

基于 Tie2/Ang/VE-cadherin 信号轴研究阿胶改善 D-半乳糖诱导的皮肤衰老和微血管稳态的作用机制

赵钰佳^{1,3}, 孙娅楠¹, 高欣雨^{1,3}, 刘海滨^{2*}, 王 毅^{1*}

1. 中国中医科学院 医学实验中心, 北京 100700

2. 东阿阿胶股份有限公司 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252200

3. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 探讨阿胶在延缓 D-半乳糖诱导的皮肤衰老及维持微血管稳态方面的药效作用, 并阐明其通过酪氨酸激酶受体 2 (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, Tie2)/血管生成素 (angiopoietin, Ang)/血管内皮钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 信号轴调控血管成熟度的分子机制。 **方法** 采用 sc D-半乳糖构建小鼠早衰模型, 连续 8 周 ig 给予阿胶 (270.3 mg/kg) 干预, 通过激光散斑血流成像 (laser speckle contrast imaging, LSCI) 监测背部血流, 光相干断层扫描血管造影 (optical coherence tomography angiography, OCTA) 观察微血管密度, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 及 Masson 染色评估皮肤组织形态及胶原含量, 免疫荧光及免疫组化检测皮肤组织血管内皮标志物 CD31 和周细胞标志物血小板源生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor β , PDGFR β) 的表达, 采用 ELISA 检测血清 Ang1/Ang2 的值, 采用 qRT-PCR 检测皮肤组织白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、趋化因子配体 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 表达。采用过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 诱导人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) 构建应激性早衰模型, 给予 62.5~250.0 μ g/mL 阿胶预处理 24 h, 通过 CCK-8 检测细胞活力, 通过衰老相关 β -半乳糖苷酶 (senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal) 染色及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平评估衰老程度, qRT-PCR 检测衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) 及炎症相关基因表达, Western blotting 检测肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, p53)、周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A, p21)、p-Tie2、Tie2、VE-cadherin、血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 蛋白表达, ELISA 检测 Ang1/Ang2 的值, 通过周细胞招募及内皮渗透实验评价血管稳定性。 **结果** 动物实验中, 阿胶显著改善衰老小鼠皮肤褶皱, 增加表皮及真皮厚度和胶原容积分数 ($P<0.01$ 、 0.001), 恢复皮肤血流灌注并减少杂乱的无序血管生成, 提高皮肤组织 PDGFR β 的表达及血清 Ang1/Ang2 的值 ($P<0.001$), 下调炎症因子表达 ($P<0.001$), 增强血管成熟度。细胞实验中, 阿胶显著降低 HUVEC 中 SA- β -gal 阳性率及 ROS 水平 ($P<0.001$), 下调 SASP 及炎症相关基因表达 ($P<0.01$ 、 0.001), 上调 p-Tie2 和 VE-cadherin 的蛋白表达 ($P<0.001$), 下调 p53、p21、Tie2 和 VEGFA 的蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.001), 并提高 Ang1/Ang2 的值 ($P<0.05$ 、 0.01), 显著增强内皮细胞对周细胞的招募能力及血管内皮屏障的完整性。 **结论** 阿胶可改善 D-半乳糖诱导的衰老皮肤模型的衰老表型, 提高微血管成熟度并维持血管稳态, 其作用可能与调节 Tie2/Ang/VE-cadherin 信号轴有关。

关键词: 阿胶; 皮肤衰老; 微血管稳态; 血管成熟度; Tie2/Ang/VE-cadherin 信号轴; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)16-6371-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.16.013

Mechanism of *Colla Corii Asini* on improving D-galactose-induced skin aging and microvascular homeostasis based on Tie2/Ang/VE-cadherin signal axis

ZHAO Yujia^{1,3}, SUN Yanan¹, GAO Xinyu^{1,3}, LIU Haibin², WANG Yi¹

收稿日期: 2026-02-02

基金项目: 山东东阿阿胶股份有限公司研究基金资助项目 (HX2023001); 中国中医科学院科技创新工程创新能力提升专项 (NLTS2025004); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (JJPY2025002); 泰山工业专项 (tscy20180234); 中央引导地方科技发展资金 (YDZX2023090)

作者简介: 赵钰佳, 硕士研究生, 研究方向为中药新疗效的开发。E-mail: rangers1120@163.com

***通信作者:** 王 毅, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药抗菌机制研究。E-mail: prof.wangyi@foxmail.com

刘海滨, 国家胶类中药工程技术研究中心主任, 主要从事胶类研发创新。E-mail: liuhb@dongcejiao.com

1. Medical Experimental Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China
2. National Engineering Research Center for Gelatin-Based Traditional Chinese Medicine, Dong-E-E-Jiao Co., Ltd., Liaocheng 252200, China
3. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To explore the pharmacological effect of Ejiao (*Colla Corii Asini*, CCA) on delaying *D*-galactose-induced skin aging and maintaining microvascular homeostasis, and to clarify the molecular mechanism of its regulation of vascular maturity through tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2 (Tie2)/angiopoietin (Ang)/vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) signal axis. **Methods** The model of premature senility in mice was established by sc *D*-galactose, and CCA (270.3 mg/kg) was administered ig for eight weeks. The back blood flow was monitored by laser speckle contrast imaging (LSCI), the microvessel density was observed by optical coherence tomography angiography (OCTA), the skin tissue morphology and collagen content were evaluated by hematoxylin-eosin staining (HE) and Masson staining, the expressions of vascular endothelial marker CD31 and pericyte marker platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β) were detected by immunofluorescence and immunohistochemistry, the Ang1/Ang2 value in serum was detected by ELISA, the expressions of interleukin-1 β (*IL-1 β*), C-X-C motif chemokine ligand 1 (*CXCL1*) and tumor necrosis factor- α (*TNF- α*) mRNA in skin tissue was detected by qRT-PCR. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were induced by hydrogen peroxide (H_2O_2) to construct a stress premature aging model, cells were pretreated with 62.5—250.0 μ g/mL CCA for 24 h. Cell viability was detected by CCK-8. Senescence-associated β -galactosidase (SA- β -gal) staining and reactive oxygen species (ROS) level were used to assess the degree of aging. qRT-PCR was used to detect the senescence-associated secretory phenotype (SASP) and inflammation related gene expressions. Western blotting was used to detect tumor protein p53 (p53), cyclin dependent kinase inhibitor 1 A (p21), p-Tie2, Tie2, VE-cadherin and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) protein expressions. Ang1/Ang2 value was detected by ELISA. Vascular stability was evaluated through pericyte recruitment and endothelial permeability experiments. **Results** In the animal experiment, CCA significantly improved the skin fold of aging mice, increased the thickness of epidermis and dermis and collagen volume fraction ($P < 0.01, 0.001$), restored skin blood flow perfusion and reduced disordered angiogenesis, increased the expression of PDGFR β in skin tissue and the value of Ang1/Ang2 in serum ($P < 0.001$), decreased the expressions of inflammatory factors ($P < 0.001$), and enhanced vascular maturity. In the cell experiment, CCA significantly reduced the positive rate of SA- β -gal and ROS level in HUVEC ($P < 0.001$), down-regulated the expressions of SASP and inflammation related genes ($P < 0.01, 0.001$), up-regulated the protein expressions of p-Tie2 and VE-cadherin ($P < 0.001$), down-regulated the protein expressions of p53, p21, Tie2 and VEGFA ($P < 0.05, 0.001$), and increased the value of Ang1/Ang2 ($P < 0.05, 0.01$), significantly enhancing the ability of endothelial cells to recruit pericytes and the integrity of vascular endothelial barrier. **Conclusion** CCA can improve the aging phenotype of aging skin model induced by *D*-galactose, improve microvascular maturity and maintain vascular homeostasis, which may be related to the regulation of Tie2/Ang/VE-cadherin signal axis.

Key words: *Colla Corii Asini*; skin aging; vascular homeostasis; vascular maturation; Tie2/Ang/VE-cadherin signaling axis; inflammatory response

皮肤衰老是一个由内源性和外源性因素共同驱动的复杂生物学过程，其特征表现为皮肤变薄、弹性下降、皱纹形成及屏障功能减退。近年来研究表明，皮肤衰老不仅是真皮结构重塑的结果，更与皮肤血管系统的退行性变化密切相关^[1-2]。血管系统在维持皮肤稳态中起重要作用，其功能完整性直接影响皮肤的营养供应、代谢废物清除及免疫调节^[3]。研究发现，在血管成熟的过程中，酪氨酸激酶受体 2 (tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2, Tie2) /血管生成素 (angiopoietin, Ang) 信号传导通路发挥着核心作用^[4-5]。当 Ang1 与 Tie2 受体特异性结合时，激活 Tie2 受体的酪氨酸激

酶，使其发生磷酸化，从而增强血管稳定性，使血管壁更加坚固，减少血管渗漏的风险^[6]。此外，Ang1 还通过调节血管内皮-钙黏蛋白 (vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 的表达和功能，改善内皮细胞之间的黏附连接^[7-8]，使内皮细胞紧密相连，进一步降低血管通透性^[9]，维持血管内环境的稳定^[10]。在健康的血管系统中，Tie2/Ang 信号传导通路处于平衡和稳定的状态^[11-12]，确保血管正常发育和成熟。而在衰老过程中，Tie2/Ang 信号传导通路失衡，血管内环境稳态发生变化，使血管稳定性下降，生出众多杂乱的无序血管，引起一系列炎症反应^[13-14]，进而破坏皮肤状态。

