

康欣胶囊关键活性成分木犀草素延缓血管内皮细胞衰老机制研究

柯宇冰,程冰冰,吴倩媛,伍佳乐,王颖峥*
(福建中医药大学药学院,福建福州 350122)

摘要: 目的 采用网络药理学筛选康欣胶囊延缓血管内皮细胞衰老的关键活性成分,并结合体外实验验证其作用机制。方法 通过网络药理学筛选康欣胶囊活性成分和衰老相关交集靶点,构建中药-活性成分-交集靶点网络图;利用60 $\mu\text{mol/L}$ 过氧化氢(H_2O_2)诱导人脐静脉内皮细胞(HUVECs)构建细胞衰老模型,通过细胞计数试剂盒-8(CCK-8)法检测细胞活力,从木犀草素、异鼠李素、刺槐素及常春藤皂苷元4种候选成分中筛选出关键活性成分;提取关键活性成分(木犀草素)作用靶点与衰老相关靶点进行映射,获取交集靶点,借助Metascape平台进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,并利用AutoDock Vina软件进行分子对接验证;采用CCK-8法检测木犀草素的安全浓度及有效浓度,以确定后续给药剂量;将HUVECs采用随机数字表法分为空白组、 H_2O_2 组(60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2)及木犀草素低、中、高剂量组(2、4、8 $\mu\text{mol/L}$),采用细胞衰老 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色检测HUVECs形态及染色阳性率,通过Western blot法检测p53、p-ERK1/2、cGAS及STING蛋白表达水平。结果 网络药理学结合体外评价初筛确定木犀草素为康欣胶囊抗衰老的关键活性成分。木犀草素抗衰老交集靶点174个,KEGG通路富集分析结果显示,木犀草素抗衰老交集靶点主要富集在MAPK信号通路;分子对接证实木犀草素与ERK1/2、cGAS、STING蛋白均具有较强结合能力,结合能均 <-7.0 kcal/mol。木犀草素浓度在10 $\mu\text{mol/L}$ 及以下时为安全浓度,在2、4、8、10 $\mu\text{mol/L}$ 时为有效浓度,最终确定2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 分别作为木犀草素低、中、高剂量组进行后续机制验证。与空白组比较, H_2O_2 组细胞变圆,间隙增宽,胞质内可见大量深蓝色颗粒状沉淀,SA- β -gal阳性细胞比率升高($P<0.05$),HUVECs中p53、p-ERK1/2、cGAS和STING的蛋白表达量均上升($P<0.05$);与 H_2O_2 组比较,木犀草素低、中、高剂量组(2、4、8 $\mu\text{mol/L}$)随给药浓度增加,蓝色阳性染色细胞显著减少,染色程度逐渐变浅,细胞形态逐步恢复至接近空白组水平,SA- β -gal阳性细胞比率均降低($P<0.05$),且随给药浓度增加而呈剂量依赖性递减,中、高剂量组HUVECs中p53、p-ERK1/2、cGAS和STING的蛋白表达量均下降($P<0.05$)。结论 木犀草素是康欣胶囊发挥抗血管内皮细胞衰老作用的关键活性成分,其机制可通过抑制cGAS-STING信号通路激活并下调ERK1/2磷酸化水平,进而改善血管内皮细胞衰老。

关键词: 衰老;康欣胶囊;木犀草素;血管内皮细胞;ERK1/2;cGAS-STING信号通路

细胞衰老是指由多种亚致死性应激诱导的细胞周期永久性停滞状态。研究表明,衰老细胞在血管组织中的蓄积与心血管疾病的发生和发展密切相关^[1-3]。康欣胶囊具有补肾填精、健脾益气、养血活血的功效,临床证实其在治疗老年性疾病方面具有显著抗衰老作用^[4-5],然其确切的药效物质基础及分子机制尚待明确。鉴于此,本研究通过网络药理学对康欣胶囊的关键活性成分进行筛选,并利用过氧化氢(H_2O_2)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)构建体外细胞衰老模型^[6],旨在验证并解析筛选所得关键活性成分延缓内皮细胞衰老的作用机制。

1 实验材料

1.1 实验细胞 HUVECs(货号:SCSP-5535)来源于中国科学院细胞库。

1.2 实验药物与试剂 木犀草素(货号:111520-202107)、异鼠李素(货号:110860-202012)均购自中国食品药品检定研究院;刺槐素(成都格利普生

物科技有限公司,货号:480-44-4);常春藤皂苷元(上海陶术生物科技有限公司,货号:T3039);30% H_2O_2 (西陇化工股份有限公司,货号:001532);1640培养基(货号:C11875500BT)、胎牛血清(货号:C04001-500)、青霉素-链霉素(货号:sv30010)、干扰素基因刺激蛋白(STING)多克隆抗体(货号:PA5-116052)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;磷酸盐缓冲液(PBS,北京索莱宝生物科技有限公司,货号:C3580-0500);细胞衰老 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号:C0602);细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测试剂(货号:CK001)、羊抗小鼠IgG-HRP(货号:S0100)、羊抗兔IgG-HRP(货号:S0100)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(货号:G0100)均购自北京兰博利德科技有限公司;无蛋白快速封闭液1 \times (上海雅酶生物医药科技有限公司,货号:PS108P);环鸟苷酸-腺苷酸合成酶(cGAS)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号:29958-1-AP);肿瘤抑制蛋白p53(p53)抗体(美国Abcam PLC公司,货号:GR3213177-1);磷酸化细胞外信号调节激酶

收稿日期:2025-08-30;接受日期:2026-01-15

基金项目:国家中医药管理局临床中医学高水平中医药重点学科建设(国中医药人教函[2023]85号)

