

基于网络药理学探讨六味地黄丸延缓衰老的活性成分与作用机制

杨华杰^{1,2}, 谢媛媛³, 魏惠珍^{1,2}, 吕 尚^{1,2}, 金浩鑫², 饶 毅^{1,2*}

(1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330000; 2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330000; 3. 广东药科大学, 广东 广州 510000)

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨六味地黄丸延缓衰老的活性成分与作用机制。**方法** 通过 TCMSP 平台获取六味地黄丸的活性成分及作用靶点, GeneCards、OMIM 数据库获取衰老相关靶点, Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点-疾病”网络, DAVID 数据库进行 KEGG 通路富集分析。采用 D-半乳糖法建立小鼠急性衰老模型, ELISA 法检测血清 SOD、GSH-Px 活性、MDA 水平和血清、脑组织、肾组织中 IL-1 β 、TNF- α 水平, 实时荧光定量法检测端粒长度, 免疫组化法检测 NF- κ B p65 在脑组织中的表达。**结果** 六味地黄丸含 193 种潜在活性成分, 作用于 481 个靶点, 与衰老相关靶点重合者有 431 个, KEGG 通路有 181 条。与模型组比较, 六味地黄丸高剂量组小鼠血清 SOD、GSH-Px 活性增强 ($P<0.05$), MDA 水平降低 ($P<0.05$), 端粒长度增加 ($P<0.05$), 血清、脑组织和肾组织 TNF- α 、IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$), 而六味地黄丸中、高剂量组脑组织 NF- κ B p65 表达降低 ($P<0.05$), 并从细胞质中游离至核内。**结论** 六味地黄丸可能通过增强抗氧化和自由基清除能力, 减少端粒 DNA 损伤, 降低端粒变短效应, 减缓老化细胞的积累, 干预促炎因子表达和 NF- κ B p65 入核, 影响 NF- κ B 信号通路激活, 最终发挥延缓衰老的作用。

关键词: 六味地黄丸; 衰老; 活性成分; 作用机制; NF- κ B; 网络药理学

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2341-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.051

中医认为, 随着年龄生长, 肾气不足, 进而导致后天之本的脾胃功能虚弱, 气血化生不足, 脏腑失于滋养, 进一步加剧衰老^[1]; 西医认为, 在机体衰老过程中固有免疫和获得性免疫功能改变, 机体中的促炎因子如白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等水平升高, 会引起机体的低度炎症状态^[2], 机体长期处于这种慢性促炎性反应升高的状态被称为炎症衰老^[3], 并且机体内炎症水平高低被视为决定机体衰老速率及寿命的关键因素^[4]。Fuente等^[5]报道, 由自由基堆积诱发的氧化应激反应可引起机体内源性损伤相关分子模式的产生及细胞因子的释放, 过量产生的自由基可作用于细胞膜, 造成蛋白质结构及功能损伤、DNA 突变等, 最终引起衰老和死亡。同时, 衰老会引起自由基代谢稳态失衡, 并伴随炎症稳态失衡, 而炎症又可导致衰老, 自由基-炎症-衰老构成了关系错综复杂的恶性循环^[6]。

六味地黄丸来源于《小儿药证直诀》, 是治疗肾阴亏损的主要中药方剂, 临床应用历史有上千年^[7-8], 具有抗炎、降血糖、抗氧化、增强免疫功能、延缓衰老、防癌抗

癌等作用^[9-10], 疗效显著, 安全性高。本研究采用网络药理学^[11], 对六味地黄丸活性成分、治疗靶点、信号通路加以预测, 探讨其作用机制, 并通过动物实验进行验证。

1 材料

1.1 动物 SFP 级昆明小鼠共 60 只, 体质量 18~22 g, 由江西中医药大学实验动物科技中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK(赣) 2018-0003。

1.2 仪器 酶标仪、洗板机(美国 Thermo 公司); 吉尔森 P 型移液器(法国 Gilson 公司); ABI-7300 型 PCR 仪(美国 ABI 公司); PRO200 型电动匀浆机(上海弗鲁克科技发展有限公司); CX-41 型正置显微镜(日本 Olympus 公司); SQ2125 石蜡切片机、PPTHK-21B 摊片机(湖北徠克医疗仪器有限公司)。