阿胶 *Colla Corii Asini* 又称驴皮明胶, 由驴皮经过一系列加工方法制成, 已有几千年的应用历史。现代药理学研究表明, 阿胶含有多种生物活性成分, 如胶原肽、氨基酸、微量元素等^[15], 具有抗氧化、抗衰老^[16]、改善血管弹性、促进血液循环^[5,17-18]等多种生物学功能。课题组前期研究表明阿胶可以有效改善衰老皮肤的血管屏障, 但对于血管稳态与皮肤衰老的影响尚未得到系统的研究。鉴于血管健康在衰老相关疾病中的重要性以及阿胶潜在的抗衰老特性^[1,19], 探索阿胶对衰老血管成熟的影响, 可能为预防和治疗年龄相关血管疾病提供新的见解和理论依据。本研究旨在探讨阿胶是否能延缓小鼠的皮肤衰老, 改善血管状态, 并通过细胞实验验证其改善衰老血管的成熟度, 维持血管稳定的分子机制, 为阿胶干预皮肤衰老相关微血管稳态失衡的药效评价及机制研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雌性 ICR 小鼠 32 只, 6~8 周龄, 体重 20 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 NO.110011241100523031。动物饲养于北京市中国中医科学院医学实验中心 SPF 级屏障环境中, 实验单位使用许可证编号 SYXK(京)2021-0017, 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 自由进食饮水。动物实验经中国中医科学院医学实验中心伦理委员会审核批准(批准号 ERCCACMS21-2412-03)。

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC, 批号 8000)购自亿泽丰生物科技(上海)有限公司; 人急性单核白血病 THP-1 细胞(编号 1101HUM-PUMC000057)购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

1.2 药品与试剂

阿胶(9 g/袋, 批号 2207001)购自阿胶股份有限公司, 经中国中医科学院医学实验中心李贤煜研究员采用 SCIEX ZenoTOF 7600 质谱仪进行 zenoSWATH 分析, 鉴定为马科动物驴 *Equus asinus* Linnaeus 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶, 药材质量符合《中国药典》2025 年版相关规定; 维生素 C(vitamin C, VC, 批号 A103533)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; D-半乳糖(批号 A100366)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1120)、Masson 三色染色试剂盒(批号

G1340)、Hank's 缓冲液(批号 H1025)、4%多聚甲醛(批号 G1101)购自北京索莱宝科技有限公司; 免疫染色通透液(批号 P0095)、免疫染色封闭液(批号 P0260)、衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)染色试剂盒(批号 C0602)、RIPA 裂解液(批号 P0013B)、5 $\times$ SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号 P0015L)、ECL 发光液(批号 P0018AM)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(批号 A0208)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 二抗(批号 A0216)购自上海碧云天生物技术有限公司; 分化簇 31(cluster of differentiation 31, CD31)抗体(批号 ab281583)、免疫组化用血小板源生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor β , PDGFR β)抗体(批号 ab69506)、免疫荧光用 PDGFR β 抗体(批号 ab32570)、含 DAPI 封片液(批号 ab104139)购自英国 Abcam 公司; 抗原修复液(批号 AR0026)购自武汉博士德生物工程有限公司; 免疫组化通用性二步法检测试剂盒(批号 PV-9002)购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 小鼠 Ang1 ELISA 试剂盒(批号 MU30996)、小鼠 Ang2 ELISA 试剂盒(批号 MU31003)、人 Ang1 ELISA 试剂盒(批号 HM10112)、人 Ang2 ELISA 试剂盒(批号 HM11076)购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; 内皮细胞培养基(endothelial cell medium, ECM, 批号 1001)购自美国 ScienCell 公司; 特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 ST30-3302)购自德国 PAN-Biotech 公司; 总 RNA 提取试剂(批号 RK30129)、ABScript Neo RT Master Mix for qPCR with gDNA Remover(批号 RK20433)、2 $\times$ Universal SYBR Green Fast qPCR Mix(批号 RK21203)、CCK-8 试剂盒(批号 RM02823)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 人源甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物(批号 B661104-0001)及其他引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; DCFH-DA(批号 R252)购自日本同仁化学研究所; Matrigel 基质胶(批号 354237)购自美国 Corning 公司; RPMI 1640 培养基(批号 22400-089)、DMEM 培养基(批号 C11885500BT)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; GAPDH 抗体(批号 10494-1-AP)、p53 抗体(批号 60283-2-Ig)、p21 抗体(批号 82669-2-RR)、Tie2 抗体(批号 19157-1-AP)、血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)抗

体(批号 81323-2-RR)购自美国 Proteintech 公司; p-Tie2 抗体(批号 AF2424)购自美国 Affinity 公司; VE-cadherin(批号 2500T)购自美国 CST 公司; 异氟烷(批号 R510-22-16)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; 100×磷酸酶抑制剂混合物(批号 AQ552)购自北京翱擎生物科技有限公司; 通用型抗体稀释液(批号 WB500D)、抗体剥离液(批号 WB6500)购自苏州新赛美生物科技有限公司; 0.25%胰蛋白酶(批号 25200-056)购自美国 Gibco 公司; 罗丹明 6G(批号 R4127)购自西格玛(上海)贸易有限公司。

1.3 仪器

SIM BFI HR Pro 型激光散斑血流成像仪(laser speckle contrast imaging, LSCI, 武汉迅微光电科技有限公司); BX51 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Archimed X6 型荧光定量 PCR 仪(北京鲲鹏基因科技有限责任公司); RVL2-K2-01725 型荧光倒置显微镜(美国 ECHO 公司); ZY 型脱水机、S20061152 型石蜡切片机[赛默飞世尔(上海)仪器有限公司]; BM450A 型包埋机(常州派斯杰医疗设备有限公司); ClearVue 封片机(美国 Epredia 公司); SpectraMAX iD3 型酶标仪[美谷分子仪器(上海)有限公司]; NSP-300 型摇床(泰州诺米医疗科技有限公司); MP ChemiDoc 型化学发光成像系统、1645050 型电转仪(美国 Bio-Rad 公司); Cellcut pius 组织细胞全景成像(日本 Nikon 公司); Allegra X-15R 型离心机(美国 Beckman 公司); JXFSTPRP-CL-BSC 型冷冻研磨机(上海净信实业发展有限公司); OPTOPROBE Micro-VCC 型光相干断层扫描仪(optical coherence tomography angiography, OCTA, 北京心联光电科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 阿胶成分表征 经样品纯化和质谱鉴定^[20-21], 阿胶共鉴定出涉及 98 个蛋白质的 176 个肽片段, 包括 6 大类蛋白质: 分子伴侣/热休克蛋白[如热休克蛋白家族 D 成员 1(heat shock protein family D member 1, HSPD1)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1)]; 能量代谢酶[如烯醇化酶 1(enolase 1, ENO1)、丙酮酸激酶 M1/M2 同工酶(pyruvate kinase M1/2, PKM)、GAPDH]; 细胞骨架蛋白[如肌动蛋白 β (actin beta, ACTB)、肌动蛋白

γ 1(actin gamma 1, ACTG1)、微管蛋白 α/β (tubulin alpha/beta, Tuba/Tubb)、肌球蛋白重链/轻链(myosin heavy/light chain, MYH/MYL)]; 翻译相关蛋白[如真核翻译延伸因子 1 α 1(eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1, EEF1A1)、真核翻译延伸因子 2(eukaryotic translation elongation factor 2, eEF2)]; 核 RNA 结合蛋白[如异质性核内核糖核蛋白 A1/K/U(heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1/K/U, HNRNPA1/HNRNPK/HNRNPU)]; 组蛋白(如 H_2A、H_2B、H_3、H_4)。AFVHWYVGEGMEEGEFSEAR、AGLQFPVGR 和 FDGALNVDLTEFQTNLVPYPR 分别匹配 19 个蛋白质, AAVPSGASTGIYEALRLR 匹配 15 个蛋白质, HFSVEGQLEFR 匹配 12 个蛋白质。这些多肽可能是阿胶发挥药理作用的关键生物活性基序。值得注意的是, 检测到 HSPD1 的 7 个独特的多肽, 表明 HSPD1 在阿胶中含量丰富或结构稳定, 可能在其药理活性中发挥关键作用。

2.1.2 分组、造模与给药 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组、VC 组和阿胶组, 每组 8 只。小鼠适应性喂养 1 周后, 除对照组外, 其余小鼠每日 sc 0.1 mL D-半乳糖溶液(150 mg/mL), 连续注射 8 周。阿胶给药剂量依据临床成人常用剂量, 经体表面积换算方法折算为小鼠剂量。按体表面积换算系数, 根据每人(平均体质量为 60 kg)每天食用阿胶 9 g 计算, 小鼠平均体质量为 20 g, 计算得到小鼠等效剂量为 270.3 mg/(kg·d), 阿胶用 5%葡萄糖配制成质量浓度为 54.06 mg/mL 的溶液, 超声振荡并水浴加热使其充分溶解。VC 作为经典抗氧化剂, 常用于皮肤光老化和衰老模型研究, 将其作为本研究的阳性对照药物, VC 用 5%葡萄糖配制成质量浓度为 120 mg/mL 的溶液。造模前 3 d 开始每日 ig 0.1 mL 相应药物, 对照组和模型组 ig 0.1 mL 生理盐水, 连续给药至造模结束。

2.1.3 LSCI 采用 LSCI 观察小鼠背部血管微血流灌注情况。异氟烷麻醉小鼠后, 为减少非生物体背景信号干扰, 小鼠均置于血流成像仪专用无反射背景板上进行采集。分析时统一在背部皮肤区域勾画感兴趣区域(region of interest, ROI), 仅对生物体皮肤区域内的灌注信号进行定量, 排除背景区域干扰。