通信作者:王颖峥, E-mail: wangyingzheng@live.com

DOI: 10.13260/j.cnki.fjtc.2026.02008

1/2(p-ERK1/2)抗体(成都正能生物技术有限责任公司,货号:301245);细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:11257-1-AP)。

1.3 实验仪器 CO₂培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,型号:HERAcell vios 160i);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ);光学显微镜(德国 Leica 公司,型号:DM4000B);酶标仪(瑞士 Tecam 公司,型号:InfiniteM200Pro);凝胶成像分析仪(型号:Chemidoc XRS+);电泳仪(型号:Powerpac Basic)均购自美国 Bio-Rad 公司;十万分之一天平(上海奥豪斯仪器有限公司,型号:AR223CN);倒置荧光显微镜(美国 Leica 公司,型号:DFC300FX)。

2 方法

2.1 康欣胶囊关键活性成分初筛

2.1.1 康欣胶囊活性成分及作用靶点筛选 检索中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),设定口服生物利用度(OB)≥30%及类药性(DL)≥0.18为筛选阈值,初步获取康欣胶囊(枸杞子、淫羊藿、女贞子、菟丝子、黄芪、黄精、丹参、地骨皮、菊花、当归、酸枣仁、山楂和何首乌)13味药的活性成分。针对TCMSP数据库未收录或缺失的关键成分,依据参考文献[7]进行补充收集,建立康欣胶囊活性成分数据库。从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch>)和 PharmMapper(<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)数据库中收集“Probability”>0的靶点信息,获得康欣胶囊活性成分作用靶点。

2.1.2 衰老相关靶点数据库的构建 参考文献[8],在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://omim.org/>)2个数据库中分别输入“aging”与“senescence”进行检索,整合不同数据库的检索结果,取交集并剔除重复数据,构建衰老相关靶点数据库。

2.1.3 康欣胶囊活性成分和衰老相关交集靶点筛选及中药-活性成分-交集靶点网络图构建 借助通用蛋白质资源数据库 UniProt(<https://www.uniprot.org/>)对活性成分靶点及衰老相关靶点的基因名称进行规范化处理,并利用 Venny 2.1.0 在线工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)确定康欣胶囊活性成分作用靶点与衰老相关靶点间的交集靶点,并绘制韦恩图。将交集靶点导入 Cytoscape 3.10.1 软件,构建中药-活性成分-交集靶点网络。最后,根据该网络筛选出网络中度值较

高的关键成分,作为后续体外细胞实验进行关键活性成分筛选的候选物质。

2.2 康欣胶囊关键活性成分的体外评价 结合“2.1.3”项下结果与参考文献[9-12],选取对数生长期的 HUVECs,以 1×10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板中。实验采用随机分组设计,共设空白组、H₂O₂ 组和候选活性成分给药组。其中,候选活性成分给药组针对初筛得到的木犀草素、异鼠李素、刺槐素及常春藤皂苷元 4 种成分,分别设置低、中、高 3 个浓度梯度(1、3、10 μmol/L)。待细胞贴壁后,各给药组先加入对应浓度的含药培养基预处理 2 h,随后加入含 60 μmol/L H₂O₂ 培养基共孵育 24 h。H₂O₂ 组同法加入等体积含 60 μmol/L H₂O₂ 的无药培养基。空白组仅加入等量完全培养基。孵育结束后,严格按照 CCK-8 试剂盒说明书操作检测各孔光密度值,计算细胞活力以优选关键活性成分。经筛选,确定木犀草素为康欣胶囊关键活性成分。

2.3 木犀草素抗衰老的作用机制预测

2.3.1 木犀草素抗衰老交集靶点筛选 参照“2.1.1”和“2.1.2”项下所述方法,从已构建的数据库中提取木犀草素作用靶点与衰老相关靶点,分别建立靶点数据库。利用 Venny 2.1.0 在线工具将木犀草素作用靶点与衰老相关靶点取交集,绘制韦恩图,获得木犀草素抗衰老靶点。

2.3.2 京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将木犀草素抗衰老靶点导入 Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)进行 KEGG 通路富集分析,设置 $P < 0.01$ 为显著性阈值,筛选显著富集的信号通路。选取富集程度最高的前 20 条通路信息,采用微生信在线平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)构建气泡图进行可视化呈现。

2.3.3 分子对接 采用分子对接技术评估木犀草素与抗衰老靶点的结合亲和力。通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得木犀草素的标准 3D 化学结构;同时从 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)检索并下载 STING(PDB ID: 4emu)、cGAS(PDB ID: 8img)和 ERK1/2(PDB ID: 5ji9)的高分辨率 3D 晶体结构。利用 Autodock Vina 1.5.7 软件和 MGLTools 1.5.7 软件进行蛋白质预处理,包括去除水分子、计算 Gasteiger 电荷、添加极性氢原子以及合并非极性氢原子,并输出为 PDBQT 格式文件以构建对接体系。利用 AutoDock Vina 1.5.7 软件进行分子对接研究,以结合能为评价指标,筛选每种对接模式下的最低结合能构象,并利用 PyMOL 2.5.5 软件对木犀草素与抗衰老靶点的结合模式进行可视化分析。

2.4 木犀草素抗衰老机制的体外评价

2.4.1 木犀草素的安全浓度与有效浓度筛选 选取对数生长期的 HUVECs, 以 1×10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板中, 采用随机数字表法分为空白组和不同浓度木犀草素组。其中, 给药组分别加入含 2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素的完全培养基; 空白组给予等量完全培养基。每组设 5 个复孔, 常规培养 24 h。采用 CCK-8 试剂盒检测各组细胞活力, 以筛选药物安全浓度。

