTCCATCTCCTACC	GACTCAAAGCGACAGATAACACG
AKT1	TGCACAAACGAGGGGAGTACA	GCGCCACAGAGAAGTTGTTGA
MAPK3	AGAGATGTCTACATTGTGCAGGACC	AGCAGGTTGGAGGGCTTTAGAT
GAPDH	GGAAGCTTGTCAATGGAATC	TGATGACCCTTTGGCTCCC

2.8 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, GraphPad Prism 8 软件进行作图, 两组间差异采用独立样本 t 检验, 多组间采用单因素方差分析 (ANOVA), 数据非正态时采用非参数检验。

3 结果

3.1 人参固本丸成分指认

根据相关参考文献与自建数据库, 通过一级质荷比, 并结合分子离子峰及主要碎片信息, 对采集的正、负离子流图 (图 1) 采用 Xcalibur 4.0

软件进行解析, 共推测鉴定出 95 个化学成分 (表 2)。其中, 39 个来源于人参, 28 个来源于生地黄, 26 个来源于熟地黄, 16 个来源于麦冬, 8 个来源于天冬。

3.2 网络药理学分析

3.2.1 人参固本丸交集靶点筛选 将上述鉴定化合物经 SwissTargetPrediction 数据库检索, 得到人参固本丸复方中化合物对应靶点 637 个。通过 Genecards 数据库获取皮肤衰老靶点, 选取 Relevance score > 15 的靶点 816 个。将化合物靶点与疾病靶点取交集, 共得到 135 个交集靶点, 见图 2-A。

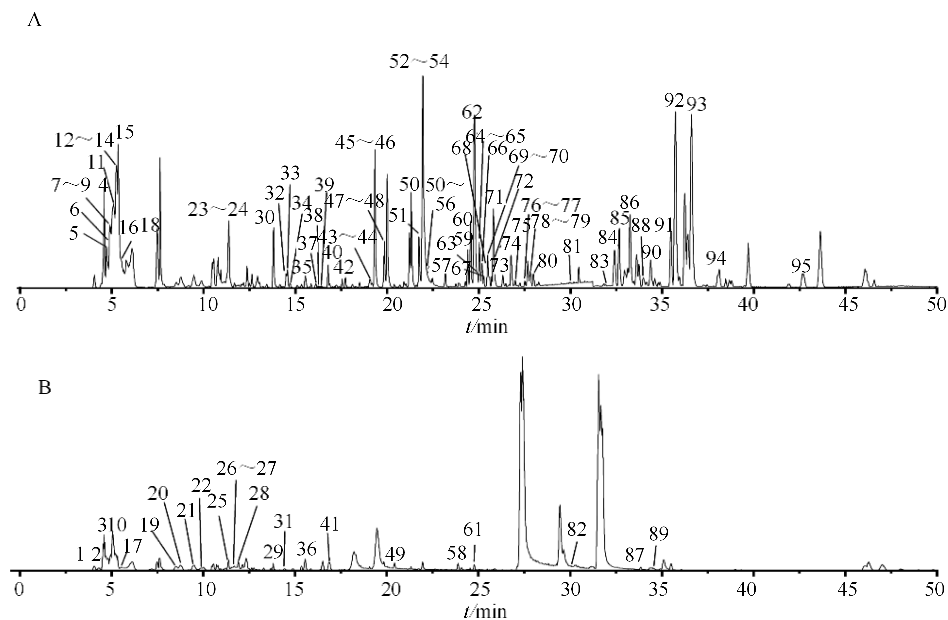


图 1 人参固本丸负 (A)、正 (B) 离子模式下的离子流图
Fig. 1 Ion flow diagram of Renshen Guben Pills in negative (A) and positive (B) ion modes

表 2 人参固本丸化学成分分析
Table 2 Chemical composition analysis of Renshen Guben Pills

序号	t _R /min	分子式	化合物	离子模式	准分子离子峰	二级碎片	归属	参考文献
1	4.64	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	精氨酸	[M+H] ⁺	175.119 2	158.095 8、130.100 5、116.073 5、70.067 4	RS、DH	6
2	4.76	C ₁₂ H ₂₄ N ₄ O ₇	精氨酸葡萄糖苷	[M+H] ⁺	337.171 5	175.122 8、158.095 9	RS	6
3	4.80	C ₁₈ H ₃₄ N ₄ O ₁₂	精氨酸葡萄糖二糖苷	[M+H] ⁺	499.225 4	337.178 8、175.122 9、158.096 3	RS	6
4	4.81	C ₂₀ H ₂₂ O ₆	(+)-松脂醇	[M-H] ⁻	357.134 2	321.086 5、109.041 3	TD	7
5	4.92	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	麦冬黄烷酮 A	[M-H] ⁻	327.087 5	309.083 3、171.007 0、131.046 0	MD	8
6	5.10	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	棉子糖	[M-H] ⁻	503.161 1	383.121 6、179.056 6、89.023 7、71.013 0	RS、DH、SDH	6
7	5.11	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	潘糖	[M-H] ⁻	503.161 1	383.121 6、323.102 2、221.067 8、179.056 6	RS	9
8	5.12	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆	甘露三糖	[M-H] ⁻	503.161 3	383.121 6、341.110 6、221.067 8	SDH	10
9	5.13	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	麦芽糖	[M-H] ⁻	341.108 5	221.067 9、179.056 6、113.024 1	RS	9
10	5.15	C ₅ H ₉ NO ₂	脯氨酸	[M+H] ⁺	116.070 5	70.067 4	RS	6
11	5.26	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	京尼平苷	[M-H] ⁻	387.129 8	179.056 6	SDH	11
12	5.32	C ₃₀ H ₅₂ O ₂₆	毛蕊花糖	[M-H] ⁻	827.266 6	665.216 2、485.152 8、383.121 8、341.111 0、179.056 5	DH、SDH	10

表 2 (续)