2.1.4 OCTA 采用 OCTA 观测小鼠背部血管结构及分布情况, 调整镜头的高度, 待镜头高度适宜后,

分别进行线扫和平扫，扫描深度及范围保持一致。采集 OCTA 图像并进行分析，构建小鼠背部浅表层血管成像，评估衰老皮肤不同深度的血管密度。

2.1.5 HE 染色 取小鼠背部全层皮肤，置于 4%多聚甲醛中 24 h，取出固定好的组织修剪后用流水漂洗、去除水分后脱水，石蜡包埋。切成 4 μm 的组织切片，60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 2 h，二甲苯浸泡 3 次，每次 5 min，分别于无水乙醇、80%乙醇、70%乙醇中梯度脱水，PBS 洗涤后，进行组织复水，使用 HE 染色试剂盒染色，分别于 80%乙醇、无水乙醇中进行梯度脱水，二甲苯透明后，中性树脂封片，于倒置显微镜下观察表皮层和真皮层厚度。

2.1.6 Masson 染色 皮肤组织切片脱蜡复水后，使用 Masson 三色染色试剂盒进行染色，梯度脱水、二甲苯透明后，中性树脂封片，使用倒置显微镜拍摄图像。

2.1.7 免疫荧光染色检测皮肤组织 CD31 和 PDGFR β 表达 取全切皮肤组织切片，60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 2 h，常规脱蜡至水，免疫染色通透液通透 30 min，PBS 洗涤后，滴加免疫染色封闭液封闭 1 h。PBS 洗涤后，滴加 CD31 (1 : 50)、PDGFR β (1 : 50) 抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗涤后，滴加荧光二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h，PBS 洗涤，用含 DAPI 封片液封片，于荧光倒置显微镜下观察并拍照。

2.1.8 免疫组化染色检测皮肤组织 PDGFR β 表达 取全切皮肤组织切片，60 $^{\circ}\text{C}$ 烤片 2 h，常规脱蜡至水，用免疫组化笔将组织圈起来，进行后续实验。滴加抗原修复液，室温孵育 10 min。PBS 洗涤 3 次，每次 3 min，加入内源性过氧化物酶，室温孵育 10 min。PBS 洗涤后，用擦手纸擦干多余水渍，滴加 PDGFR β 一抗 (1 : 100)，4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。PBS 洗涤后，用擦手纸擦干多余水渍，滴加 100 μL 二抗，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，PBS 洗涤后，于倒置显微镜下观察并拍摄图像。

2.1.9 ELISA 检测血清中 Ang1 和 Ang2 水平 取小鼠全血，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 1 h 后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜，次日 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min，取上层血清，按照 ELISA 试剂盒说明书检测 Ang1 和 Ang2 水平。

2.1.10 qRT-PCR 检测皮肤组织白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、趋化因子配体 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, *CXCL1*) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*) mRNA 表达 使用 TRIzol 从小鼠皮肤组织中提取总 RNA，用逆

转录试剂盒合成 cDNA。使用 SYBR Green 在实时 PCR 仪上进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1，将 *GAPDH* 作为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	种属	引物序列 (5'-3')
<i>IL-1β</i>	小鼠	F: CAAGAGCTTCAGGCAGGCAGTATC R: AAAAGAAGGTGCTCATGTCTCATCC
<i>CXCL1</i>	小鼠	F: TCCGTCCCTGTGACACTCAAGAG R: TTTGGGACTGCTATCACTTCCTTCTG
<i>TNF-α</i>	小鼠	F: GCCTCTTCTATTCTGCTGTGTGG R: GTGGTTTGTGAGTGTGAGGGTCTG
<i>GAPDH</i>	小鼠	F: GGCAAATTCAACGGCACAGTCAAG R: TCGCTCCTGGAAGATGGTGATGG
<i>p21</i>	人	F: ACCGAGACACCACTGGAGGG R: CCTGCCTCCTCCCAACTCATC
<i>p16</i>	人	F: ATGATGATGGGCAGCGCC R: CGAGGTTTCTCAGAGCCT
<i>p53</i>	人	F: GGCTCTGACTGTACCACCATCC R: GGCACAAACACGCACCTCAAAG
<i>PAI-1</i>	人	F: ACGGCTGGTGCTGGTGAATG R: CGTGGAGAGGCTCTTGGTCTGA
<i>IL-6</i>	人	F: GGTGTTGCCTGCTGCCTTCC R: GTTCTGAAGAGGTGAGTGGCTGTC
<i>TNF-α</i>	人	F: TGGCGTGGAGCTGAGAGATAACC R: CGATGCGGCTGATGGTGTGG
<i>CCL2</i>	人	F: CCAGCAGCAAGTGTCCTCAAG R: TGCTTGTCAGGTGGTCCATG
<i>CXCL1</i>	人	F: CCGAAGTCATAGCCACACTCAAG R: GTTGGATTGTCACTGTTCAGCATC
<i>GAPDH</i>	人	F: GTGGACCTGACCTGCCGTCTAG R: GAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养与造模 将 HUVEC 培养于含 5% FBS、1%三抗的 ECM 完全培养基的培养瓶中，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育。镜下观察细胞为铺路石样形态，每天换液，待细胞长至 80%左右，进行 1 : 3 传代，先吸除原有培养基，PBS 冲洗 2 次，加入 0.25%胰蛋白酶 2 mL 消化 2 min，镜下观察细胞变圆、皱缩，立即加入 FBS 400 μL 终止消化，反复吹打至细胞脱落，将悬液移入离心管，1 000 r/min 离心 5 min，弃去上清液，加入新鲜完全培养基重悬后移入新的培养瓶培养。按以上方法将细胞传至第 5 代开展实验。参考既往研究，亚致死剂量 H_2O_2 可在 HUVEC 中诱导应激诱导的早发性衰老 (stress-induced premature senescence, SIPS) 样表型，其主要特征包括 SA- β -gal 阳性增加、ROS 积累及 p16、p21、p53 等衰老相关分子表达上调，以及细胞功能

受损。本研究在既往模型基础上,采用 125 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 HUVEC 4 h 并恢复正常培养 72 h,以诱导 HUVEC 出现氧化应激相关的早衰表型^[22],并结合 SA- β -gal、ROS、衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)相关基因及血管稳态相关功能指标进行综合评估。

2.2.2 细胞活力实验 将 HUVEC 以 4×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,分别用 2 000.00、1 000.00、500.00、250.00、125.00、62.50、31.25 $\mu\text{g/mL}$ 阿胶溶液(经 0.22 μm 微孔滤膜除菌滤过)处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中孵育 1 h,使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞存活率。

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

2.2.3 SA- β -gal 染色 设置对照组、模型组和阿胶(250 $\mu\text{g/mL}$)组,阿胶组加入阿胶溶液预处理细胞 24 h 后,模型组和阿胶组加入 125 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 4 h 后更换为新鲜培养基继续培养 72 h 诱导 HUVEC 衰老,对照组加入不含药物的培养基。按照 SA- β -Gal 染色试剂盒说明书步骤操作,染色 8 h 后于显微镜下观察并拍照,检查 5 个随机选择的视野,以评估 SA- β -gal 染色阳性细胞的比例。

2.2.4 qRT-PCR 分析 设置对照组、模型组和阿胶(62.5、125.0、250.0 $\mu\text{g/mL}$)组,阿胶组加入阿胶溶液预处理细胞 24 h 后,模型组和阿胶组加入 125 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用 4 h 后更换为新鲜培养基继续培养 72 h 诱导 HUVEC 衰老,对照组加入不含药物的培养基。收集细胞,按“2.1.10”项下方法检测 SASP 相关指标[周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A(cyclin dependent kinase inhibitor 1A, $p21$)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A(cyclin dependent kinase inhibitor 2A, $p16$)、肿瘤蛋白 p53(tumor protein p53, $p53$)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(plasminogen activator inhibitor-1, $PAI-1$)]及炎症因子 $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ 、C-C 基序趋化因子配体 2(C-C motif chemokine ligand 2, $CCL2$)、 $CXCL1$ 的基因相对表达量。

2.2.5 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平 按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,加入 DCFH-DA 工作溶液,于 37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 20 min。用 Hank's 缓冲液洗涤细胞 3 次,使用荧光倒置显微镜观察并拍照。每组选择至少 3 个视野,并使用 Image J 软件进行定量分析。

2.2.6 周细胞招募实验 当 HUVEC 趋于稳定时,会招募更多的周细胞聚集在周围,维持血管的稳定。周细胞自身并没有迁移性,故将 HUVEC 铺至 Transwell 小室的下室。按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,将周细胞按照与 HUVEC 1:5 的数量比铺至小室内,共同孵育 24 h。24 h 后取出小室,4%多聚甲醛固定 15 min 后用 0.1%结晶紫染色 15 min,于倒置显微镜下观察并拍照。

2.2.7 内皮屏障通透性实验 在 4 $^\circ\text{C}$ 条件下(冰上操作)将 50 μL Matrigel 基质胶均匀添加到 Transwell 小室底部膜的上室面,37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 3 h,使基质胶聚合成凝胶薄膜。吸去上室中多余液体,每孔加入 100 μL 无血清 ECM 培养基后,于培养箱放置 30 min,进行基底膜水化。取 500 μL 完全培养基加入 24 孔板下室,用镊子将 Transwell 小室置于 24 孔板内。HUVEC 细胞消化后,用无血清的培养基重悬,以每孔 6×10^4 个细胞接种于 Transwell 小室中,形成单层细胞,置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 24 h。按“2.2.4”项下方法进行分组和给药, PBS 洗涤 HUVEC 单层细胞。THP-1 细胞用 5 $\mu\text{mol/L}$ 罗丹明 6G 避光染色 30 min 后,用无血清 RPMI 1640 培养基重悬,以 1×10^5 个/孔加入到 Transwell 小室中,下室加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 细胞培养基,于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养 4 h,于倒置显微镜下观察并拍照。