根据以上安全浓度, 选取对数生长期 HUVECs, 以 1×10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板中, 采用随机数字表法分为空白组、 H_2O_2 组及不同浓度木犀草素组。其中, 给药组分别加入含 0.25、0.5、1、2、4、8、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 木犀草素的完全培养基预处理 2 h, 随后加入含 60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的完全培养基共同孵育 24 h; H_2O_2 组与空白组处理同“2.2”项。每组设 5 个复孔, 孵育结束后采用 CCK-8 试剂盒检测各组细胞活力, 以确定木犀草素发挥抗衰老作用的最佳有效浓度。

2.4.2 HUVECs 的 SA- β -gal 染色 选取 HUVECs 对数生长期的细胞 4×10^4 个/孔铺板至 24 孔板中, 待细胞贴壁并生长至约 80% 时, 采用随机数字表法分为空白组、 H_2O_2 组和低、中、高剂量组。给药组给予木犀草素低、中、高剂量 (2.4、8 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 2 h, 随后加入含 60 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的完全培养基共同孵育 24 h; H_2O_2 组与空白组处理同“2.2”项。孵育结束后, 采用 PBS 清洗细胞 2 次, 加入固定液室温固定 15 min; PBS 再次清洗后, 加入含 X-gal 的 SA- β -gal 染色工作液染色调节 pH 至 5.9~6.1, 在 37 $^\circ\text{C}$ 无 CO_2 的孵育箱中孵育过夜。孵育结束后去除染色液, 加入 PBS 2 mL, 在显微镜下随机选取 4 个视野进行图像采集, 并计算 SA- β -gal 阳性细胞比率, 判断内皮细胞衰老情况。

2.4.3 Western blot 检测 HUVECs 中 p53、p-ERK1/2、cGAS 和 STING 蛋白表达量 选取对数生长期的 HUVECs, 以 3×10^5 个/孔铺板至 6 孔板中, 按照“2.4.2”项下方法进行分组处理。干预结束后, 收集各组细胞, 加入 RIPA 裂解液冰上裂解 15 min。于 4 $^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 条件下离心 8 min, 提取总蛋白上清。利用 BCA 试剂盒检测蛋白上清浓度, 根据蛋白浓度制备上样蛋白。

取蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 随后转移至 PVDF 膜。转膜完成后, 利用快速封闭液室温封闭 20 min。分别加入一抗 p53 (1:1 000)、STING (1:1 000)、cGAS (1:1 000)、p-ERK1/2 (1:1 000)、ERK1/2 (1:1 000) 和 GAPDH (1:5 000), 置于 4 $^\circ\text{C}$ 冷藏环境孵育过夜。次日用 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 3 次, 每次 5 min, 随后加入对应二抗室温孵育 1 h,

再次经 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜 3 次, 每次 10 min。滴加 ECL 显影液进行显色, 采用 Image lab 软件分析结果。以 GAPDH 作为内参, 通过分析目的条带与内参条带的灰度值比值, 计算各蛋白相对表达水平。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 27.0 软件进行数据分析, 并通过 GraphPad Prism 8 软件进行可视化呈现。计量资料符合正态分布以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐采用 LSD- t 法进行组间两两比较, 若方差不齐则选用 Games-Howell 检验进行分析比较。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 康欣胶囊活性成分和衰老相关交集靶点筛选结果 本研究共获取康欣胶囊活性成分 169 个, 活性成分作用靶点 565 个; 同时, 检索获得衰老相关靶点 2 221 个。通过将康欣胶囊活性成分作用靶点与衰老相关靶点映射分析, 最终获得康欣胶囊与衰老相关交集靶点共 293 个。见图 1。

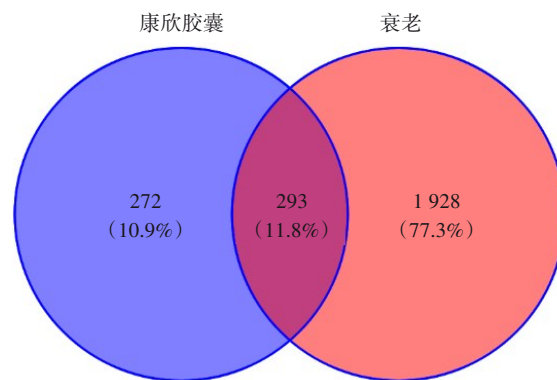
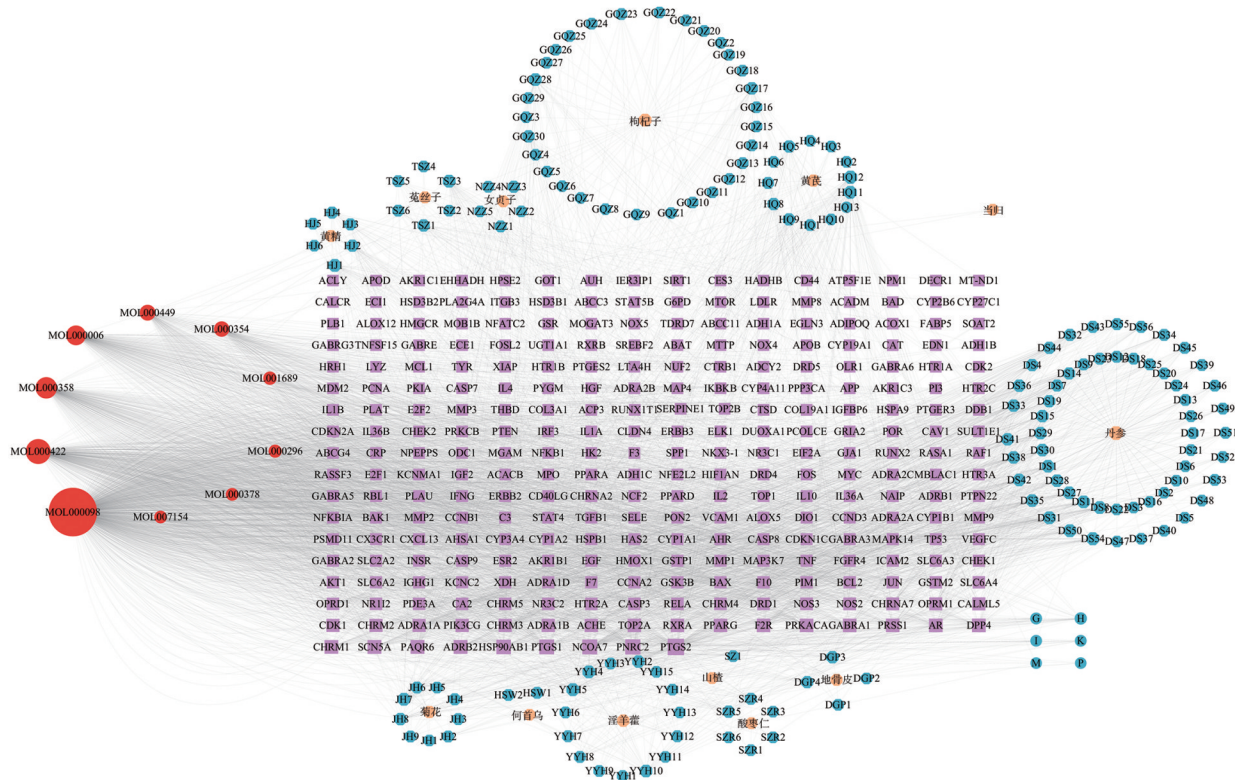