序号	t _R /min	分子式	化合物	离子模式	准分子 离子峰	二级碎片	归属	参考 文献
13	5.35	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	蔗糖	[M-H] ⁻	341.109 2	179.056 6、119.034 6、 89.023 7、71.013 0	RS、SDH	6
14	5.37	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	蜜二糖	[M-H] ⁻	341.108 4	297.085 1、161.045 7、 143.034 9、119.034 6	SDH	10
15	5.39	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	绿原酸	[M-H] ⁻	353.088 3	191.020 5、173.009 6	RS	12
16	5.56	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	京尼龙胆双糖苷	[M-H] ⁻	549.182 5	179.056 5	DH	12
17	5.76	C ₁₀ H ₁₉ NO ₇	γ-氨基丁酸葡萄糖苷	[M+H] ⁺	266.123 2	230.108 5、194.084 7、 98.062 6	RS	6
18	7.44	C ₂₄ H ₄₂ O ₂₁	水苏糖	[M-H] ⁻	665.215 7	485.153 9、341.111 2、 323.100 9	DH	13
19	8.40	C ₅ H ₅ N ₅ O	鸟嘌呤	[M+H] ⁺	152.056 7	110.683 0	DH	14
20	8.79	C ₆ H ₆ N ₂ O	烟酰胺	[M+H] ⁺	123.055 0	96.047 3、80.051 9	RS	6
21	9.61	C ₁₁ H ₁₅ NO ₇	脯氨酸戊糖苷	[M+H] ⁺	274.092 3	238.076 6、192.069 7、 130.053 2、97.031 1	RS	6
22	9.75	C ₅ H ₇ NO ₃	L-焦谷氨酸	[M+H] ⁺	130.049 6	84.046 9	RS	6
23	11.39	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	梓醇	[M-H] ⁻	361.114 5	169.051 1、125.023 9	DH、SDH	14
24	11.41	C ₁₅ H ₂₂ O ₁₀	单密力特苷	[M-H] ⁻	361.114 1	199.060 8、161.045 5	DH、SDH	11
25	11.43	C ₉ H ₁₁ NO ₃	酪氨酸	[M+H] ⁺	182.081 4	136.078 8、123.046 9	RS、DH	6
26	11.62	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	腺苷	[M+H] ⁺	268.104 3	136.064 9	RS	6
27	11.65	C ₅ H ₅ N ₅	腺嘌呤	[M+H] ⁺	136.061 5	119.038 0	RS	6
28	11.79	C ₁₂ H ₂₃ NO ₇	异亮氨酸果糖苷	[M+H] ⁺	294.154 5	276.150 1、230.143 7、 144.105 1、86.098 9	RS、DH	6
29	13.81	C ₉ H ₁₁ NO ₂	苯丙氨酸	[M+H] ⁺	166.086 5	120.083 7、103.056 8	RS	6
30	13.83	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	京尼平苷酸	[M-H] ⁻	373.114 2	211.062 7、149.060 9、 123.044 8	DH	14
31	14.40	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	亚油酸	[M+H] ⁺	281.247 9	263.152 9、221.130 9	RS	9
32	14.48	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	马钱苷酸	[M-H] ⁻	375.128 9	213.077 8、169.087 2、 69.033 6、59.012 9	DH	14
33	14.49	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	8-表番木鳖酸	[M-H] ⁻	375.129 3	213.077 8、169.087 2、 151.076 4、119.034 6、 113.023 9	DH、SDH	15
34	14.58	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	脱咖啡酰基毛蕊糖苷	[M-H] ⁻	461.166 9	315.110 5、297.099 2、 161.045 7、135.044 9	DH、SDH	15
35	15.78	C ₁₆ H ₂₆ O ₈	地黄苦苷	[M-H] ⁻	345.155 6	183.103 1、179.0352、 165.092 3、119.034 6	DH、SDH	13
36	16.66	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂	尿嘧啶	[M+H] ⁺	113.034 4	96.083 3	RS、DH	6
37	16.76	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	洋地黄叶苷 B	[M-H] ⁻	785.250 4	623.221 7、161.024 5	DH	16
38	16.78	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	地黄苦苷元	[M-H] ⁻	183.102 8	139.039 8、119.034 6	DH、SDH	17
39	16.79	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	松果菊苷	[M-H] ⁻	785.250 6	623.221 7、161.024 5、 133.029 4	DH、SDH	18
40	16.82	C ₃₅ H ₄₆ O ₂₀	洋地黄叶苷 C	[M-H] ⁻	785.250 1	623.221 7、161.024 5	SDH	19
41	16.92	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	5, 7, 4'-三羟基高异黄酮	[M+H] ⁺	285.075 2	242.272 4、198.035 9	MD	8
42	17.75	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	焦地黄苯乙醇苷 A ₁ /A ₂	[M-H] ⁻	799.266 7	623.221 5、605.208 3、 461.166 8	DH、SDH	15

表 2 (续)

序号	t _R /min	分子式	化合物	离子模式	准分子离子峰	二级碎片	归属	参考文献
43	19.14	C ₃₇ H ₅₀ O ₂₀	焦地黄苯乙醇苷 B ₁ /B ₂	[M-H] ⁻	813.282 1	637.231 6、175.040 4	DH、SDH	15
44	19.16	C ₃₇ H ₅₀ O ₂₀	吉奥诺苷 B ₁ /B ₂	[M-H] ⁻	813.282 9	637.231 6、175.040 4	DH	14
45	19.33	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	异毛蕊花糖苷	[M-H] ⁻	623.198 8	161.024 6、135.044 9、 113.023 9	DH、SDH	16
46	19.35	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	毛蕊花糖苷	[M-H] ⁻	623.198 5	461.168 7、161.024 6	DH、SDH	10
47	19.94	C ₂₆ H ₄₀ O ₁₇	kankanoside F	[M-H] ⁻	623.219 8	477.142 6	SDH	10
48	19.97	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	连翘酯苷 A	[M-H] ⁻	623.198 0	477.142 6、315.110 8	SDH	11
49	20.60	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O ₂	川芎嗪	[M+H] ⁺	265.097 2	247.092 3、206.089 0	RS	9
50	20.96	C ₅₀ H ₈₄ O ₂₃	officinalisnin II	[M-H] ⁻	1 051.533 9	919.494 0、889.481 3、 757.440 6、595.385 1	TD	20
51	21.75	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	地黄苷 A	[M-H] ⁻	523.166 1	343.119 4、179.056 5	DH	15
52	21.80	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	6-O-E-阿魏酰基筋骨草醇	[M-H] ⁻	523.181 4	343.119 4、193.051 2	DH、SDH	15
53	21.82	C ₂₁ H ₃₂ O ₁₅	密力特苷	[M-H] ⁻	523.165 9	343.119 4、179.056 5	SDH	10
54	21.83	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	5-阿魏-益母草苷	[M-H] ⁻	523.182 1	343.119 4、193.051 2、 175.040 4、160.016 5、 134.036 9	SDH	10
55	22.11	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	原新薯蓣皂苷	[M-H] ⁻	1 047.537 2	901.483 3、883.472 9、 755.425 0、737.415 5、 593.371 3、575.359 2	TD	21
56	22.13	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₂	原薯蓣皂苷	[M-H] ⁻	1 047.536 1	901.483 3、755.425 0、 593.371 3	TD	21
57	22.52	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	地黄苷/异地黄苷	[M-H] ⁻	651.232 6	475.187 5、193.051 1、 175.040 4	DH、SDH	15
58	24.59	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	人参炔三醇	[M+H] ⁺	279.195 2	245.658 4	RS	9
59	24.61	C ₅₄ H ₉₂ O ₂₃	人参皂苷 Rb ₁	[M-H] ⁻	1 107.596 1	945.546 1、783.493 5、 621.439 8、459.382 7	RS	22
60	24.75	C ₅₁ H ₈₂ O ₂₁	伪原薯蓣皂苷	[M-H] ⁻	1 029.526 3	883.472 7、737.414 8	TD	21
61	24.76	C ₃₃ H ₅₂ O ₈	延龄草苷	[M+H] ⁺	577.373 2	159.120 3、147.120 4、 91.041 4	TD	23
62	24.78	C ₅₇ H ₉₄ O ₂₆	丙二酰基人参皂苷 Rb ₁	[M-H] ⁻	1 193.595 6	1 149.614 5、1 107.599 1、 1 089.585 6	RS	24
63	25.05	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	人参皂苷 Rc	[M-H] ⁻	1 077.585 8	945.546 6、783.493 5、 621.440 0	RS	12
64	25.16	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	人参皂苷 Rg ₁	[M-H] ⁻	799.484 1	637.437 6、475.381 0、 161.045 7	RS	24
65	25.19	C ₄₂ H ₇₂ O ₁₄	人参皂苷 Rf	[M-H] ⁻	799.484 5	637.437 6、475.381 0	RS	22
66	25.20	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	肉苁蓉苷 A	[M-H] ⁻	799.266 7	623.221 5、160.028 7、 135.044 9	DH、SDH	17
67	25.29	C ₅₆ H ₉₂ O ₂₅	丙二酰基人参皂苷 Rc	[M-H] ⁻	1 163.585 9	1 077.588 7、1 059.578 0、 915.545 3	RS	24
68	25.51	C ₅₃ H ₉₀ O ₂₂	人参皂苷 Rb ₂	[M-H] ⁻	1 077.585 5	945.546 1、783.492 9、 621.439 1、459.385 7	RS	22
69	25.72	C ₄₉ H ₉₆ O ₃₀	丙二酰人参皂苷 Rb ₂	[M-H] ⁻	1 163.590 0	1 077.588 9、1 059.577 3	RS	6

表 2 (续)