2.2.8 ELISA 检测 Ang1 和 Ang2 水平 按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,取细胞上清液,3 000 $\times g$ 离心 20 min,取上清,按照 ELISA 试剂盒说明书检测 Ang1 和 Ang2 水平。

2.2.9 Western blotting 检测 p53、p21、p-Tie2、Tie2、VE-cadherin 和 VEGFA 蛋白表达 按“2.2.4”项下方法进行分组和给药,收集细胞,加入裂解液提取蛋白。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5%脱脂牛奶于室温封闭,分别加入 p53(1:1 000)、p21(1:1 000)、p-Tie2(1:1 000)、Tie2(1:1 000)、VE-cadherin(1:1 000)、VEGFA(1:1 000)一抗,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗涤后,加入二抗,室温孵育 1 h,加入化学发光试剂显影,使用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计学分析。Shapiro-Wilk 检验用于评估正态性,非正态数据采用 Mann-Whitney 检验。采用 F 检验或 Bartlett's 检

验进行方差齐性检验。多组比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 并根据实验设计采用 Tukey 或 Dunnett 事后检验; 涉及 2 个自变量的实验采用双因素方差分析 (two-way ANOVA) 并进行 Bonferroni 事后校正。非正态分布数据采用 Kruskal-Wallis 检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

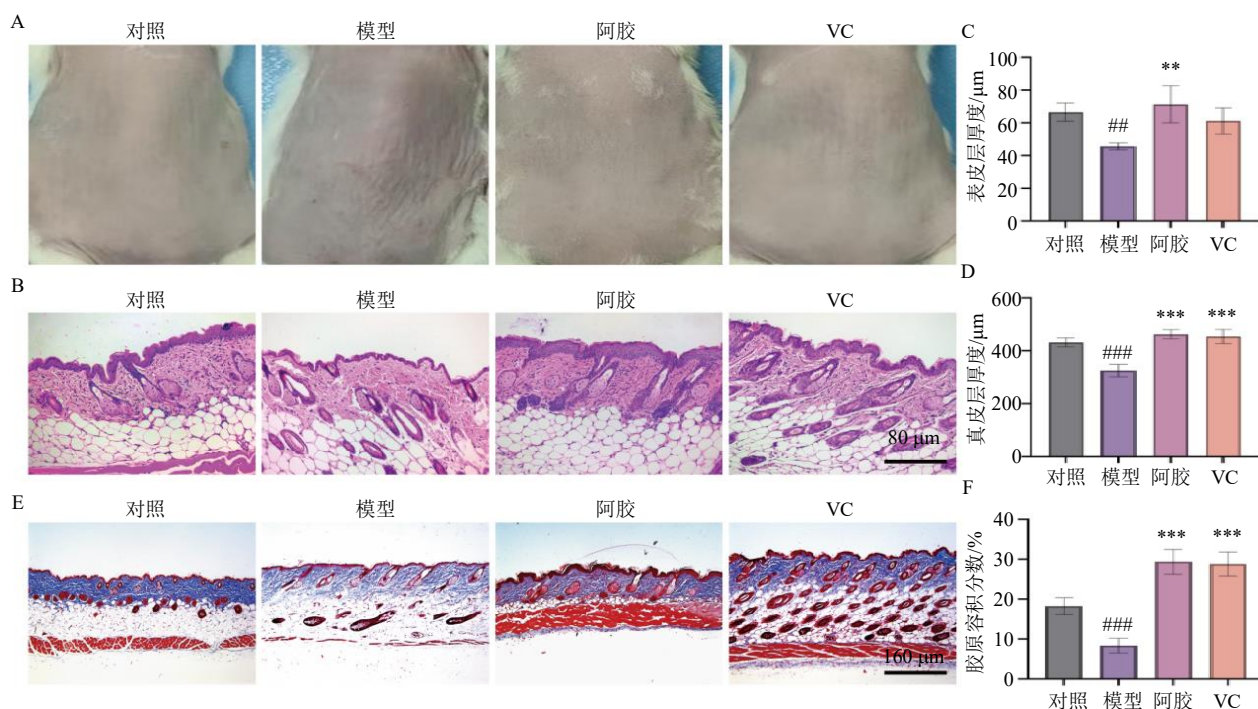
3.1 阿胶改善衰老小鼠皮肤的老化表现

如图 1-A 所示, 连续 sc D-半乳糖 8 周诱导小鼠早衰后, 模型组小鼠背部皮肤出现明显褶皱, 行动迟缓, 表明 D-半乳糖成功诱导了小鼠的衰老; 与模型组比较, 阿胶组和 VC 组小鼠衰老状态有所减轻。皮肤组织切片 HE 染色结果 (图 1-B~D) 显示, 与对照组比较, 模型组小鼠的表皮层及真皮层厚度均明显变薄 ($P < 0.01$ 、 0.001); 而给药组则能将衰老小鼠的皮肤状态恢复至正常水平, 与模型组比较, 阿胶组小鼠的表皮层及真皮层厚度均明显增加 ($P < 0.01$ 、 0.001), VC 组小鼠的真皮层厚度明

显增加 ($P < 0.001$), 表明阿胶和 VC 能够促进皮肤组织的修复和再生, 增加表皮层和真皮层的厚度, 改善皮肤的结构和功能, 延缓皮肤衰老。皮肤组织切片 Masson 染色结果 (图 1-E、F) 显示, 与对照组比较, 衰老小鼠背部皮肤胶原分布疏松, 胶原含量与胶原密度显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 阿胶组和 VC 组小鼠背部皮肤的胶原结构显著改善, 胶原含量显著增加 ($P < 0.001$)。以上结果表明长期口服阿胶可有效延缓皮肤衰老并改善皮肤的胶原含量。

3.2 阿胶改善衰老小鼠皮肤血流灌注并提高血管稳定相关指标

连续造模 8 周后, 通过 LSCI 观察背部血流灌注情况 (图 2-A、C), 结果显示, 模型组小鼠背部血流较对照组明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 阿胶组和 VC 组小鼠背部血流灌注均有所改善 ($P < 0.001$)。小鼠背部全切皮肤的免疫荧光染色结果 (图 2-B) 显示, 红色荧光表征的血管内皮标志物 CD31

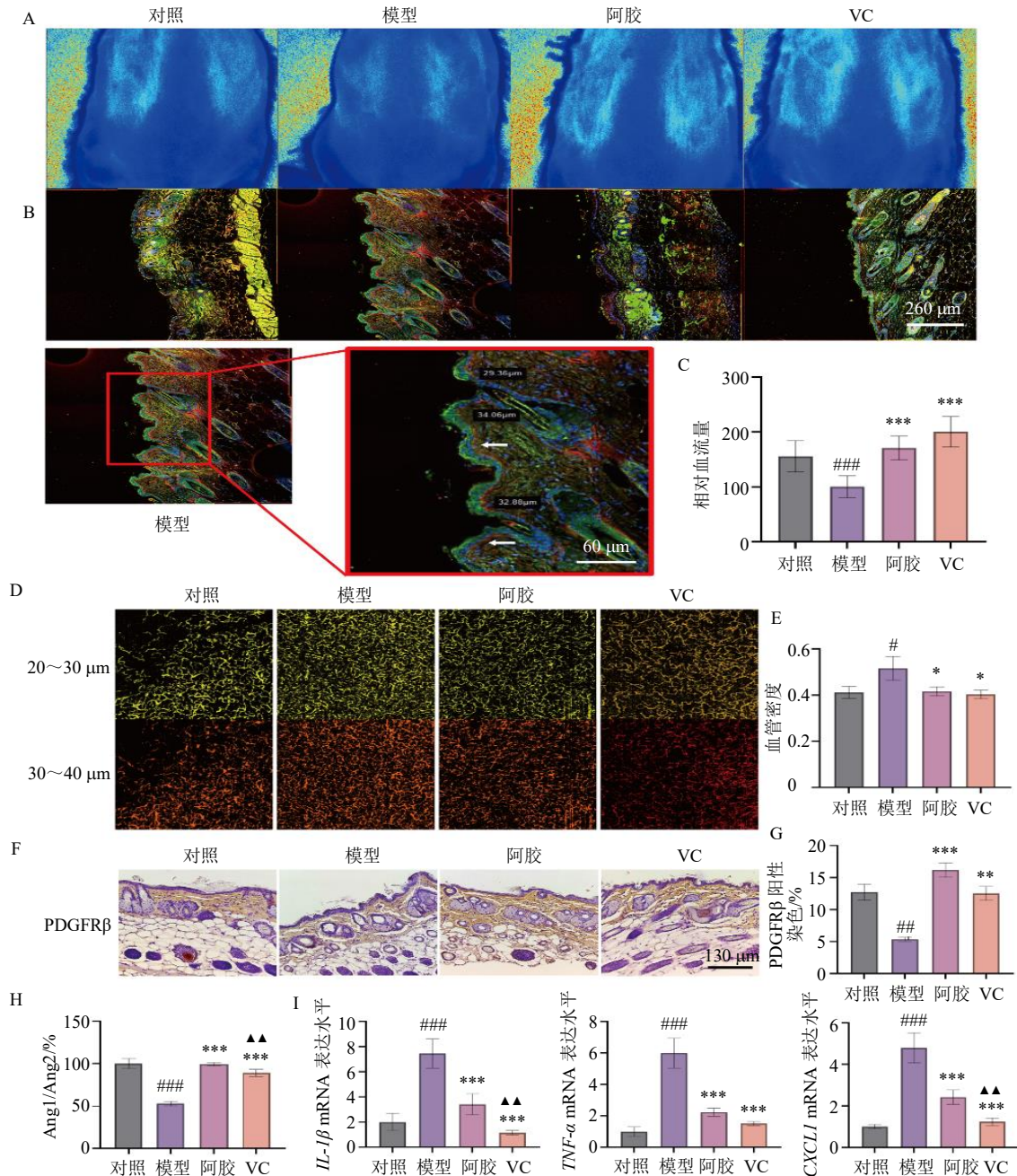


A-各组小鼠背部皮肤外观形态; B-各组小鼠背部全切皮肤组织切片 HE 染色结果 ($\times 20$); C、D-各组小鼠皮肤表皮层和真皮层厚度统计图 ($n=4$); E-各组小鼠背部全切皮肤组织切片 Masson 染色结果 ($\times 10$); F-各组小鼠皮肤胶原容积分数统计图 ($n=4$); 与对照组比较: ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