图1 康欣胶囊活性成分和衰老相关交集靶点韦恩图

3.2 康欣胶囊中药-活性成分-交集靶点网络图构建结果 通过 Cytoscape 3.10.1 构建康欣胶囊中药-活性成分-交集靶点网络图, 由 432 个节点、4 385 条边组成。见图 2。根据度值筛选出该网络中贡献度最高的前 10 位活性成分。见表 1。

3.3 康欣胶囊关键活性成分的体外评价结果 综合考虑成药性和抗衰老潜质等因素^[9-12], 选取木犀草素、异鼠李素、刺槐素及常春藤皂苷元进行体外评价。与空白组比较, H_2O_2 组细胞活力显著下降 ($P < 0.05$); 与 H_2O_2 组比较, 木犀草素组在 3 $\mu\text{mol/L}$ 及 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞活力显著上升 ($P < 0.05$), 常春藤皂苷元组在 10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞活力显著上升 ($P < 0.05$), 其余候选活性成分组在实验浓度下未见统计学差异 ($P > 0.05$), 表明木犀草素对 H_2O_2 诱导的 HUVECs 损伤展现保护作用。因此, 确定木犀草素为康欣胶囊发挥抗衰老作用的关键活性成分。见图 3。

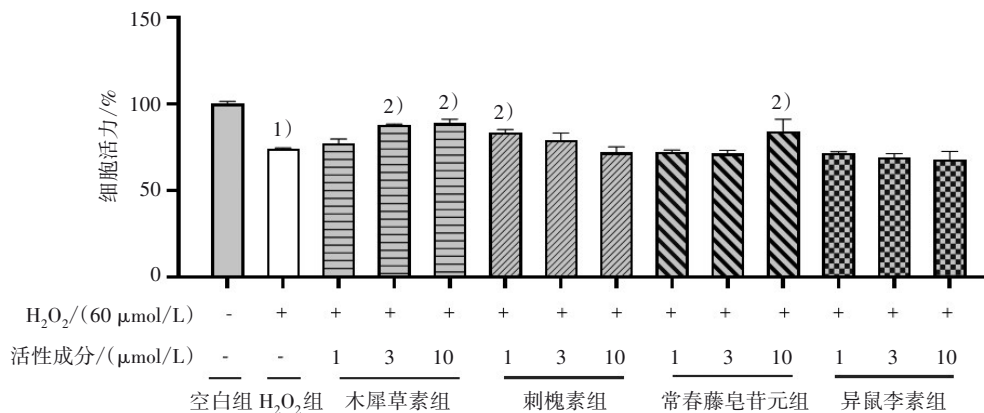


注:图中橙色为中药,蓝色为中药活性成分,红色为度值排名前10的中药活性成分,紫色为交集靶点。

图2 康欣胶囊中药-活性成分-交集靶点网络图

表1 康欣胶囊度值前10活性成分

MOLID	分子名	中文名	度值	OB/%	DL	中药来源
MOL007154	tanshinone iia	丹参酮 II A	41	49.89	0.40	丹参
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	7-O-甲基异黏核醇	46	74.69	0.30	黄芪
MOL000296	hederagenin	常春藤皂苷元	48	36.91	0.75	黄芪,地骨皮
MOL001689	acacetin	刺槐素	54	34.97	0.24	菊花,地骨皮
MOL000354	isorhamnetin	异鼠李素	111	49.60	0.31	菟丝子,黄芪,菊花,山楂
MOL000449	Stigmasterol	豆甾醇	122	43.83	0.76	枸杞子,当归,地骨皮,山楂
MOL000006	luteolin	木犀草素	232	36.16	0.25	淫羊藿,女贞子,丹参,菊花
MOL000358	Beta-sitosterol	β-谷甾醇	280	36.91	0.75	枸杞子,女贞子,当归,菟丝子,黄精,地骨皮
MOL000422	Kaempferol	山柰酚	378	41.88	0.24	淫羊藿,女贞子,菟丝子,黄芪,菊花,山楂
MOL000098	Quercetin	槲皮素	1043	46.43	0.28	枸杞子,淫羊藿,菟丝子,黄芪,菊花,山楂,女贞子