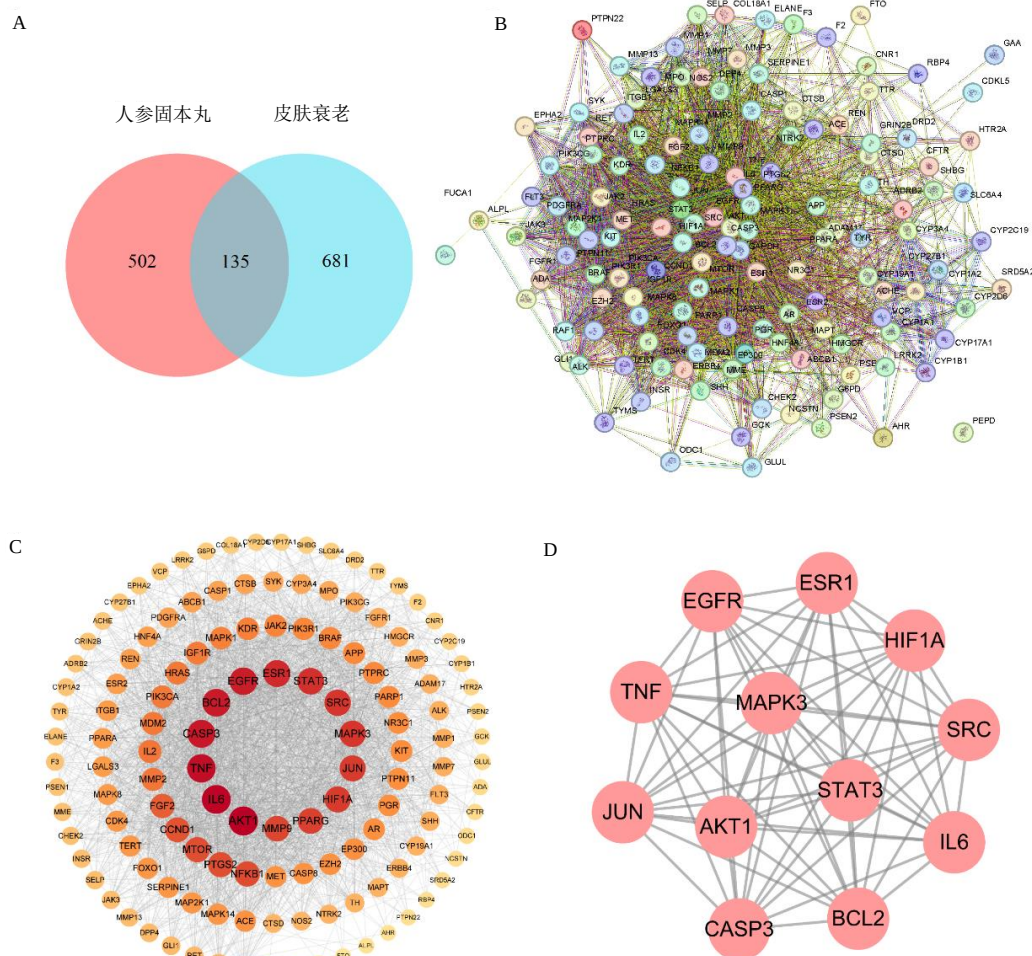
序号	tr/min	分子式	化合物	离子模式	准分子离子峰	二级碎片	归属	参考文献
70	25.74	C ₄₉ H ₉₆ O ₃₀	丙二酰人参皂苷 Rb ₃	[M-H] ⁻	1 163.590 2	1 077.588 9、1 059.577 3	RS	6
71	25.78	C ₄₈ H ₇₆ O ₁₉	人参皂苷 Ro	[M-H] ⁻	955.491 8	793.441 0、569.387 6、455.355 5	RS	6
72	25.84	C ₂₈ H ₄₀ O ₁₀	地黄新萜 C	[M-H] ⁻	535.254 7	163.0401, 145.0294	SDH	10
73	26.75	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	人参皂苷 Re	[M-H] ⁻	945.542 1	783.493	RS	24
74	26.78	C ₄₈ H ₈₂ O ₁₈	人参皂苷 Rd	[M-H] ⁻	945.542 3	783.493 0、621.439 9、459.386 0	RS	9
75	27.02	C ₅₁ H ₈₄ O ₂₁	丙二酸甲酰基人参皂苷 Rd	[M-H] ⁻	1 031.543 8	945.545 5、927.546 3、783.494 9、765.484 8	RS	24
76	27.55	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	OA-glc-glurA	[M-H] ⁻	793.436 6	631.388 7、569.381 4	RS	6
77	27.56	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	竹节人参皂苷 IVa	[M-H] ⁻	793.438 2	569.381 4	RS	24
78	27.71	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	9, 10, 13-TriHOME	[M-H] ⁻	329.233 6	229.145 5、211.135 0、171.102 9、139.112 6、99.033 4	RS	6
79	27.72	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	tianshic acid	[M-H] ⁻	329.233 8	171.102 9	MD	25
80	27.97	C ₂₉ H ₅₀ O	β-谷甾醇	[M-H] ⁻	413.378 5	329.235 2、283.266 1	TD	26
81	30.46	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	麦冬二氢高异黄酮 F	[M-H] ⁻	373.129 6	237.077 9、183.068 8、163.076 5	MD	27
82	30.48	C ₂₀ H ₂₂ O ₇	麦冬黄烷酮 F	[M+H] ⁺	375.143 7	251.096 6、239.096 4、137.062 6	MD	8
83	32.28	C ₁₉ H ₂₀ O ₆	5, 7, 4'-三羟基-3'-甲氧基-6, 8-二甲基-高异黄烷酮	[M-H] ⁻	343.118 2	327.126 4、209.073 1	MD	8
84	32.38	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	5, 7-二羟基-6, 8, 4'-三甲氧基黄酮	[M-H] ⁻	343.081 8	328.093 4	TD	28
85	32.62	C ₁₉ H ₂₀ O ₇	麦冬黄烷酮 E	[M-H] ⁻	359.113 9	344.091 9、223.062 4、208.038 4、154.027 1	MD	29
86	33.58	C ₁₉ H ₁₆ O ₇	6-醛基异麦冬黄烷酮 A	[M-H] ⁻	355.082 4	327.088 9	MD	30
87	34.15	C ₁₈ H ₁₄ O ₆	麦冬黄酮 A	[M+H] ⁺	327.086 2	297.077 9、203.925 9	MD	31
88	34.18	C ₁₉ H ₁₈ O ₅	甲基麦冬高异黄酮 B	[M-H] ⁻	325.107 8	195.139 6	MD	32
89	34.43	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	N-对香豆酰酪胺	[M+H] ⁺	284.128 6	147.046 2、121.066 1	MD	33
90	34.81	C ₁₈ H ₁₈ O ₅	麦冬黄烷酮 B	[M-H] ⁻	313.108 3	192.043 3	MD	34
91	35.42	C ₁₉ H ₁₆ O ₆	甲基麦冬黄酮 A	[M-H] ⁻	339.087 3	311.094 7、217.050 9	MD	29
92	35.66	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	甲基麦冬黄烷酮 A	[M-H] ⁻	341.103 3	206.059 2、178.063 7	MD	29
93	36.17	C ₁₉ H ₂₀ O ₅	甲基麦冬黄烷酮 B	[M-H] ⁻	327.124 2	206.059 2、178.063 6	MD	29
94	38.79	C ₁₉ H ₁₆ O ₇	麦冬黄烷酮 C	[M-H] ⁻	355.082 4	327.088 4、193.014 4	MD	34
95	42.61	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	表没食子儿茶素	[M-H] ⁻	305.066 9	261.136 4	RS	12

RS-人参; DH-生地黄; SDH-熟地黄; TD-天冬; MD-麦冬。

RS- *Panax ginseng*; DH- raw *Rehmannia glutinosa*; SDH-drying *Rehmannia glutinosa*; TD-*Asparagus cochinchinensis*; MD-*Ophiopogon japonicus*。

3.2.2 PPI 分析与核心靶点筛选 通过 STRING 数据库构建 135 个交集靶点的 PPI 网络, 设置为

“Homo sapiens”, 下载“tsv”文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析 (图 2-B、C)。经过 Analyze



A-交集靶点; B-STRING 分析; C-PPI 网络图; D-核心靶点。

A-Intersection target; B-STRING analysis; C-PPI network diagram; D-Core target.