A-appearance and morphology of back skin of mice in each group; B-HE staining results of fully cut skin tissue sections on back of mice in each group ($\times 20$); C, D-statistical chart of skin epidermal and dermal layer thickness of mice in each group ($n=4$); E-Masson staining results of fully cut skin tissue sections on back of mice in each group ($\times 10$); F-statistical chart of collagen volume fraction in skin of mice in each group ($n=4$); ### $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 1 阿胶改善衰老小鼠皮肤的老化表现

Fig. 1 Colla Corii Asini improves aging manifestations of skin of aged mice



A、C-在相同参数下获取的背部皮肤血流灌注的 LSCI 图像以及基于背部皮肤 ROI 区域进行的定量分析 ($n=4$); B-小鼠背部全切皮肤组织切片 CD31 (红色)、PDGFRβ (绿色) 染色结果 ($\times 4$) 及局部放大观察 CD31 在皮肤表达的具体位置 ($\times 18$), 白色箭头表示血管聚集处; D、E-OCTA 观察各组小鼠背部 20~30、30~40 μm 深度层微血管的密度及统计 ($n=3$); F、G-小鼠背部全切皮肤组织切片 PDGFRβ 免疫组化染色结果 ($\times 10$); H-ELISA 检测小鼠血清中 Ang1/Ang2 的值 ($n=5$); I-各组小鼠背部皮肤组织相关炎症因子的 mRNA 表达 ($n=4$); 与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$; 与模型组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$; 与阿胶组比较: $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$ 。

A, C-representative LSCI images of dorsal skin perfusion acquired under identical parameters and corresponding quantitative analysis based on the dorsal skin ROI ($n=4$); B-immunofluorescence staining of CD31 (red) and PDGFRβ (green) in full-thickness dorsal skin sections ($\times 4$); Magnified views ($\times 18$) show CD31 localization, white arrows indicate vascular clusters; D, E-OCTA-based assessment and quantification of microvascular density at depths of 20~30 μm and 30~40 μm in the dorsal skin ($n=3$); F, G-immunohistochemical staining of PDGFRβ in full-thickness dorsal skin sections ($\times 10$); H-levels of Ang1 and Ang2 in serum determined by ELISA ($n=5$); I-mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines in the dorsal skin tissues of mice in each group ($n=4$); $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ $^{\#\#\#}P<0.001$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs model group; $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$ vs *Colla Corii Asini* group.

图 2 阿胶增加衰老小鼠体内的血管稳定性

Fig. 2 *Colloidal Asini* enhances vascular stability in aged mice

主要集中表达在表皮以下 20~40 μm 处,表明衰老会导致血管生成异常,血管稳定性降低,大量杂乱血管生成。同时, OCTA 结果也显示模型组血管密度明显增加 ($P<0.05$, 图 2-D、E),结合血流结果可知,这些增加的血管不具备相应的功能,反而可能影响了血管的正常功能。给予阿胶和 VC 干预后,小鼠血管密度明显降低 ($P<0.05$, 图 2-D、E)。周细胞在血管稳定性中起着关键作用,它们能够与血管内皮细胞相互作用,调节血管的收缩和舒张,维持血管壁的完整性^[23]。PDGFR β 是周细胞的重要标志物之一^[24],其表达量的增加意味着周细胞的数量或活性增加,能够更好地发挥维持血管稳定的作用^[25-26]。免疫组化结果(图 2-F、G)显示,与对照组比较,模型组小鼠皮肤组织周细胞标志物 PDGFR β 的表达量明显减少 ($P<0.01$);与模型组比较,阿胶组和 VC 组可提高 PDGFR β 的表达量 ($P<0.01$ 、 0.001),表明阿胶能够通过调节周细胞标志物的表达,促进周细胞的功能,进而增强血管的稳定性,对延缓血管衰老具有积极作用。采用 ELISA 检测各组小鼠血清中 Ang1 和 Ang2 的含量,并计算 Ang1/Ang2 的值,用来表征小鼠体内血管的稳定性,结果如图 2-H 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 Ang1/Ang2 值明显降低 ($P<0.001$),表明衰老小鼠的血管成熟度下降,血管的稳定性降低;与模型组比较,阿胶组和 VC 组小鼠血清中 Ang1/Ang2 值明显升高 ($P<0.001$),且阿胶组作用更为显著 ($P<0.01$)。

皮肤衰老可通过多重途径诱发慢性炎症:内源性衰老导致的细胞功能衰退会释放 SASP,持续释放促炎细胞因子^[27];外源性衰老(如光老化)则通过破坏皮肤屏障、激活免疫受体,启动炎症级联反应。这些过程共同促成了皮肤慢性炎症的发生。而慢性炎症又会通过多种机制加速皮肤衰老进程:促炎因子持续激活炎症通路,加速胶原蛋白等细胞外基质降解^[28];同时抑制成纤维细胞功能^[29],阻碍基质合成,导致皮肤结构破坏、弹性下降。这种“皮肤衰老-慢性炎症”的恶性循环^[30],是皮肤衰老表型不断加重的核心机制。如图 2-I 所示,与对照组比较,模型组小鼠皮肤组织 *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*CXCL1* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$),符合衰老引起的慢性炎症;与模型组比较,阿胶组和 VC 组小鼠皮肤组织 *IL-1 β* 、*TNF- α* 、*CXCL1* 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.001$),表明阿胶兼具抗炎与血

管稳定双重效应,可能通过降低炎性介质减轻内皮损伤。

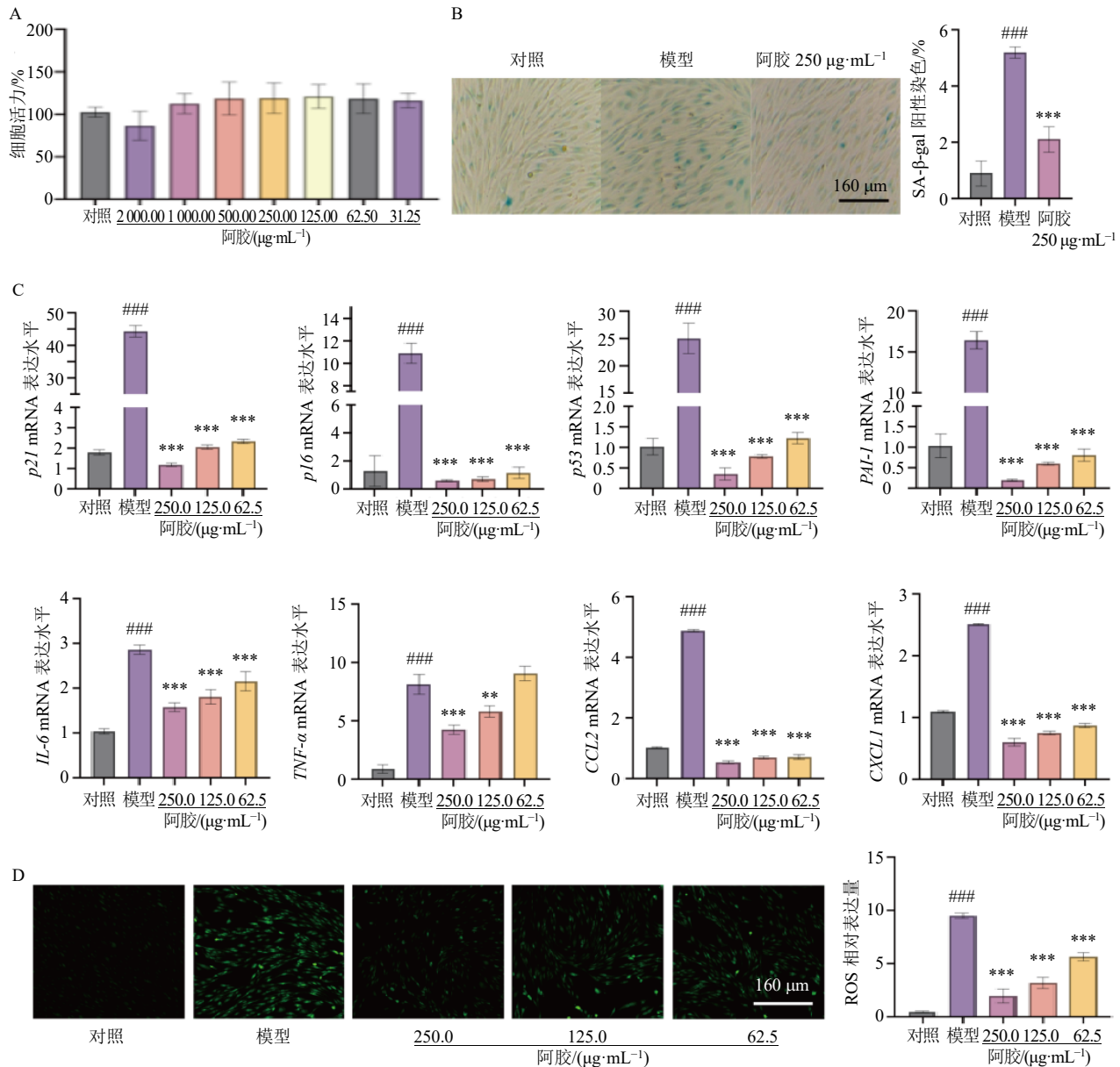
综上,阿胶可有效预防 D-半乳糖诱导的小鼠衰老,通过改善小鼠的外观、背部血流、背部血管成像、皮肤组织以及周细胞标志物表达等多个方面,延缓小鼠的衰老进程,提高血管的稳定性。