注:与空白组比较,1) $P < 0.05$;与 H_2O_2 组比较,2) $P < 0.05$ 。

图3 康欣胶囊候选活性成分对 H_2O_2 诱导 HUVECs 损伤的影响

3.4 木犀草素抗衰老交集靶点筛选结果 本研究共获取木犀草素作用靶点 350 个,衰老相关靶点 2 221 个。通过将木犀草素作用靶点与衰老相关靶点映射分析,最终获得木犀草素抗衰老交集靶点共 174 个。见图 4。

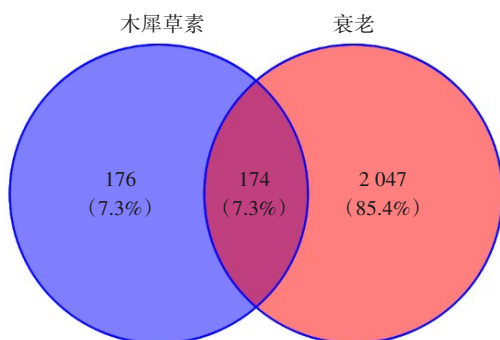


图 4 木犀草素抗衰老交集靶点韦恩图

3.5 KEGG 通路富集分析结果 木犀草素抗衰老交集靶点主要富集在 PI3K-Akt、MAPK、Ras 等信号通路。见图 5。MAPK 信号通路在富集显著性($P=1.035 \times 10^{-21}$)及基因覆盖率上均表现突出。且 MAPK 家族包含 ERK、JNK 及 p38 等多条关键支路,在调控细胞增殖、分化及衰老过程中发挥核心作用。因此,需要进一步聚焦于通路中的关键分子。

ERK1/2 作为 MAPK 信号通路的关键蛋白激酶,负责将胞外信号转导至核内,其功能的行使需经磷酸化转化为 p-ERK1/2 形式。尽管有研究显示,激活 ERK1/2 磷酸化可促进多发性骨髓瘤细胞衰老^[13],但 ERK1/2 在介导木犀草素延缓内皮细胞衰老中的具体调控方向及作用机制尚不明确。因此,本研究选取 ERK1/2 作为核心靶点,探讨木犀草素通过该通路延缓内皮细胞衰老的具体作用机制。

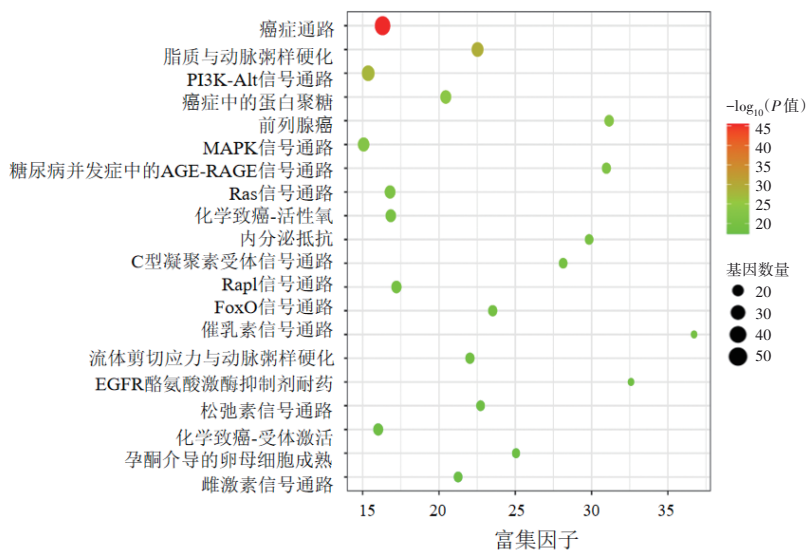
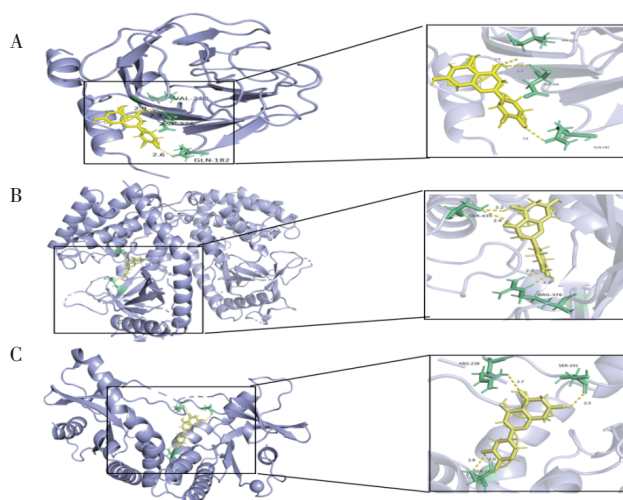


图 5 KEGG 通路富集分析结果

3.6 分子对接结果 木犀草素抗衰老作用高度富集于 MAPK 信号通路。然而,信号通路激活受上游 cGAS-STING 调控。有研究显示,cGAS-STING 信号通路作为细胞衰老的关键因素,已被证实能有效激活下游的 MAPK/ERK 级联反应^[14]。鉴于网络药理学预测结果与文献报道结果,本研究推测木犀草素可通过作用于 cGAS-STING-ERK1/2 发挥抗衰老作用。为此,本研究采用分子对接技术,验证木犀草素与 cGAS、STING 及 ERK1/2 的结合亲和力。对接结果显示,木犀草素与 ERK1/2、cGAS 及 STING 蛋白均能形成稳定复合物,其结合能均 < -7.0 kcal/mol,分别为 -7.4、-8.6、-7.8 kcal/mol,表明木犀草素与 3 个靶点间具有较强结合能力。如图 6。