图 2 网络药理学分析

Fig. 2 Network pharmacology analysis

Network 插件分析,筛选出 12 个核心靶点: HIF1A、ESR1、EGFR、TNF、MAPK3、STAT3、SRC、JUN、AKT1、IL6、CASP3、BCL2, 见图 2-D。

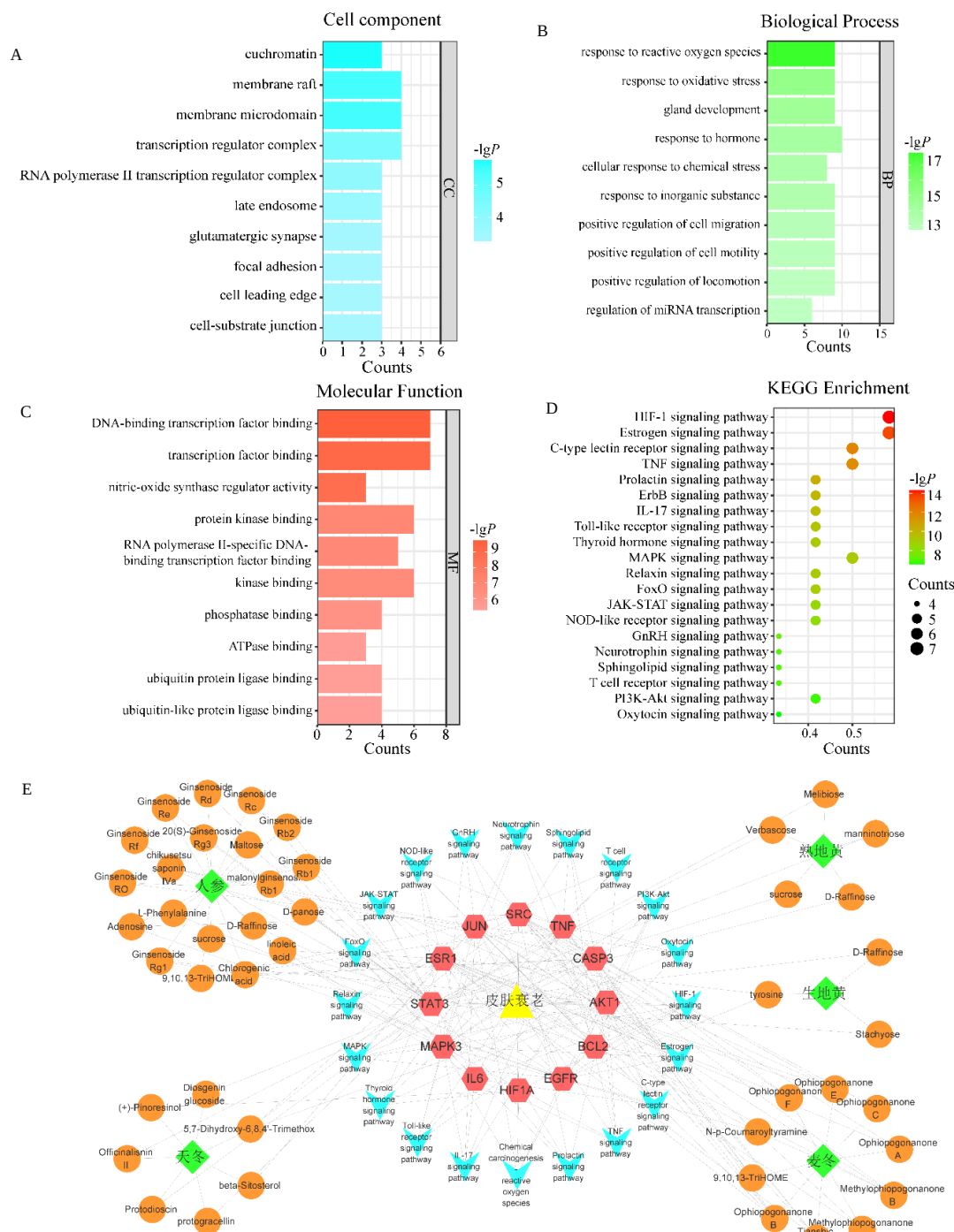
3.2.3 GO 和 KEGG 分析结果 为了确定人参固本丸延缓皮肤衰老的潜在作用机制,使用 metascape 数据库进行 GO 和 KEGG 分析。GO 生物功能分析中,涉及常染色质、膜筏、膜微区等 14 条细胞组分(CC),对活性氧的反应、对氧化应激的反应等 472 条生物过程(BP),DNA 结合转录因子、一氧化氮合酶调节活性等 30 条分子功能(MF)。选择 *P* 值排名前 10 条的结果进行可视化分析,见图 3-A、B、C。

KEGG 富集分析中得到 112 条通路,剔除与疾病明显不相关的通路,主要涉及 HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、C 型凝集素受体信号通路、TNF 信号通路等。选取 *P* 值排名前 20 条的通路进行可

视化分析,见图 3-D。构建“药味-成分-靶点-通路-疾病”网络,见图 3-E,来源于人参的人参皂苷 R_{g1}、人参皂苷 R_{b1}、人参皂苷 R_e, 地黄、熟地黄中的毛蕊花糖,天冬中的延龄草苷、伪原薯蓣皂苷,麦冬中的 *N*-对香豆酰酞胺等成分作用到 AKT1、MAPK3、STAT3、EGFR、BCL2、IL-6、HIF1A 核心靶点。

3.3 分子对接验证

根据网络药理学结果,选择 *P* 值排名第 1 的 HIF-1 信号通路及其对应的人参固本丸中化合物进行分子对接分析。一般认为,结合能越低,对接效果越好,表明活性成分配体分子与核心靶点受体蛋白之间的结合越稳定,亲和力越高。运用 AutoDock Vina 软件计算结合能,通过 PyMOL 软件将结合最好的进行可视化分析,结果见图 4、表 2,所示化合物与靶点的结合能均低于 $-16.74 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 具有良



A-CC; B-BP; C-MF; D-KEGG 通路分析; E-“药味-成分-靶点-通路-疾病”网络图。

A-CC; B-BP; C-MF; D-KEGG pathway analysis; E-"Drug flavor ingredient target pathway disease" network diagram.