1.3 试剂与药物 六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号 18032121)。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、TNF- α 、IL-1 β 、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(江苏酶免实业有限公司, 批号 2010R); SYBR Green PCR 试剂盒(美国 Thermo 公司, 批

收稿日期: 2021-03-25

基金项目: 江西省中医药管理局重点学科项目(1242000404); 江西省卫生健康委员会科技计划项目(202211437); 江西中医药大学博士科研启动基金(2021BSZR021); 江西中医药大学校级研究生创新专项(JZYC18B01)

作者简介: 杨华杰(1992—), 女, 博士, 讲师, 从事中药质量控制研究。Tel: (0791) 87119625, E-mail: 478041633@qq.com

***通信作者:** 饶 毅(1965—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药质量控制研究。Tel: (0791) 87119609, E-mail: raoyi99@126.com

网络出版日期: 2022-02-16

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20220216.1341.002.html>

号 K0223); DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司, 批号 DP304]; 增强型 DAB 显色试剂盒 (×20)、D-半乳糖、苏木素、中性树脂 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 DA1015、420K053、H8070、G8590); 石蜡、甲醛、二甲苯、无水乙醇、30% H₂O₂ (国药集团化学试剂有限公司, 批号 69018961、10010018、10023418、10092680、10011218)。

2 方法

2.1 潜在活性成分筛选及作用靶点预测 采用中药系统药理学分析平台数据库 (TCMSP, <https://tcmspw.com/tcmsp.php>), 并结合相关文献收集六味地黄丸全部成分。以口服生物利用度 (OB) ≥15%、类药性 (DL) ≥0.1 为筛选条件, 检索具有潜在生物活性的成分和对应靶点。

2.2 衰老相关靶点收集 以 “senile” “old” “feeble” “caducity” “senescence” “decrepit” 为检索词, 采用 GeneCards、OMIM 数据库进行检索, 将结果合并, 去除重复后得到衰老相关靶点。再将 “2.1” 项下活性成分作用靶点与上述衰老相关靶点合并, 取交集, 绘制韦恩图。

2.3 药物-活性成分-靶点-疾病网络构建 采用 Cytoscape 3.5.1 软件构建药物-活性成分-靶点-疾病互相作用网络。

2.4 KEGG 通路富集分析 采用 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>), 对交集靶点进行 KEGG 通路富集分析。

2.5 分组、造模与给药 60 只小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为正常组, 模型组, 阳性组, 六味地黄丸低、中、高剂量组, 每组 10 只, 除正常组外, 其余各组小鼠每天腹腔注射 D-半乳糖生理盐水溶液 200 mg/kg, 连续 8 周, 以制备急性衰老模型。同时, 阳性组小鼠每天灌胃给予 45.5 mg/kg 维生素 E 溶液, 六味地黄丸低、中、高剂量组小鼠每天灌胃给予 0.78、1.56、3.12 g/kg 相应药液, 模型组、正常组小鼠灌胃给予等体积生理盐水。

2.6 抗氧化能力指标及促炎细胞因子水平检测 按照

ELISA 试剂盒说明书检测小鼠血清过氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性和丙二醛 (MDA) 水平, 以及血清、脑组织、肾组织中 TNF-α、IL-1β 水平。

2.7 实时荧光定量 PCR 法检测端粒长度 采用 DNA 提取试剂盒提取小鼠脑组织 DNA, 按 SYBR Green PCR 试剂盒操作说明进行扩增, 总反应体系为 25 μL。反应条件为 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min, 共 40 个循环; 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 15 s, 引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成, 以 *Tel-1* 为参照, 正向 5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGCTGAGGGT-3', 反向 5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'; 以 *AT1* 为参照, 正向 5'-ACGTGTCTCAGCATCGACCGCTACC-3', 反向 5'-AGAATGATAAGGAAAGGGAACAAGAAGCCC-3', 具体操作按照荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行, 反应条件为 95 ℃ 预变性 10 min; 60 ℃ 扩增 15 s 40 个循环, 采用 2^{-ΔΔCT} 方法进行处理分析。