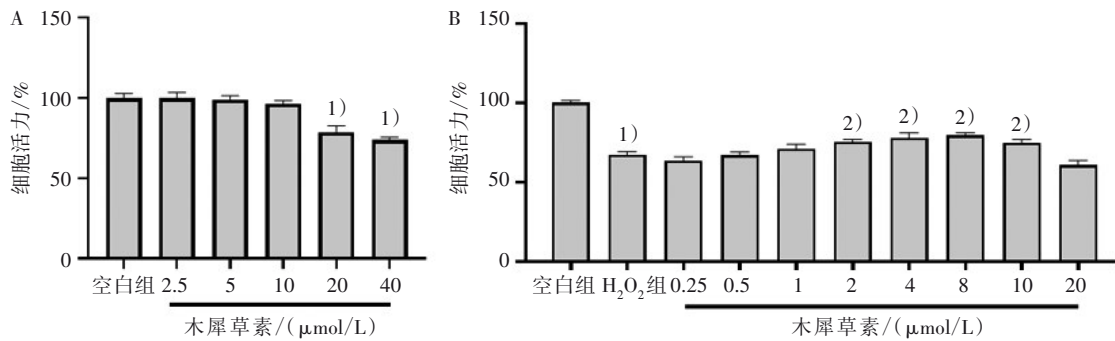


注:A 木犀草素和 ERK1/2 对接构象;B 木犀草素和 cGAS 对接构象;C 木犀草素和 STING 对接构象。

图 6 木犀草素和 ERK1/2、cGAS 和 STING 分子对接构象

3.7 木犀草素的安全浓度与有效浓度筛选结果 木犀草素对 HUVECs 的安全浓度筛选结果显示,与空白组比较,当木犀草素浓度达到 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力均下降 ($P < 0.05$);而在 10 $\mu\text{mol/L}$ 及以下浓度时,细胞活力未见明显改变 ($P > 0.05$),提示木犀草素在 10 $\mu\text{mol/L}$ 及以下时 HUVECs 无显著细胞毒性。木犀草素对 HUVECs 的

有效浓度筛选结果显示,与空白组比较, H_2O_2 组细胞活力下降 ($P < 0.05$);与 H_2O_2 组比较,木犀草素组在 2、4、8、10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下细胞活力均上升 ($P < 0.05$),且 20 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞活力呈回落趋势。综合考量药物的安全浓度与有效浓度,本研究最终选取 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 分别作为木犀草素低、中、高剂量组进行后续机制验证。见图 7。



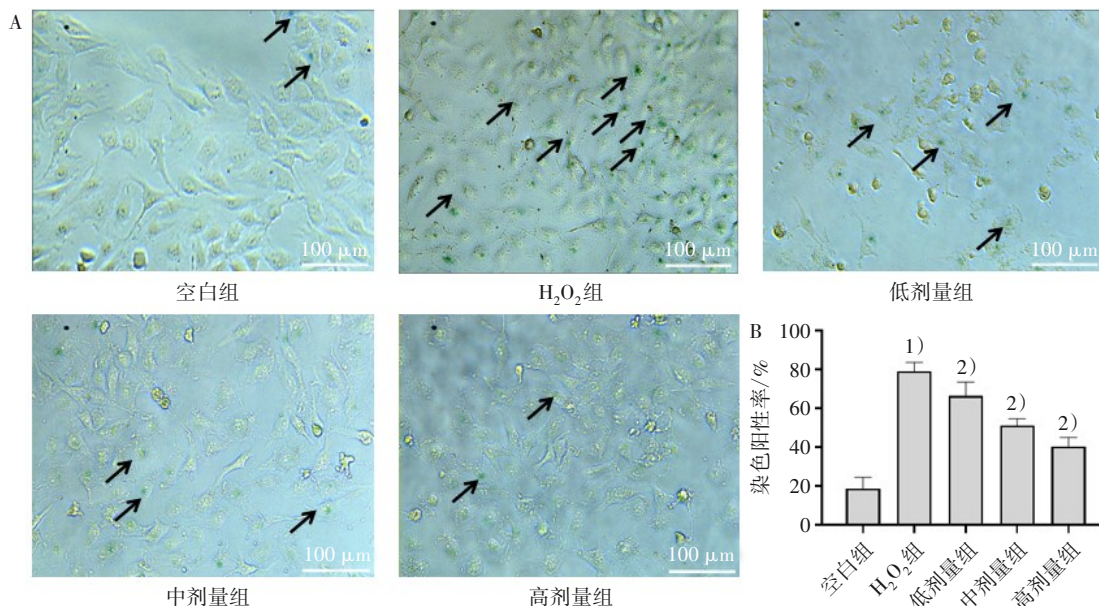
注:A 木犀草素对 HUVECs 的安全浓度筛选结果;B 木犀草素对 HUVECs 的有效浓度筛选结果。与空白组比较,1) $P < 0.05$;与 H_2O_2 组比较,2) $P < 0.05$ 。

图 7 木犀草素的安全浓度与有效浓度筛选结果

3.8 5 组 HUVECs 的 SA- β -gal 染色结果比较 在 HUVECs 的 SA- β -gal 染色中,胞质呈现蓝色的细胞判定为 SA- β -gal 染色阳性,其染色深度与面积对 HUVECs 的衰老程度呈正相关。染色结果显示,空白组内皮细胞贴壁呈单层生长,形态为规则的铺路石样,细胞边界清晰,胞质充盈,视野内仅见极少量淡蓝色染色。与空白组比较, H_2O_2 组细胞生长减慢,细胞变圆,间隙增宽,胞质内可见大量深蓝色颗粒状沉淀, H_2O_2 组的 SA- β -gal 阳性细胞比率升高