图3 GO、KEGG分析及网络构建

Fig. 3 GO and KEGG analysis and network construction

好的亲和力, BCL2、EGFR 与 *N*-对香豆酰酪胺没有氢键作用。

3.4 分子动力学模拟验证

结合 KEGG 富集分析及分子对接结果,选择显

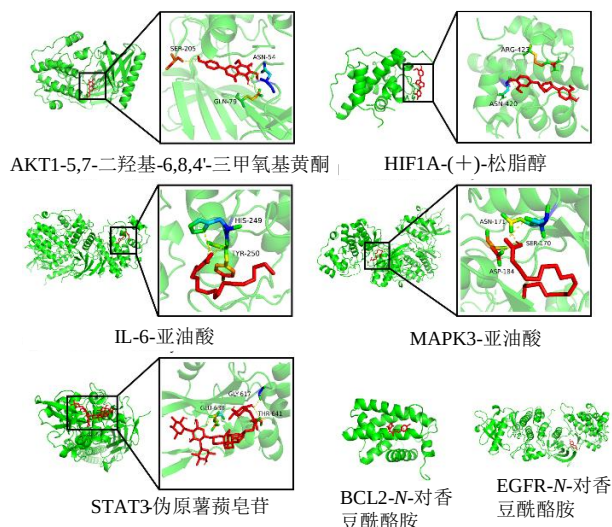
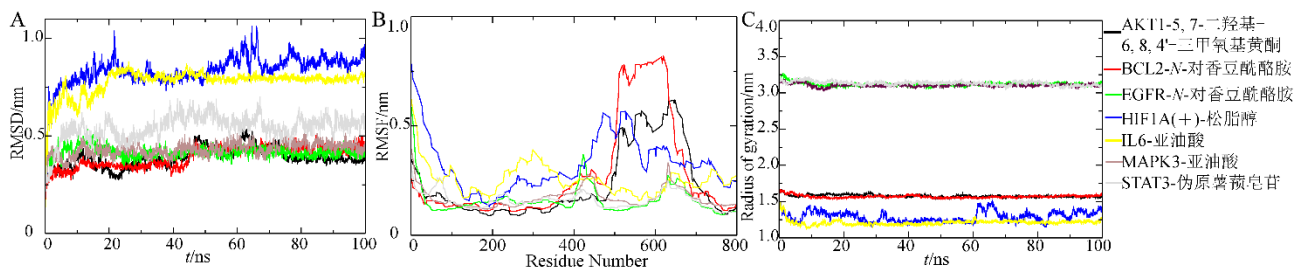


图 4 分子对接结果可视化

Fig. 4 Visualization of molecular docking results



A-RMSD 分析; B-RMSF 分析; C-RG 分析。

A-RMSD analysis; B-RMSF analysis; C-RG analysis.

图 5 分子动力学模拟

Fig. 5 Molecular dynamic simulation

配体结合的 RMSD 值均小于 1 nm, 表明复合物结合是稳定的。为了分析复合物中各种蛋白质的残基在分子动力学模拟过程中的波动性, 计算所有蛋白质的残基在模拟过程中的 RMSF 值, 值越大, 蛋白质的残基与小分子相互作用越重。结果见图 5-B, 靶点蛋白的 RMSF 值在结合部位较小, 说明整体波动较轻。RG 表征模拟过程中蛋白质结构的紧实度, 如图 5-C 所示, 在整个模拟过程中, 核心靶点与化合物结合的 RG 值被限制在 3.5 nm 以内, 表明形成的复合物是紧密的。结果验证各靶点与对应化合物均能结合稳定。

3.5 体外细胞实验

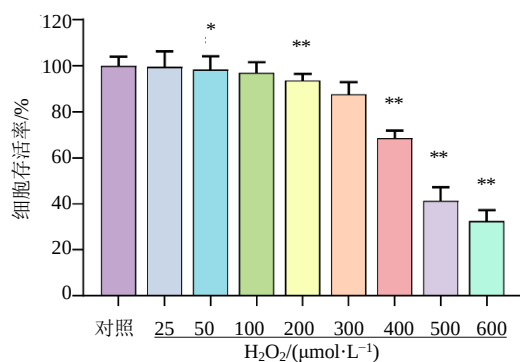
3.5.1 不同浓度 H_2O_2 对 HaCaT 细胞活力的影响
如图 6 所示, 不同浓度 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞 2 h 后, 当 H_2O_2 浓度小于 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率达到 70% 以上; 当 H_2O_2 浓度大于 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞存活率下降到 50% 以下, 不利于后续实验操

著富集到 HIF-1 信号通路上的核心靶点与对应化合物进行分子动力学模拟验证。RMSD 用于评估模拟系统是否达到稳定状态, 在 1 nm 以内表示蛋白质-配体相互作用稳定。结果表明 (图 5-A), 蛋白质与

表 2 分子对接结合能

Table 2 Molecular docking binding energy

受体-成分	结合能/($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)
AKT1-5,7-二羟基-6,8,4'-三甲氧基黄酮	-38.51
HIF1A-(+)-松脂醇	-25.12
IL-6-亚油酸	-18.00
MAPK3-亚油酸	-25.53
STAT3-伪原薯蓣皂苷	-33.07
BCL2-N-对香豆酰酪胺	-30.14
EGFR-N-对香豆酰酪胺	-30.14



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group.

图 6 不同浓度 H_2O_2 对 HaCaT 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of different concentrations of H_2O_2 on viability of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

作。因此, 选择 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 诱导 2 h 构建细胞衰老模型。

3.5.2 人参固本丸及含药血清对 H_2O_2 诱导的

HaCaT 细胞衰老的影响 如图 7 所示, $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 诱导后, 与对照组相比, 模型组细胞存活率下降 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 50、100、200、400、 $600 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参固本丸组细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 1%、5%、10%、20%、40% 人参固本丸含药血清组细胞存活率显著升高 ($P <$

0.05 、 0.01); 5% 人参固本丸含药血清组细胞存活率优于 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参固本丸组。

3.5.3 ROS 水平分析 如图 8 所示, 与对照组相比, 模型组中 HaCaT 细胞 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 人参固本丸给药组 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

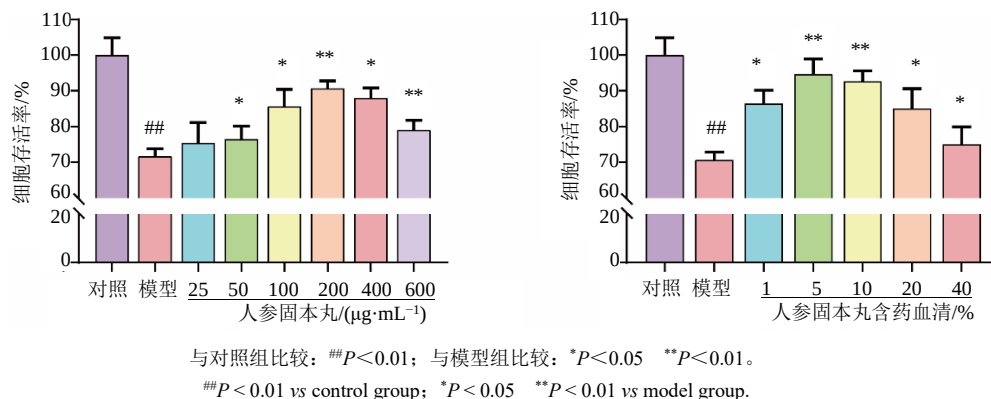


图 7 人参固本丸及含药血清对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞衰老的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effects of Renshen Guben Pills and medicated serum on H_2O_2 -induced aging of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