3.3 阿胶抑制 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 衰老

如图 3-A 所示, 31.25~1 000.00 $\mu\text{g/mL}$ 阿胶处理 HUVEC 24 h,对细胞活力无明显影响,后续实验选择 250.0、125.0、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 阿胶对 HUVEC 预处理 24 h。以阿胶预处理细胞 24 h,用 125 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 作用 4 h 后更换为新鲜培养基继续培养 72 h 诱导 HUVEC 衰老,结果显示,与对照组比较,模型组 SA- β -gal 阳性率升高 ($P<0.001$, 图 3-B),ROS 积累增加 ($P<0.001$, 图 3-C),SASP 相关基因 *p21*、*p16*、*p53*、*PAI-1* 的表达水平显著升高 ($P<0.001$, 图 3-D),炎症因子 *IL-6*、*TNF- α* 、*CCL2*、*CXCL1* 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$),提示细胞出现明显的氧化应激相关早衰表型,且衰老过程会刺激细胞释放大量的炎症因子,对细胞造成进一步的损伤;与模型组比较,250 $\mu\text{g/mL}$ 阿胶显著降低 SA- β -gal 阳性率 ($P<0.001$),62.5~250.0 $\mu\text{g/mL}$ 阿胶显著降低 SASP 相关基因 *p21*、*p16*、*p53*、*PAI-1* 及炎症因子 *IL-6*、*CCL2*、*CXCL1* 的 mRNA 表达水平和 ROS 积累 ($P<0.001$),125.0、250.0 $\mu\text{g/mL}$ 阿胶显著降低 *TNF- α* 的 mRNA 表达水平 ($P<0.001$),表明阿胶可抑制炎症因子的表达,对 H₂O₂ 诱导的内皮细胞应激性早衰样改变具有保护作用。

3.4 阿胶通过调节 Tie2/Ang/VE-cadherin 通路维持衰老内皮细胞的稳定性

为进一步评价阿胶对衰老内皮细胞功能的影响,采用周细胞招募实验和内皮细胞黏附实验进行验证。HUVEC 经 H₂O₂ 诱导衰老后与 Transwell 小室内的周细胞共培养。周细胞迁移能力有限,但可在内皮细胞分泌信号的作用下发生定向募集,以此来提高血管稳定性。如图 4-A、C 所示,阿胶预处理后的 HUVEC 可增加周细胞的迁移数量 ($P<0.05$ 、 0.001),提高自身招募周细胞的能力,进而稳定血管环境。通过内皮屏障通透性实验可评估内皮细胞屏障的完整性,如图 4-B、D 所示,阿胶预处理后 THP-1 细胞的渗透性显著降低 ($P<0.001$),表明阿胶可改善衰老内皮细胞的屏障功能并降低通透性。当血管成熟度较高时,血管内皮细胞表面



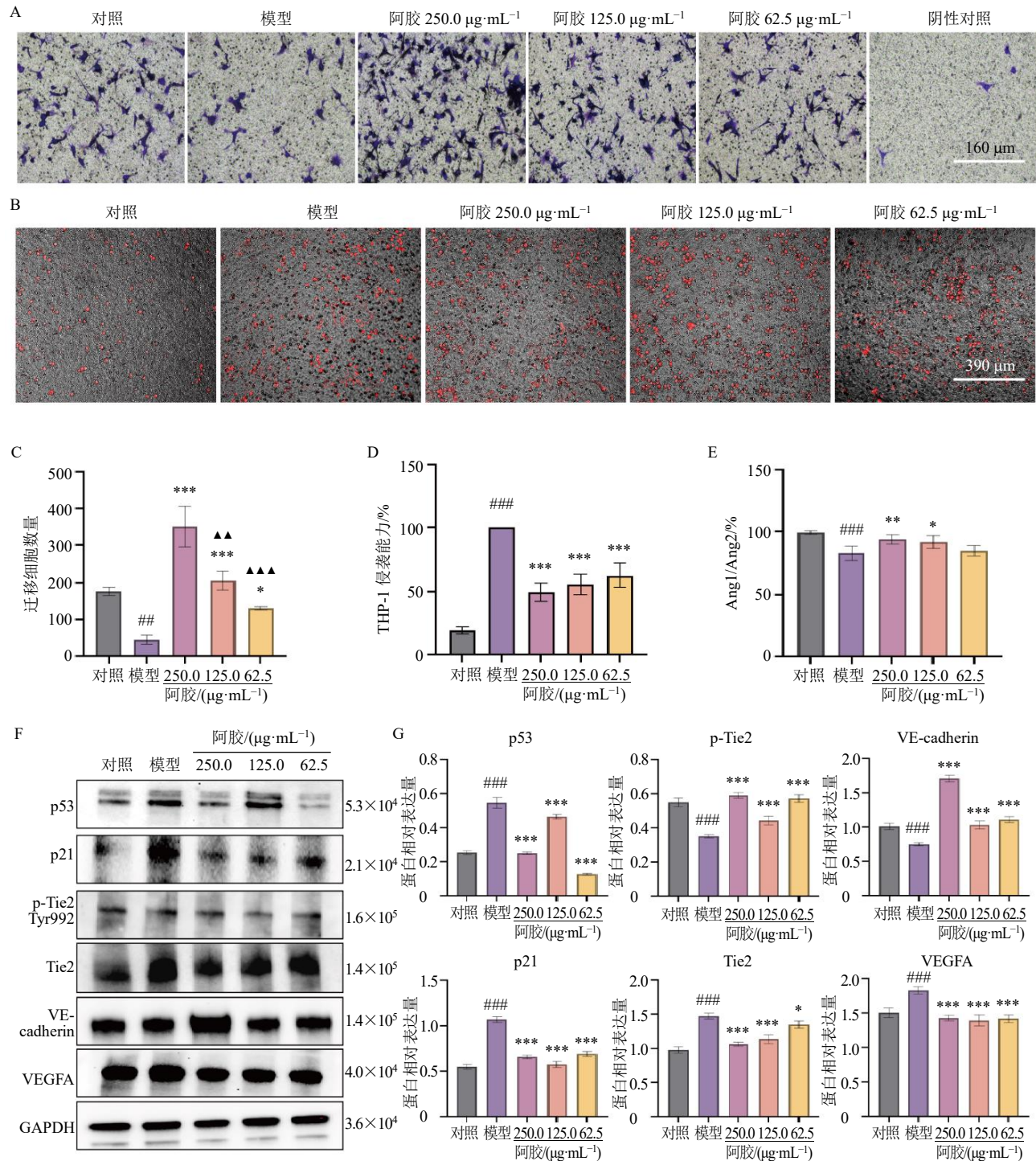
A-阿胶对 HUVEC 细胞活力的影响 ($n=5$); B- H_2O_2 刺激诱导 HUVEC 衰老后, 进行 SA- β -gal 染色 ($\times 10$, $n=4$); C-各组 SASP 相关基因及炎症因子的 mRNA 表达 ($n=3$); D-各组 ROS 表达量 ($\times 10$, $n=3$); 与对照组比较: $###P<0.001$; 与模型组比较: $**P<0.01$ $***P<0.001$ 。A-effect of *Colla Corii Asini* on viability of HUVECs ($n=5$); B-SA- β -gal staining of HUVECs following H_2O_2 -induced senescence ($\times 10$, $n=4$); C-mRNA expressions of SASP related genes and pro-inflammatory cytokines ($n=3$); D-ROS level in each group ($\times 10$, $n=3$); $###P<0.001$ vs control group; $**P<0.01$ $***P<0.001$ vs model group.