($P < 0.05$);与 H_2O_2 组比较,木犀草素低、中、高剂量组随给药浓度增加,蓝色阳性染色细胞显著减少,染色程度逐渐变浅,细胞形态逐步恢复至接近空白组水平,细胞死亡和脱落现象得到有效抑制,木犀草素低、中、高剂量组 SA- β -gal 阳性细胞比率均降低 ($P < 0.05$),且随给药浓度增加而呈剂量依赖性递减。见图 8。

3.9 5 组 HUVECs 中 p53、p-ERK1/2、cGAS 和 STING 蛋白表达量比较 见图 9 和表 2。



注:A 5 组 HUVECs 的 SA- β -gal 染色图($\times 200$);B 5 组 HUVECs 的 SA- β -gal 染色阳性率。与空白组比较,1) $P < 0.05$;与 H_2O_2 组比较,2) $P < 0.05$ 。

图 8 5 组 HUVECs 的 SA- β -gal 染色结果

表 2 5 组 HUVECs 中 p53、p-ERK1/2、cGAS 和 STING 的蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p53/GAPDH	p-ERK1/2/ERK1/2	cGAS/GAPDH	STING/GAPDH
空白组	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.47
H ₂ O ₂ 组	2.31 ± 0.46 ¹⁾	1.56 ± 0.30 ¹⁾	1.75 ± 0.22 ¹⁾	2.66 ± 0.49 ¹⁾
低剂量组	1.74 ± 0.27	1.20 ± 0.25	1.42 ± 0.25	1.90 ± 0.36 ²⁾
中剂量组	1.28 ± 0.37 ²⁾	1.09 ± 0.22 ²⁾	1.32 ± 0.09 ²⁾	1.76 ± 0.13 ²⁾
高剂量组	1.25 ± 0.34 ²⁾	0.69 ± 0.16 ²⁾	1.08 ± 0.32 ²⁾	1.30 ± 0.24 ²⁾

注:与空白组比较,1) $P < 0.05$;与 H₂O₂组比较,2) $P < 0.05$ 。

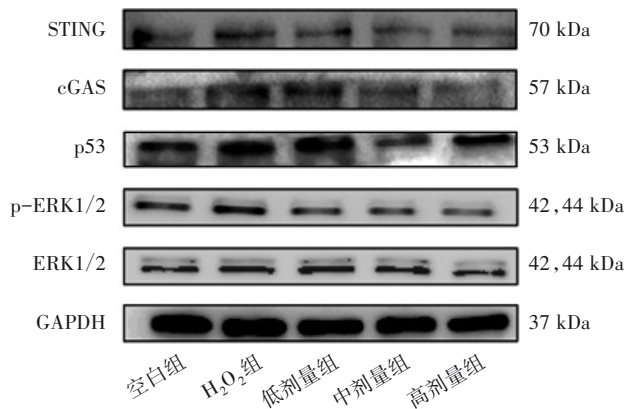


图 9 5 组 HUVECs 中 p53、ERK1/2、cGAS 和 STING 蛋白条带图

4 讨论

细胞衰老与内皮功能障碍密切相关。当内皮细胞衰老,促炎因子及促血栓形成因子的表达显著上调,进而诱导单核-巨噬细胞的活化与黏附,最终驱动动脉粥样硬化的发生与发展^[15]。而康欣胶囊具有补肾填精、健脾益气、养血活血之功效,临床常用于治疗肾虚血瘀型痴呆^[16]。本研究基于网络药理学方法预测了康欣胶囊中潜在的抗衰老活性成分,筛选出 4 种候选成分;通过建立 H₂O₂ 诱导的内皮细胞损伤模型,以细胞存活率为指标进行体外评价,最终确定木犀草素为发挥抗衰老作用的关键活性成分^[17-20]。

KEGG 通路富集分析结果显示,MAPK 信号通路富集结果较好。ERK1/2 是 MAPK 家族蛋白之一,具有典型的级联信号转导特征^[21],是连接细胞外刺激与细胞内转录响应的关键信使,在细胞衰老调控中扮演重要角色。分子对接模拟显示,木犀草素与 ERK1/2 蛋白结构具有良好结合亲和力。同时,有研究表明,H₂O₂ 可诱导线粒体 DNA(mtDNA) 损伤及逃逸,进而激活 cGAS-STING 信号通路,该通路已被证实是衰老过程中慢性炎症和功能下降的关键驱动因素^[22]。分子对接结果亦证实,木犀草素与 cGAS-STING 存在较强结合能。机制上,受损 mtDNA 逃逸至胞质后激活 cGAS-STING,影响下游 ERK1/2 磷酸化水平,诱导干扰素调节因子 3(IRF3) 活化^[13],最终促进干扰素 $\alpha 1$ 及下游干扰素刺激基因的转录表达,加速细胞衰老进程^[23]。综上,KEGG

分析与分子对接结果提示,木犀草素可能通过 cGAS-STING 信号通路和 ERK1/2 以发挥抗衰老作用。

木犀草素作为一种广泛分布于植物界的天然类黄酮化合物,已被证实具备抗炎、抗氧化及抗衰老等多种生物学活性^[24]。研究表明,木犀草素可显著抑制紫外线 B 波段(UVB)诱导的人永生角质形成细胞的基质金属蛋白酶-1 表达及激活蛋白-1 活化,提示其在防治皮肤老化方面具有潜在应用价值^[25]。然而,关于其在抗内皮细胞衰老的药效及机制研究尚显匮乏,亟待深入探讨。本研究选取衰老关键生物标志物 SA- β -gal 活性及衰老相关蛋白 p53 表达作为评价指标^[26]。研究结果显示,H₂O₂ 组 SA- β -gal 阳性率显著升高,同时伴随 p53 蛋白表达上调;而木犀草素干预能有效下调 p53 蛋白表达并降低 SA- β -gal 阳性细胞比率,从而改善 HUVECs 衰老表型。进一步 Western blot 分析提示,H₂O₂ 组中 cGAS、STING 及 p-ERK1/2 蛋白水平均升高,而木犀草素干预显著抑制了上述蛋白的表达,提示其通过调节相关信号通路可延缓内皮细胞衰老。