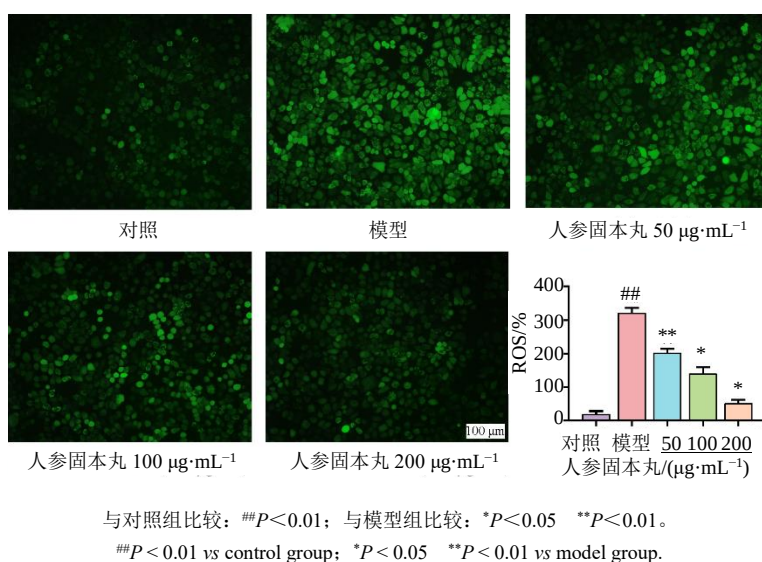


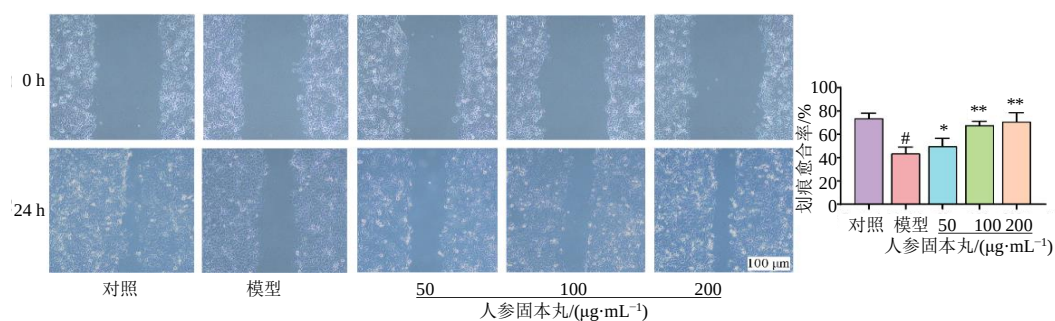
图 8 人参固本丸对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effect of Renshen Guben Pills on H_2O_2 -induced ROS level in HaCaT cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.5.4 人参固本丸对 HaCaT 细胞迁移的影响 如图 9 所示, 与对照组相比, 模型组细胞划痕愈合率降低, 迁移细胞数量减少 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 人参固本丸组细胞划痕愈合率升高, 迁移细胞数量增加 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.5.5 qRT-PCR 分析结果 如图 10 所示, HIF-1 信号通路的核心靶点中, 与对照组相比, 模型组中 *MAPK3*、*STAT3*、*IL-6*、*HIF1A*、*AKT1* mRNA 表达

水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), *EGFR*、*BCL2* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 人参固本丸 100、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 *MAPK3*、*STAT3*、*IL-6*、*HIF1A*、*AKT1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), *EGFR*、*BCL2* mRNA 表达水平升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组相比, 模型组炎症衰老相关分泌表型 *TNF-α*、*IL-6* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 人参固本丸 100、 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

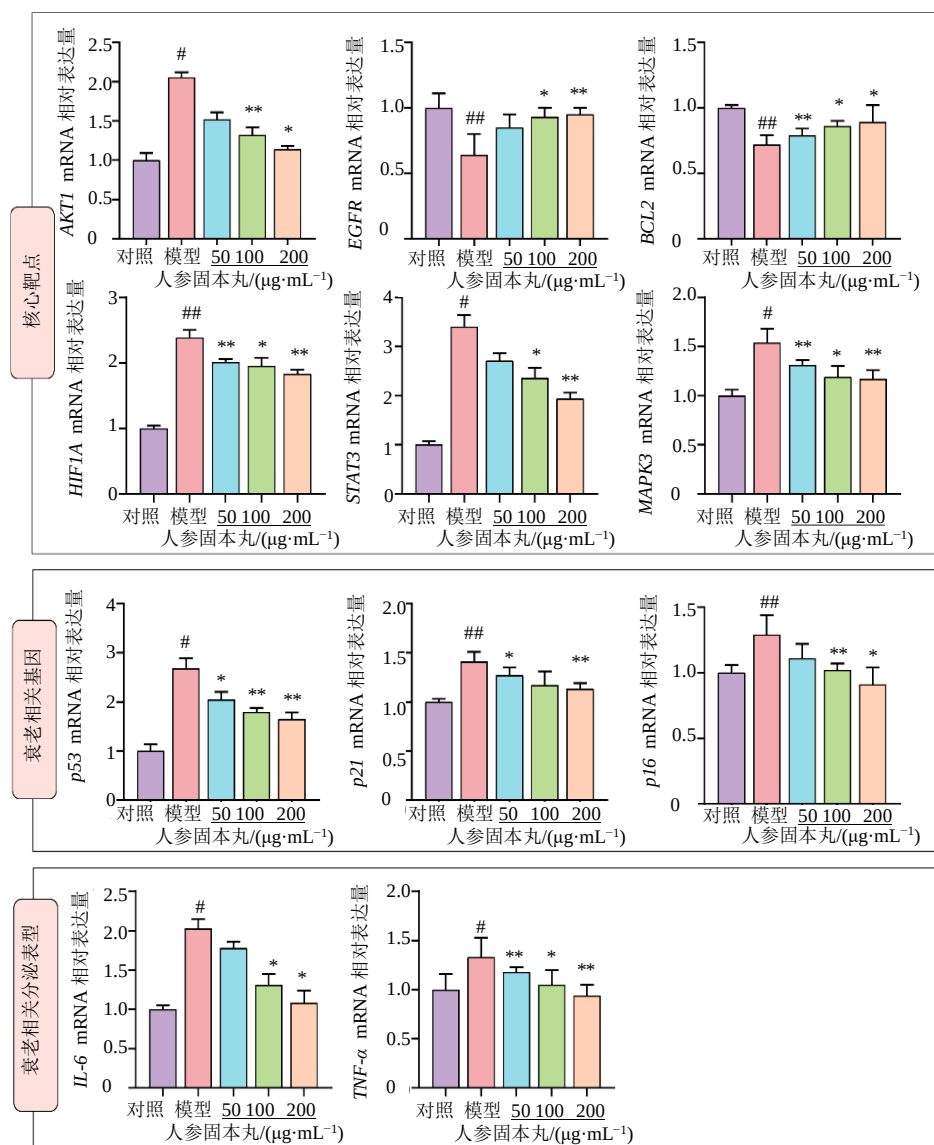


与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 9 人参固本丸对 H_2O_2 诱导 HaCaT 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 9 Effect of Renshen Guben Pills on migration of HaCaT cells induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 10 人参固本丸对 *AKT1*、*BCL2*、*EGFR*、*HIF1A*、*MAPK3*、*STAT3*、*IL-6*、*TNF-α*、*p53*、*p21*、*p16* 基因水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 10 Effects of Renshen Guben Pills on *AKT1*, *BCL2*, *EGFR*, *HIF1A*, *MAPK3*, *STAT3*, *IL-6*, *TNF-α*, *p53*, *p21* and *p16* gene levels ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 *TNF- α* 、*IL-6* mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与对照组相比,模型组衰老相关基因 *p53*、*p21*、*p16* mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组相比,人参固本丸组 *p53*、*p16* mRNA 水平以及人参固本丸 50、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 *p21* mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

皮肤是人体最大的器官,担负着保护、感觉、调节体温和免疫等诸多方面的作用,随着年龄的增长,皮肤也会像人体的其他器官一样逐渐老化,功能减弱、丧失,产生各种病变等^[35]。皮肤受到外界有害因素时,如紫外线、光老化、氧化损伤等,会导致组织内产生 ROS,破坏细胞完整性,紊乱细胞周期循环,使蛋白质发生变性,引起机体氧化损伤,最终导致皮肤衰老,诱导皮肤细胞凋亡。近年来,寻找天然安全有效的传统中药以延缓皮肤衰老,成为研究的热点。

人参固本丸已被证明在抗 *D*-半乳糖致衰老小鼠模型中有一定的拮抗作用。此外,基于文献挖掘整理发现,人参、生地黄、熟地黄、天冬、麦冬具有延缓皮肤衰老作用。然而,人参固本丸中的有效成分及延缓皮肤衰老的作用机制尚不明确。本研究运用 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术对人参固本丸化学成分进行定性分析,得到 95 个化学成分,进而为后续网络药理学研究提供物质基础。