2.8 免疫组化法检测 NF-κB p65 表达 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇置换二甲苯至水, 抗原修复 20 min, PBS 洗 3 次, 每次 3 min, 3% H₂O₂ 孵育 10 min, 羊血清封闭 30 min, 一抗在 4 ℃ 下孵育过夜, 二抗在 37 ℃ 下孵育 60 min, DAB 显色, 苏木精复染, 0.1% 盐酸乙醇分化, 在显微镜下观察以控制染色程度, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

2.9 统计学分析 通过 SPSS 18.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方法分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 六味地黄丸潜在活性成分及作用靶点筛选 在 TCMSP 数据库中收集六味地黄丸化学成分 508 种, 以 OB≥15%、DL≥0.1 为筛选条件, 得到 193 种潜在活性成分, 见表 1, 可知作用靶点共 4 221 个, 去除重复后最终得到 481 个。另外, 课题组前期还发现了 42 种潜在活性成分, 见表 2。

表 1 TCMSP 数据库中潜在活性成分

编号	名称	编号	名称	编号	名称
MOL005494	6-十四烷磺酸丁酯	MOL000846	sulfoorientalol C	MOL000296	常春藤皂苷元
MOL000322	kadsurenone	MOL000847	sulfoorientalol D	MOL005508	glucosol
MOL005464	(3S, 4aS, 4bS, 8R, 8aS, 10aR)-3-hydroxy-1, 1, 4a, 8-tetramethyl-7-vinyl-3, 4, 4b, 8, 8a, 9, 10, 10a-octahydrophenanthrene-2, 5-dione	MOL000844	sulfoorientalol A	MOL001996	桦木酮酸
MOL000827	(1S, 3aR, 4R, 8aS)-7-isopropyl-1, 4-dimethyl-2, 3, 3a, 5, 6, 8a-hexahydroazulene-1, 4-diol	MOL007366	galloyl-oxypaeoniflorin	MOL007003	苯甲酰芍药苷
MOL000310	denudatin B	MOL000570	nonox D	MOL001600	可巴烯
MOL000676	邻苯二甲酸二丁酯	MOL005495	6-ethyl-2, 5-dihydroxy-1, 4-naphthoquinone	MOL001739	十六碳烯酸
MOL000449	豆甾醇	MOL005489	3, 6-digalloylglucose	MOL005486	3, 4-dehydrolycopen-16-al
MOL001771	poriferast-5-en-3β-ol	MOL005514	ethyl, α-hydroxymyristate	MOL005458	黄山药皂苷 C
MOL000359	谷甾醇	MOL003708	焦地黄素 D	MOL005477	二十碳烯
MOL000511	乌索酸	MOL003733	6-O-vanilloylajugol	MOL000289	茯苓酸
MOL000276	7, 9(11)-dehydropachymic acid	MOL000840	orientalolf	MOL005500	亚麻酸
MOL002373	gamma-tocopherol	MOL005501	green oil	MOL005476	docosene
MOL005463	甲基升麻苷	MOL001495	亚麻酸乙酯	MOL001709	methyl (2E, 4E)-hexadeca-2, 4-dienoate