图3 阿胶抑制 H_2O_2 诱导的 HUVEC 衰老

Fig. 3 *Colla Corii Asini* inhibits H_2O_2 -induced aging of HUVECs

的 Tie2 受体与 Ang1 结合, 促进 Tie2 的磷酸化, 共同维持血管内环境的稳定^[31-32]。为了探讨阿胶与血管成熟相关通路的关系, 通过 Western blotting 检测 p53、p21、p-Tie2、Tie2、VE-cadherin、VEGFA 蛋白表达。如图 4-F、G 所示, 与对照组比较, 模型组 p53、p21、Tie2、VEGFA 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), p-Tie2、VE-cadherin 蛋白表达水平显

著降低 ($P<0.001$), 表明内皮细胞衰老后, 限制了 Tie2 的磷酸化, 血管的黏附性降低, 不利于维持血管内皮细胞与周细胞之间的黏附链接, 从而破坏血管内环境的稳定; 与模型组比较, 阿胶预处理后 p53、p21、Tie2、VEGFA 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.001), p-Tie2、VE-cadherin 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.001$), 表明阿胶可有效增强衰老血管内皮



A、C-阿胶预处理后衰老 HUVEC 细胞对周细胞的招募实验 ($\times 10$, $n=4$); B、D-阿胶预处理后衰老 HUVEC 细胞屏障通透性实验 ($\times 4$, $n=4$); E-ELISA 检测细胞上清中 Ang1/Ang2 的值 ($n=5$); F、G-Western blotting 检测 Tie2/Ang/VE-cadherin 通路相关蛋白表达 ($n=4$); 与对照组比较: $^{###}P<0.01$ $^{####}P<0.001$; 与模型组比较: $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$; 与 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 阿胶组比较: $^{\Delta\Delta}P<0.01$ $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$ 。

A, C-pericyte recruitment assay toward senescent HUVECs pretreated with *Colla Corii Asini* ($\times 10$, $n=4$); B, D-experiment on barrier permeability of senescent HUVECs following pre-treatment with *Colla Corii Asini* ($\times 4$, $n=4$); E-Ang1/Ang2 value in cell culture supernatants measured by ELISA ($n=5$); F, G-Tie2/Ang/VE-cadherin pathway related protein expressions detected by Western blotting ($n=4$); $^{###}P<0.01$ $^{####}P<0.001$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$ vs model group; $^{\Delta\Delta}P<0.01$ $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$ vs 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ *Colla Corii Asini* group.

图 4 阿胶通过调节 Tie2/Ang/VE-cadherin 通路维持衰老内皮细胞的稳定性

Fig. 4 *Colla Corii Asini* maintains stability of aging endothelial cells by regulating Tie2/Ang/VE-cadherin pathway

细胞与周细胞之间的黏附。采用 ELISA 检测 Ang1、Ang2 的水平,并计算 Ang1/Ang2 的值,以此来评估血管稳定性。如图 4-E 所示,与对照组比较,模型组 Ang1/Ang2 值显著降低 ($P<0.001$);与模型组比较,125.0、250.0 $\mu\text{g/mL}$ 阿胶显著升高 Ang1/Ang2 值 ($P<0.05$ 、 0.01),表明阿胶可有效增加血管的成熟度。

以上结果表明,阿胶预处理可在细胞水平上预防 H_2O_2 诱导的应激性早衰,阿胶可能通过调节血管稳态相关 Tie2/Ang/VE-cadherin 信号通路,改善皮肤微血管功能,提高血管成熟度,改善血管内环境,从而维持血管稳态。

4 讨论

随着年龄增长,皮肤血管结构紊乱且通透性增加^[1],导致真皮层氧供不足和代谢产物堆积,加速皮肤细胞衰老。这种血管退行性变化被称为血管衰老,其核心机制包括内皮细胞功能障碍、氧化应激损伤及细胞外基质重塑失衡^[3,33]。血管稳定性的维持依赖于内皮细胞完整性、血管生成与退化的动态平衡及细胞外基质的支持作用。Tie2 是主要表达于内皮细胞表面的受体酪氨酸激酶,其与 Ang1 或 Ang2 结合后可介导不同的下游信号转导过程^[12]。在健康的血管系统中,Tie2/Ang 信号传导通路处于平衡和稳定的状态^[34],确保血管正常发育和成熟^[35]。血管衰老与皮肤衰老之间存在双向调控关系^[13]。一方面,血管功能衰退直接导致皮肤营养匮乏

乏和代谢紊乱,加速真皮结构退化^[2];另一方面,衰老过程中释放的炎症因子(如 IL-6、TNF- α)可进一步损伤血管内皮细胞,形成恶性循环。例如,衰老皮肤中积累的 SASP 因子可激活血管内皮细胞的核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 信号通路^[36-37],诱导炎症反应和血管通透性增加。临床研究也证实,皮肤血管密度减少与皱纹深度、皮肤松弛程度呈显著正相关^[38],而改善血管功能可通过促进胶原蛋白合成^[39-40]和减少氧化应激延缓皮肤衰老。

本研究通过细胞和动物实验,深入探讨了阿胶对血管衰老的影响及其潜在作用机制(图 5)。在动物实验中,采用 D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型,连续 ig 给予阿胶 8 周后可有效延缓小鼠衰老,明显减轻小鼠背部皮肤褶皱等衰老症状,增加背部血流。通过免疫荧光染色、OCTA 观测、HE 染色以及免疫组化实验等,证实了阿胶能够改善小鼠背部血管成像,减少血管密度,维持血管的正常分布和密度;增加表皮层和真皮层厚度,促进皮肤组织的修复和再生;提高周细胞标志物 PDGFR β 的表达量,增强血管的稳定性。以上结果提示长期口服阿胶可以有效延缓皮肤的衰老,同时能减轻皮肤因衰老而引起的炎症,其作用机制与维持血管稳态密切相关。在细胞实验中,采用 HUVEC 细胞进一步考察了阿胶对细胞衰老及血管相关功能的影响。结果表明,阿胶能够有效抵抗 H_2O_2 诱导的 HUVEC 衰老,显著降低衰老阳性细胞数目和细胞内 ROS 水平,同时

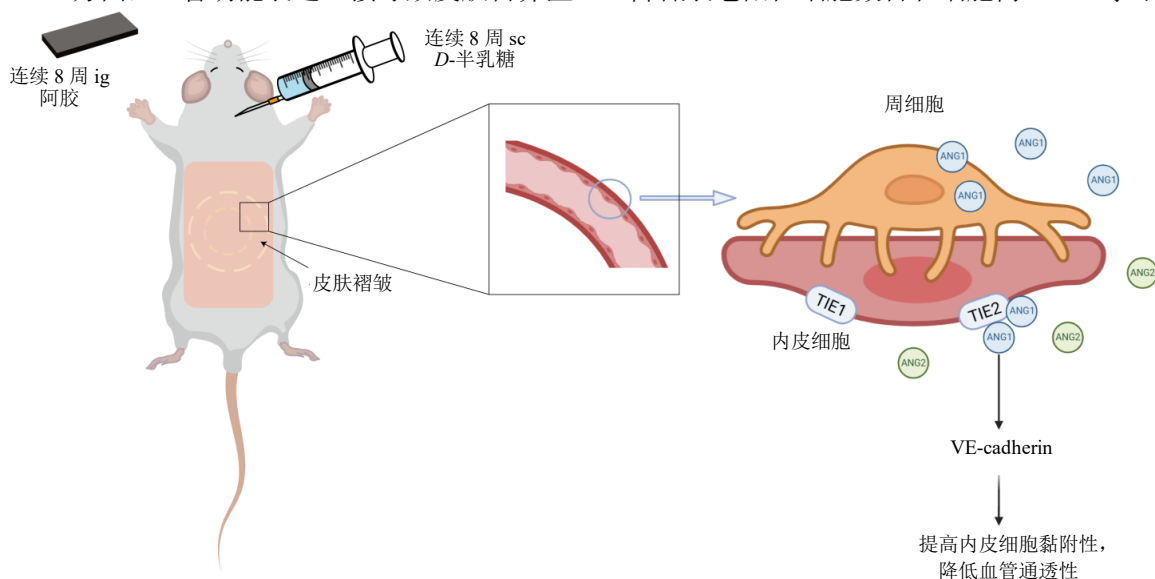


图 5 阿胶通过调控 Tie2/Ang/VE-cadherin 通路改善皮肤衰老相关的微血管稳态紊乱

Fig. 5 *Colla Corii Asini* improves skin aging related microvascular homeostasis disorder by regulating Tie2/Ang/VE-cadherin pathway

下调 SASP 相关基因的表达。在对血管成熟相关通路及蛋白表达的影响研究中,发现阿胶可通过调节 Tie2/Ang 信号传导通路,显著提高 p-Tie2 和 VE-cadherin 的表达量,同时维持 VEGFA 的相对低表达水平,并增加 Ang1/Ang2 的值,从而有效提高血管的成熟度和稳定性。在周细胞招募和内皮屏障通透性实验中,阿胶预处理后的 HUVEC 表现出更强的招募周细胞能力,显著增加了周细胞的迁移数量,同时明显降低了 THP-1 细胞的渗透性,有力地证明了阿胶能够增强血管稳定性,提高血管内皮的完整性,维持血管稳态。需要指出的是, H₂O₂ 诱导的 HUVEC 模型本质上属于氧化应激驱动的应激性早衰模型,主要用于模拟内皮细胞在衰老相关微环境中的早衰表型,而不同于完整的自然复制性衰老过程。因此,本研究对早衰的界定主要基于 SA-β-gal、ROS、p16、p21、p53 及 SASP 相关指标的综合变化,后续仍可结合细胞周期阻滞等指标进一步增强模型表征。