PPI 分析结果表明 AKT1、MAPK3、STAT3、EGFR、CASP3、JUN、SRC、BCL2、IL-6、TNF、ESR1、HIF1A 可能是人参固本丸延缓皮肤衰老的核心靶点。结合 KEGG 通路富集分析结果,发现主要富集到 HIF-1 信号通路,涉及 HIF-1 信号通路上的 AKT1、MAPK3、STAT3、EGFR、BCL2、IL-6、HIF1A 核心靶点。分析发现所得预测靶点均与氧化应激、炎症、抗衰老密切相关。在衰老过程中 HIF-1 信号通路通过 HIF-1 α 造成 ROS 的积累、脂质和蛋白质的氧化以及线粒体 DNA 的突变,诱导细胞代谢、氧化还原状态、钙稳态和信号传递的恶化,加速衰老过程^[36]。AKT1 作为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的 3 种密切相关物质之一,对机体代谢、细胞增殖、细胞凋亡、细胞自噬等多个过程都有调节作用,可通过 PI3K-Akt 信号传导通路参与抗衰老的过程^[37]。MAPK3、STAT3 参与炎症调节,调控 IL-6 和 TNF- α 的分泌,能够抑制炎症反应和氧化应激。研究发现 EGFR 对皮肤发育和体内平衡至关重要,通

过调节角质细胞增殖和分化,最终对伤口愈合过程产生重要影响^[38]。

基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 与网络药理学,本研究初步探究了人参固本丸延缓皮肤衰老的作用机制,为来源于人参的人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Re,生地黄、熟地黄中的毛蕊花糖,天冬中的延龄草苷、伪原薯蓣皂苷,麦冬中的 *N*-对香豆酰酪胺等成分作用于 AKT1、MAPK3、STAT3、EGFR、BCL2、IL-6、HIF1A 核心靶点。分子对接结果验证了 HIF-1 信号通路上的核心靶点与成分之间具有良好的亲和力,分子动力学模拟进一步验证成分与蛋白之间形成稳定的构象。并基于实验验证人参固本丸对上述靶点的水平变化产生一定的影响,为网络药理学的分析结果提供有力支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 廖月,何毅怀,罗亚文.氧化应激在急性肝损伤中的作用[J].临床肝胆病杂志,2022,38(10):2402-2407.
Liao Y, He Y H, Luo Y W. Role of oxidative stress in acute liver injury [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(10): 2402-2407.
- [2] Sun J C, Liu X Z, Shen C A, et al. Adiponectin receptor agonist AdipoRon blocks skin inflamm-ageing by regulating mitochondrial dynamics [J]. Cell Prolif, 2021, 54(12): e13155.
- [3] 刘叶兰.杞圆膏和二黄丸抗 *D*-半乳糖致皮肤衰老模型小鼠的实验研究[D].南京:南京中医药大学,2007.
Liu Y L. Experimental study of qi yuan ointment and erhuang pill on skin aging model mice induced by *D*-galactose [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2007.
- [4] 方哲,陈素红,方慧,等.草还丹、人参固本丸和二至丸对 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠抗衰老作用的研究[J].浙江中西医结合杂志,2019,29(7):543-547.
Fang Z, Chen S H, Fang H, et al. Anti-aging effect of Caohuandan, Ginseng Guben pills and Erzhi pills on *D*-galactose-induced aging mice [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med, 2019, 29(7): 543-547.
- [5] 杨徐.二黄丸抗 *D*-半乳糖致衰老模型小鼠皮肤衰老作用的实验研究[D].南京:南京中医药大学,2007.
Yang X. Experimental study on the anti-aging effect of Erhuang Pill on the skin of *D*-galactose-induced aging model mice [D]. Nanjing: Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 2007.
- [6] 王静,姚长良,张建青,等.基于 UPLC-Q-TOF-MS 的

- 人参配方颗粒化学成分及指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2022, 53(11): 3286-3294.
- Wang J, Yao C L, Zhang J Q, et al. Study on chemical components and chromatographic fingerprints of Ginseng Dispensing Granules based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(11): 3286-3294.
- [7] 李莹曼. 肉苁蓉延缓衰老的功能因子及作用机制研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2023.
- Li Y M. Study on functional factors and mechanism of *Cistanche deserticola* in delaying aging [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2023.
- [8] 范倩, 吴晓纯, 蔡盛康, 等. 经典名方麦门冬汤化学成分的 UPLC-Q-Orbitrap-MS 分析 [J]. 广东药科大学学报, 2023, 39(1): 66-78.
- Fan Q, Wu X C, Cai S K, et al. Analysis of chemical constituents of Maimendong Decoction in classical prescriptions by UPLC-Q-Orbitrap MS [J]. J Guangdong Pharm Univ, 2023, 39(1): 66-78.
- [9] 孙建锋, 董文婷, 陈丽艳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析人参豆豉复合发酵物化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(6): 1417-1429.
- Sun J F, Dong W T, Chen L Y, et al. Analysis of chemical constituents of Ginseng-Douchi compound fermentation products based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. China J Chin Mater Med, 2021, 46(6): 1417-1429.
- [10] 雷星, 王小平, 张艳, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 的建昌帮砂仁陈皮制熟地黄适宜炮制时间分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(4): 134-143.
- Lei X, Wang X P, Zhang Y, et al. Analysis of suitable processing time of *Rehmanniae Radix* praeparata processed with *Amomi Fructus* and *Citri Reticulatae Pericarpium* based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(4): 134-143.
- [11] 张波泳, 江振作, 王跃飞, 等. UPLC/ESI-Q-TOF MS 法分析鲜地黄、生地黄、熟地黄的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1104-1108.
- Zhang B Y, Jiang Z Z, Wang Y F, et al. Analysis of chemical constituents in fresh, dried and prepared *Rehmanniae Radix* by UPLC/ESI-Q-TOF MS [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(5): 1104-1108.
- [12] 吴泳锡, 张美玉, 王一竹, 等. 基于 GC-MS 和 LC-MS 的人参冰酒成分分析 [J]. 质谱学报, 2022, 43(2): 189-200.
- Wu Y X, Zhang M Y, Wang Y Z, et al. Component analysis of ginseng ice wine by GC-MS and LC-MS [J]. J Chin Mass Spectrom Soc, 2022, 43(2): 189-200.
- [13] 高家荣, 朱梦情, 汪小莉, 等. UPLC-Q-TOF-MSE 技术结合 UNIFI 软件分析黄地安消胶囊化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(10): 2395-2405.
- Gao J R, Zhu M Q, Wang X L, et al. Identification of chemical constituents in Huangdi Anxiao Capsules by UPLC-Q-TOF-MSE combined with UNIFI software [J]. China J Chin Mater Med, 2020, 45(10): 2395-2405.
- [14] 黄雅兰, 张艳玲, 向琴, 等. 超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱快速鉴定左归降糖舒心方化学成分 [J]. 分析测试学报, 2022, 41(7): 963-977.
- Huang Y L, Zhang Y L, Xiang Q, et al. Rapid analysis of chemical components in Zuogui Jiangtang Shuxin formula by UHPLC-Q-exactive-orbitrap mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2022, 41(7): 963-977.
- [15] 魏梦佳, 陈凤鸣, 张志杰, 等. 基于高分辨质谱分析的经方名方百合地黄汤中生地黄汁的制备工艺 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 133-140.
- Wei M J, Chen F M, Zhang Z J, et al. Preparation of *Rehmanniae Radix* juice for Baihe dihuangtang based on UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(9): 133-140.
- [16] 李杨, 刘思妍, 周鑫, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive 四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用技术快速识别补骨脂活方化学成分 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 111-121.
- Li Y, Liu S Y, Zhou X, et al. Rapid analysis on chemical constituents from Bushen Huoxue prescription by UPLC coupled with Q-Exactive quadrupole-Orbitrap MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(1): 111-121.
- [17] 朱徐东, 姚伟, 严斐霞, 等. 基于 UPLC-Q/TOF-MS 技术快速分析樟帮九蒸九晒地黄的化学成分及固体辅料缓解地黄“滋腻碍脾”的功能研究 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(10): 1332-1342.
- Zhu X D, Yao W, Yan F X, et al. Rapid analysis of the chemical composition of Zhangbang nine steaming nine sun-dring *Rehmanniae Radix* based on UPLC-Q/TOF-MS technique and study on the function of solid excipients in alleviating the “nourishing and spleen-impairing” in *Rehmanniae Radix* [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2024, 41(10): 1332-1342.
- [18] 李壮壮, 常晓燕, 金唯一, 等. 基于 UPLC-QE-Orbitrap-MS 的和血止痒方化学成分表征 [J]. 中国现代中药, 2021, 23(9): 1542-1553.
- Li Z Z, Chang X Y, Jin W Y, et al. Characterization of chemical constituents in hexue Zhiyang formula based on UPLC-QE-orbitrap-MS [J]. Mod Chin Med, 2021, 23(9): 1542-1553.
- [19] 赵婷秀, 曹迪, 茆文莉, 等. HPLC-QTOF-MS 分析六味地黄丸不同部位的化学成分 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(4): 489-496.