续表 1

编号	名称	编号	名称	编号	名称
MOL000971	棕榈酸乙酯	MOL000852	16 β -hydroxyalisol B monoacetate	MOL000831	alisol B monoacetate
MOL003137	leucanthoside	MOL000849	16 β -methoxyalisol B monoacetate	MOL000856	泽泻醇 C-23-醋酸酯
MOL008457	tetrahydroalstonine	MOL000675	油酸	MOL000284	<i>L</i> -uridine
MOL001816	amide HPL	MOL000879	棕榈酸甲酯	MOL000280	(2 <i>R</i>)-2-[(3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid
MOL005490	4-(4-ethylphenyl)benzoic acid	MOL003717	methyl palmitoleate	MOL001889	methyl linolelaidate
MOL000131	EIC	MOL005430	hancinone C	MOL007382	mudanpioside-h _{qt} 2
MOL001559	茛菪明宁碱	MOL003731	rehmaglutin A	MOL002464	1-monolinolein
MOL005478	11,14-octadecadienoic acid, methyl ester	MOL003788	cinnamein	MOL000749	亚油酸
MOL005545	美山茛菪素	MOL005428	(24 <i>S</i>)-beta-methyl cholestanol	MOL007369	4- <i>O</i> -methylpaeoniflorin _{qt}
MOL001494	甘露醇	MOL005535	维生素 B1	MOL007368	4- <i>O</i> -methylpaeoniflorin
MOL003689	野菰酸	MOL000554	gallic acid-3- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -galloyl)-glucoside	MOL005431	crotopoxide
MOL003690	益母草苷	MOL007376	β -sitosterol- β -d-glucoside _{qt}	MOL007367	芍药糖苷
MOL005443	山药素 I	MOL000287	3 β -hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	MOL005530	羟基芜花素
MOL000546	薯蓣皂苷元	MOL005436	24-methylcholesta-5,7,22-trien-ebelta-ol	MOL000828	泽泻醇 A
MOL000297	茯苓酸	MOL007371	6- <i>O</i> -vanillyloxypaeoniflorin	MOL003716	melittoside
MOL000263	齐墩果酸	MOL005481	2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene	MOL000853	泽泻醇 B
MOL002879	diop	MOL000285	(2 <i>R</i>)-2-[(5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropyl-hex-5-enoic acid	MOL000492	(+)-catechin
MOL005438	campesterol	MOL001681	methyl (1 <i>R</i> ,4 <i>aS</i> ,6 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,7 <i>aS</i>)-1,6-dihydroxy-7-methyl-1,4 <i>a</i> ,5,6,7,7 <i>a</i> -hexahydrocyclopenta[<i>d</i>]pyran-4-carboxylate	MOL000294	poricoic acid DM
MOL000357	西托糖苷	MOL003712	methyl (1 <i>S</i> ,4 <i>aS</i> ,7 <i>aS</i>)-7-methylene-1-[(2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>R</i>)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl]oxymethyl]tetrahydropyran-2-yl oxy-4 <i>a</i> ,5,6,7 <i>a</i> -tetrahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>d</i>]pyran-4-carboxylate	MOL000293	poricoic acid D
MOL007375	β -sitosterol- β - <i>D</i> -glucoside	MOL005536	<i>Z</i> , <i>Z</i> -10,12-hexadecadien-1-ol acetate	MOL005455	(-)-脱落酸
MOL000295	alexandrin	MOL005552	gemin D	MOL005497	7,8-dehydropenstemoside _{qt}
MOL001551	桦木醇	MOL000825	(1 <i>R</i> ,3 <i>aR</i> ,4 <i>S</i> ,7 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,8 <i>aS</i>)-7-isopropyl-1,4-dimethyl-3,3 <i>a</i> ,5,6,8,8 <i>a</i> -hexahydro-2 <i>H</i> -azulene-1,4,7,8-tetrol	MOL003703	glutinoside
MOL005461	皮黄素	MOL000826	(1 <i>R</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>S</i> ,8 <i>aR</i>)-7-(2-hydroxypropan-2-yl)-1,4-dimethyl-2,3,3 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -hexahydroazulene-1,4-diol	MOL000291	poricoic acid B
MOL005360	malkangunin	MOL003484	PEY	MOL000290	poricoic acid A
MOL005559	山植酸	MOL000057	邻苯二甲酸二异丁酯	MOL003709	焦地黄素 E
MOL002307	20-hexadecanoylingenol	MOL000358	β -谷甾醇	MOL003719	methyl-2,6,10-trimethyltridecanoate
MOL005090	氧化芍药苷	MOL003730	地黄苷 A	MOL003706	焦地黄素 B
MOL005272	13-tetradecenyl acetate	MOL005450	胆甾烷醇	MOL003705	焦地黄素 A
MOL005386	vulgarin	MOL005465	AIDS180907	MOL003940	硬脂酸酰胺
MOL000854	泽泻醇 C	MOL005537	<i>Z</i> -5-Nonadecene	MOL000399	docosanoate
MOL001398	亚麻酸甲酯	MOL005567	维生素 A	MOL001403	芥酸酰胺
MOL000274	3 β -hydroxylanosta-7,9(11),24-trien-21-oic acid	MOL000300	去氢齿孔酸乙酯	MOL005511	<i>D</i> -delta-tocopherol