已有研究表明,血管衰老在皮肤老化中发挥重要作用。Ang-Tie2 通路被广泛认为是维持内皮屏障和抗炎的重要调控轴^[9]。Ang1 结合 Tie2 促进内皮细胞间连接、抑制血管渗漏^[41],而 Ang2 则为其拮抗因子^[42],在炎症与衰老状态中常被上调。本研究结果显示,阿胶干预后 Ang1/Ang2 值恢复至近似正常水平,与 Thurston 等^[43-44]报道中 Ang1 改善血管渗漏的机制相符。氧化应激亦是细胞衰老及血管退化的关键因素。细胞实验中阿胶可显著降低 ROS 水平,抑制 p21、p53 等 SASP 因子表达,与 Han 等^[37]、Ungvari 等^[45]提出的抗氧化干预可缓解血管功能障碍观点一致。而阿胶在延缓早衰过程中表现出优异的抗氧化与抗炎协同作用,进一步支持其作为多靶点天然抗衰药物的潜力。当前市面上常用抗衰老手段多局限于外源抗氧化剂或靶向单一通路的小分子药物,其安全性与长期疗效仍然存在一定的争议。作为传统中药,阿胶在抗氧化、组织保护及皮肤稳态维持方面具有一定研究基础。结合本研究结果,阿胶在改善皮肤衰老相关微血管稳态紊乱方面显示出潜在应用价值。但鉴于本研究主要基于动物和细胞实验,其具体作用物质基础、靶点特异性及临床转化价值仍有待进一步验证。

综上,阿胶可在一定程度上改善皮肤衰老相关的微血管稳态紊乱,其作用可能与 Tie2/Ang 信号轴、周细胞募集及内皮完整性的调节有关,为阿胶

干预皮肤衰老相关微循环异常提供了实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Picos A, Seoane N, Campos-Toimil M, *et al.* Vascular senescence and aging: Mechanisms, clinical implications, and therapeutic prospects [J]. *Biogerontology*, 2025, 26(3): 118.
- [2] Wang-Evers M, Casper M J, Glahn J, *et al.* Assessing the impact of aging and blood pressure on dermal microvasculature by reactive hyperemia optical coherence tomography angiography [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 13411.
- [3] Kasal D A, Sena V, Huguenin G V B, *et al.* Microvascular endothelial dysfunction in vascular senescence and disease [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2025, 12: 1505516.
- [4] Zhang Y C, Liu J Q, Zou T, *et al.* DPSCs treated by TGF-β1 regulate angiogenic sprouting of three-dimensionally co-cultured HUVECs and DPSCs through VEGF-Ang-Tie2 signaling [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 281.
- [5] Zhang L, Xu Z J, Jiang T, *et al.* Efficacy and safety of Ejiao (*Asini Corii Colla*) in women with blood deficient symptoms: A randomized, double-blind, and placebo-controlled clinical trial [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 718154.
- [6] 辛睿静. 双侧颈动脉高风险斑块的 MR 影像特征、危险因素及其与临床症状的相关性研究 [D]. 南京: 东南大学, 2021.
- [7] Gaonac'h-Lovejoy V, Boscher C, Delisle C, *et al.* Rap1 is involved in angiopoietin-1-induced cell-cell junction stabilization and endothelial cell sprouting [J]. *Cells*, 2020, 9(1): 155.
- [8] Nan W J, He Y X, Wang S R, *et al.* Molecular mechanism of VE-cadherin in regulating endothelial cell behaviour during angiogenesis [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1234104.
- [9] Wakasugi R, Suzuki K, Kaneko-Kawano T. Molecular mechanisms regulating vascular endothelial permeability [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(12): 6415.
- [10] 杨宝林. NO/NOS 在侧支血管生长中对血管 VE-cadherin 表达及通透性的影响 [D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- [11] Parikh S M. Angiopoietins and Tie2 in vascular inflammation [J]. *Curr Opin Hematol*, 2017, 24(5): 432-438.
- [12] Koya Y, Nara H, Yagi S, *et al.* An engineered tetra-valent antibody fully activates the Tie2 receptor with comparable potency to its natural ligand angiopoietin-1 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 14021.
- [13] Reglero-Real N, Rolas L, *et al.* Aging microvasculature: Effects on immune cell trafficking and inflammatory diseases [J]. *J Exp Med*, 2025, 222(7): e20242154.
- [14] Kraft M, Schoofs H, Petkova M, *et al.* Angiopoietin-TIE2 feedforward circuit promotes PIK3CA-driven venous malformations [J]. *Nat Cardiovasc Res*, 2025, 4(7): 801-820.
- [15] Liang R, Xu L, Fan C, *et al.* Structural characteristics and

- antioxidant mechanism of donkey-hide gelatin peptides by molecular dynamics simulation [J]. *Molecules*, 2023, 28(24): 7975.
- [16] Luo Q D, Zhang S, Sun Z, *et al.* Protective effects of *Colla Corii Asini* collagen peptides on *D*-galactose injection combined with UVB irradiation-induced aging in mice [J]. *PLoS One*, 2025, 20(2): e0317302.
- [17] Zhang J J, Lin D L, Wu Y T, *et al.* Blood-supplementing effect of low molecular weight peptides of E-Jiao on chemotherapy-induced myelosuppression: Evaluation of pharmacological activity and identification of bioactive peptides released *in vivo* [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1366407.
- [18] Răpă M, Gaidau C, Stefan L M, *et al.* Donkey gelatin and keratin nanofibers loaded with antioxidant agents for wound healing dressings [J]. *Gels*, 2024, 10(6): 391.
- [19] Xu X L, Wang B, Ren C H, *et al.* Recent progress in vascular aging: Mechanisms and its role in age-related diseases [J]. *Aging Dis*, 2017, 8(4): 486.
- [20] Ma Y M, Huang J, Gong J X, *et al.* *Colla Corii Asini* regulate collagen regeneration in UV exposure-induced skin photoaging in mice [J]. *Chin Med*, 2025, 20(1): 146.
- [21] Gao X Y, Ma S H, Sun Y N, *et al.* *Colla Corii Asini* prevents H₂O₂-induced cellular aging and skin barrier damage in HaCaT keratinocytes [J]. *J Food Biochem*, 2025, 2025(1): 2885165.
- [22] Chen L, Wu B F, Mo L, *et al.* High-content screening identifies ganoderic acid A as a senotherapeutic to prevent cellular senescence and extend healthspan in preclinical models [J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 2878.
- [23] Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(2): 193-215.
- [24] Winkler E A, Bell R D, Zlokovic B V. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling [J]. *Mol Neurodegener*, 2010, 5: 32.
- [25] Li M, Zhao Y Y, Cui J F. Matrix stiffness in regulation of tumor angiogenesis [J]. *World Chin J Digestol*, 2022, 30(20): 871-878.
- [26] 李建斌, 吴锐. 周细胞脱落与神经精神性狼疮血瘀证目征和血脑屏障功能障碍的相关性 [J]. 实用医学杂志, 2025, 41(6): 790-799.
- [27] 朱姗, 赵志月, 王子静, 等. 皮肤老化分子机制及中药防治皮肤老化研究进展 [J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(4): 431-439.
- [28] 程浩然, 梁颢, 陈求芳, 等. 智能响应型水凝胶在皮肤光老化修复中的研究进展 [J]. 中草药, 2026, 57(4): 1528-1537.
- [29] Quan T, Fisher G J. Role of age-associated alterations of the dermal extracellular matrix microenvironment in human skin aging: A mini-review [J]. *Gerontology*, 2015, 61(5): 427-434.
- [30] Franceschi C, Garagnani P, Parini P, *et al.* Inflammaging: A new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2018, 14(10): 576-590.
- [31] Augustin H G, Koh G Y, Thurston G, *et al.* Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(3): 165-177.
- [32] Saharinen P, Eklund L, Alitalo K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-Tie pathway [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16(9): 635-661.
- [33] 王平. 中医药干预肺血管衰老的研究进展与展望 [J]. 老年医学与保健, 2020, 26(6): 904-907.
- [34] Sha L L, Zhao Y M, Li S Y, *et al.* Insights to Ang/Tie signaling pathway: Another rosy dawn for treating retinal and choroidal vascular diseases [J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 898.
- [35] Zhang Y, Lin S, Liu J, *et al.* Ang1/Tie2/VE-cadherin signaling regulates DPSCs in vascular maturation [J]. *J Dent Res*, 2024, 103(1): 101-110.
- [36] Sun Y, Wang X, Liu T W, *et al.* The multifaceted role of the SASP in atherosclerosis: From mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Cell Biosci*, 2022, 12(1): 74.
- [37] Han Y, Kim S Y. Endothelial senescence in vascular diseases: Current understanding and future opportunities in senotherapeutics [J]. *Exp Mol Med*, 2023, 55(1): 1-12.
- [38] Guida S, Ciardo S, Galadari H, *et al.* Correlating optical coherence tomography and other noninvasive imaging features with atrophic and hypertrophic skin photoaging [J]. *Int J Dermatol*, 2025, 64(8): 1441-1445.
- [39] Wang S, Li F F, Feng X L, *et al.* Promoting collagen synthesis: A viable strategy to combat skin ageing [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2025, 40(1): 2488821.
- [40] Grunewald M, Kumar S, Sharife H, *et al.* Counteracting age-related VEGF signaling insufficiency promotes healthy aging and extends life span [J]. *Science*, 2021, 373(6554): eabc8479.
- [41] McClennan A, Hoffman L. Angiopoietin 1 attenuates dysregulated angiogenesis in the gastrocnemius of DMD mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(21): 11824.
- [42] Hellenthal K E M, Brabenec L, Wagner N M. Regulation and dysregulation of endothelial permeability during systemic inflammation [J]. *Cells*, 2022, 11(12): 1935.
- [43] Thurston G, Suri C, Smith K, *et al.* Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1 [J]. *Science*, 1999, 286(5449): 2511-2514.
- [44] Thurston G, Rudge J S, Ioffe E, *et al.* Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage [J]. *Nature Medicine*, 2000, 6(4): 460-463.
- [45] Ungvari Z, Tarantini S, Donato A J, *et al.* Mechanisms of vascular aging [J]. *Circ Res*, 2018, 123(7): 849-867.

[责任编辑 李亚楠]