综上,本研究结合网络药理学预测与体外实验验证,确定木犀草素为康欣胶囊发挥抗衰老作用的关键活性成分。其作用机制可能与木犀草素抑制 cGAS-STING 信号及下调 ERK1/2 磷酸化水平,进而减轻 H₂O₂ 诱导的 HUVECs 细胞衰老有关。

参考文献

- CASELLA G, MUNK R, KIM K M, et al. Transcriptome signature of cellular senescence [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(14): 7294-7305.
- HERNANDEZ-SEGURA A, NEHME J, DEMARIA M. Hallmarks of cellular senescence [J]. *Trends Cell Biol*, 2018, 28(6): 436-453.
- ZHENG Z D, WANG M, CHENG C L, et al. Ginsenoside Rb1 reduces H₂O₂-induced HUVEC dysfunction by stimulating the sirtuin-1/AMP-activated protein kinase pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 247-256.
- 毛敬洁, 王宏, 蔡晶, 等. 康欣胶囊对血管性痴呆患者脑血流灌注的影响[J]. *福建中医药大学学报*, 2010, 20(6): 23-25.
- 蔡晶, 杜建, 黄俊山, 等. 康欣胶囊对血管性痴呆影响的临床观察[J]. *中国老年学杂志*, 2003, 23(8): 482-484.
- RUAN Y J, WU S Z, ZHANG L, et al. Retarding the senescence

- of human vascular endothelial cells induced by hydrogen peroxide: effects of 17 β -estradiol (E_2) mediated mitochondria protection [J]. *Biogerontology*, 2014, 15(4): 367-375.
- [7] 张晗. 基于网络药理学、分子对接与实验验证探讨七宝美髯丹延缓皮肤光老化的机制研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021: 21.
- [8] 杨茹, 金强, 徐颖, 等. 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[J]. *药物评价研究*, 2023, 46(10): 2104-2115.
- [9] CHEN H I, HU W S, HUNG M Y, et al. Protective effects of luteolin against oxidative stress and mitochondrial dysfunction in endothelial cells [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2020, 30(6): 1032-1043.
- [10] LI Y, DANG Q Y, LI Z Y, et al. Restoration of mitochondrial function is essential in the endothelium-dependent vasodilation induced by acacetin in hypertensive rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11350.
- [11] LIN R H, LIU L L, SILVA M, et al. Hederagenin protects PC12 cells against corticosterone-induced injury by the activation of the PI3K/AKT pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 712876.
- [12] CHI B Q, LIANG X L, WANG L H, et al. Component characterization, *in vitro* activities and molecular mechanism of *Cydonia oblonga* mill. against diabetic [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(12): 1566.
- [13] GUO S S, TANG Q W, GAO X J, et al. EZH2 inhibition induces senescence via ERK1/2 signaling pathway in multiple myeloma [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2024, 56(7): 1055-1064.
- [14] RIZWAN H, PAL S, SABNAM S, et al. High glucose augments ROS generation regulates mitochondrial dysfunction and apoptosis via stress signalling cascades in keratinocytes [J]. *Life Sci*, 2020, 241: 117148.
- [15] BU L L, YUAN H H, XIE L L, et al. New dawn for atherosclerosis: vascular endothelial cell senescence and death [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(20): 15160.
- [16] 沈双宏, 魏开建, 蔡晶, 等. 杜建教授治疗血管性痴呆的临床经验[J]. *福建中医药*, 2011, 42(6): 26-28.
- [17] GENDRISCH F, ESSER P R, SCHEMPP C M, et al. Luteolin as a modulator of skin aging and inflammation [J]. *Biofactors*, 2021, 47(2): 170-180.
- [18] WU A G, ZENG W, WONG V K, et al. Hederagenin and α -hederin promote degradation of proteins in neurodegenerative diseases and improve motor deficits in MPTP-mice [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 25-44.
- [19] HONG Y X, WU W Y, SONG F, et al. Cardiac senescence is alleviated by the natural flavone acacetin via enhancing mitophagy [J]. *Aging*, 2021, 13(12): 16381-16403.
- [20] PARK C, CHA H J, CHOI E O, et al. Isorhamnetin induces cell cycle arrest and apoptosis via reactive oxygen species-mediated AMP-activated protein kinase signaling pathway activation in human bladder cancer cells [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1494.
- [21] ZOU J R, LEI T T, GUO P, et al. Mechanisms shaping the role of ERK1/2 in cellular senescence (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 759-770.
- [22] GULEN M F, SAMSON N, KELLER A, et al. cGAS-STING drives ageing-related inflammation and neurodegeneration [J]. *Nature*, 2023, 620(7973): 374-380.
- [23] HAJ M, FREY Y, LEVON A, et al. The cGAS-STING, p38 MAPK, and p53 pathways link genome instability to accelerated cellular senescence in ATM-deficient murine lung fibroblasts [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2025, 122(2): e2419196122.
- [24] MANZOOR M F, AHMAD N, AHMED Z, et al. Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives [J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(9): e12974.
- [25] LIM S H, JUNG S K, BYUN S, et al. Luteolin suppresses UVB-induced photoageing by targeting JNK1 and p90 RSK2 [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17(5): 672-680.
- [26] PAWGE G, KHATIK G L. p53 regulated senescence mechanism and role of its modulators in age-related disorders [J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 190: 114651.