- Zhao T X, Cao D, Mao W L, et al. Analysis of chemical constituents of different polarity fractions from Liuwei Dihuang pills by HPLC-QTOF-MS [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2018, 29(4): 489-496.
- [20] 张榆浩. 基于 LC-MS/MS 分子网络技术的龟龄集体内外化学成分研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2021.
- Zhang Y H. Study on chemical constituents of Guilingji *in vitro* and *in vivo* based on LC-MS/MS molecular network technology [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2021.
- [21] 靳如娜, 郝丽霞, 王涛, 等. 天冬饮片与标准汤剂的质量评价方法探索 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 111-118.
- Jin R N, Hao L X, Wang T, et al. Analysis on quality evaluation methods of *Asparagi Radix* decoction pieces and its standard decoction [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(17): 111-118.
- [22] 郝二伟, 潘祥龙, 秦健峰, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 的复方益智颗粒大鼠体内入血成分研究 [J]. 中药材, 2019, 42(8): 1814-1819.
- Hao E W, Pan X L, Qin J F, et al. Study on blood components of Compound Yizhi Granule in rats based on UPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. J Chin Med Mater, 2019, 42(8): 1814-1819.
- [23] 袁付丽, 刘传鑫, 王强, 等. UPLC-Q-TOF/MSE 结合 UNIFI 信息学平台快速检测与鉴别九味镇心颗粒中的化学成分 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(10): 1997-2008.
- Yuan F L, Liu C X, Wang Q, et al. Rapid detection and identification of compounds in Jiuwei Zhenxin Granules based on UPLC-Q-TOF/MSE and UNIFI software [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(10): 1997-2008.
- [24] 李浩然, 董萍萍, 李华健, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS 快速分析开心散物质基准中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(4): 938-950.
- Li H R, Dong P P, Li H J, et al. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap MS/MS-based rapid identification of chemical components in substance benchmark of Kaixin San [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(4): 938-950.
- [25] 刘福宇, 唐寅博, 单凯欣, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学探讨冬凌草复方增强免疫功能作用及机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2024, 44(1): 47-58.
- Liu F Y, Tang Y B, Shan K X, et al. Study on the immune-enhancing effect and mechanism of *Rabdosia rubescens* compound based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(1): 47-58.
- [26] 高琳. 天冬中甾体皂苷的分离鉴定 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2020.
- Gao L. Isolation and identification of steroidal saponins from *Asparagus* [D]. Tianjin: Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [27] 褚衍涛, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析芩苈清肺浓缩丸中的化学成分 [J]. 中成药, 2016, 38(6): 1303-1310.
- Chu Y T, Wei W F, Huo J H, et al. Analysis of chemical constituents in Qinbai Qingfei concentrated pills by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin Tradit Pat Med, 2016, 38(6): 1303-1310.
- [28] 史静超. 龟龄集的化学分析和对轻度认知功能障碍的改善作用研究 [D]. 太原: 山西大学, 2021.
- Shi J C. Chemical analysis of Guilingji and its improvement effect on mild cognitive impairment [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2021.
- [29] 吴茵, 邱志宏, 白万军, 等. 玄麦甘桔颗粒化学成分的快速分析方法 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 70-76.
- Wu Y, Qiu Z H, Bai W J, et al. Rapid analysis of chemical constituents in Xuanmai Ganjie Granules by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2017, 23(22): 70-76.
- [30] 李思洁, 王雪宁, 胡军华, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术解析玉女颗粒化学成分 [J]. 中草药, 2023, 54(23): 7730-7741.
- Li S J, Wang X N, Hu J H, et al. Analysis of chemical composition of Yunv Granules based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(23): 7730-7741.
- [31] 陈金红, 管艳杰, 李晓凤, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的连桂宁心汤体外与入血成分分析及鉴定 [J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(6): 1-13.
- Chen J H, Guan Y J, Li X F, et al. Analysis and Identification of Chemical Components and Blood Components of Liangui Ningxin Decoction (连桂宁心汤) by UPLC-Q-TOF/MS [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2024, 51(6): 1-13.
- [32] 李泽运, 曹星, 袁永亮, 等. 排毒清脂片的 UPLC-Q-TOF-MS 成分分析及网络药理学探索 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(7): 129-134.
- Li Z Y, Cao X, Yuan Y L, et al. Investigation of paidou Qingzhi Tablets based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(7): 129-134.
- [33] 刘涛, 嵇晶, 王令充, 等. 基于 LC-MS 分析及网络药理学研究探讨多花黄精改善炎性疲劳的效应机制 [J]. 南京中医药大学学报, 2023, 39(9): 879-887.
- Liu T, Ji J, Wang L C, et al. Exploring the mechanism of *Polygonatum cyrtoneura* Hua in improving inflammatory

- fatigue based on LC-MS analysis and network pharmacology research [J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2023, 39(9): 879-887.
- [34] 张薇, 李楚源, 王德勤, 等. 心脉安的 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 定性分析和 UHPLC-QTRAP-MS/MS 含量测定 [J]. 中草药, 2023, 54(6): 1743-1756.
- Zhang W, Li C Y, Wang D Q, et al. Identification of chemical constituents of Xinmai'an by UHPLC-Q-ExactiveOrbitrap-MS and determination of its content by UHPLC-QTRAP-MS/MS [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(6): 1743-1756.
- [35] 来吉祥, 何聪芬, 董银卯. 皮肤衰老机理及延缓衰老化妆品的研究进展 [J]. 中国美容医学, 2009, 18(8): 1208-1212.
- Lai J X, He C F, Dong Y M. Research development on the mechanism of skin aging and anti-aging cosmetics [J]. Chin J Aesthetic Med, 2009, 18(8): 1208-1212.
- [36] Yeo E J, Medicine M. Hypoxia and aging [J]. Exp Mol Med, 2019, 51(6): 1-15.
- [37] 杨雪晶, 杨辉萍, 张天雷. 草苈蓉抗衰老作用的网络药理学研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报(自然科学版), 2024, 40(2): 131-138.
- Yang X J, Yang H P, Zhang T L. Network pharmacological study on anti-aging effect of *Boschniakia rossica* [J]. J Harbin Univ Commer Nat Sci Ed, 2024, 40(2): 131-138.
- [38] Wang Y J, Li H, Xue C, et al. TRPV3 enhances skin keratinocyte proliferation through EGFR-dependent signaling pathways [J]. Cell Biol Toxicol, 2021, 37(2): 313-330.

[责任编辑 兰新新]