续表 1

编号	名称	编号	名称	编号	名称
MOL005557	lanosta-8,24-dien-3-ol,3-acetate	MOL000095	delta 7-stigmastenol	MOL000098	槲皮素
MOL000858	甘油棕榈酸酯	MOL003546	马兜铃酮	MOL003732	rehmaglutin D
MOL000832	23-乙酰泽泻醇 B	MOL000628	darutoside	MOL003721	rehmaglutin B
MOL000862	[(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl]acetate	MOL000953	CLR	MOL002883	ethyl oleate (NF)
MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3β-ol	MOL005446	batatasin IV	MOL001736	(-)-taxifolin
MOL003702	京尼平苷	MOL000860	硬脂酸	MOL005503	cornudentanone
MOL000275	氢化松苓酸	MOL000069	棕榈酸	MOL005429	山蒯醇
MOL002820	梓醇	MOL005472	1,2-benzenedicarboxylic acid, mono (2-ethyl) hexylester	MOL001746	ELD
MOL005553	2-棕榈酸单甘油酯	MOL000422	山柰酚	MOL007364	丹皮酚新苷
MOL001925	芍药苷	MOL000472	大黄素	MOL005467	epicatechin gallate
MOL005485	3-dibenzofuransulfonic acid	MOL002343	汉防己甲素	MOL005460	ophipogonin D
MOL005432	ABK	MOL000279	cerevisterol	MOL007374	5-[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene barbituric acid
MOL007384	paeonidanin	MOL005538	亚麻醇	MOL000851	泽泻醇 A 酯
MOL007383	paeonidanin	MOL000012	花生酸	MOL005435	24-methylcholest-5-en-yl-3beta-O-glucopyranoside
MOL000283	麦角甾醇过氧化物	MOL001501	十七烷酸	MOL005434	24-methylcholest-5-en-yl-3beta-O-glucopyranoside
MOL000829	乙酰泽泻醇 A 酯	MOL005440	豆甾醇	MOL003718	6-O-p-coumaroylajugol
MOL003166	獐牙菜苦苷	MOL005515	丁香酮	MOL003697	methyl 9,10-methylene-hexadecanoate
MOL002442	cholesteryl ferulate	MOL005531	telocinobufagin	MOL000273	(2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid
MOL005512	dehydromorroniaglycone	MOL000211	mairin	MOL000839	rel-(1R,3aS,4S,7S,8R,8aS)-7-isopropyl-1,4-dimethyldecahydro-4,7-epoxyazulene-1,8-diol
MOL000292	茯苓新酸 C				

表 2 课题组前期发现的潜在活性成分

名称	文献	名称	文献	名称	文献
奎宁酸	[12]	异地黄苷	[25]	山茱萸新苷	[39]
ethyl gallate	[13]	梓苷	[26]	莫诺苷	[40]
柠檬酸	[14]	地黄苷	[27]	suffruticoside C	[41]
咖啡酸	[15]	diosgenin-3-O-β-D-glucopyranoside	[28]	地黄苷 D	[42]
没食子酸甲酯	[16]	马钱苷	[29]	purpureaside C	[43]
异柠檬酸	[17]	乙酰梓醇	[30]	mudanpioside E	[44]
没食子酸	[16]	梓醇	[31]	牡丹皮苷 C	[36]
芍药苷	[18]	獐牙菜苷	[32]	mudanoside B	[45]
原儿茶酸	[19]	马钱苷酸	[33]	gardoside	[46]
壬二酸	[20]	表番木鳖酸	[34]	decaffeoylverbascoside	[47]
甘露醇	[21]	桃叶珊瑚苷	[35]	苯甲酰氧化芍药苷	[36]
5-羟甲基糠醛	[22]	没食子酰芍药苷	[36]	泽泻醇 F	[48]
琥珀酸	[23]	五没食子酰葡萄糖	[37]	11-去氧泽泻醇 B	[49]
马来酸	[24]	毛蕊花糖苷	[38]	1,2,3,6-tetrakis-O-galloyl-β-D-glucose	[50]

3.2 衰老相关靶点 在 GeneCards、OMIM 数据库中共收集疾病靶点 12 725 个, 去除重复后有 8 780 个, 将其与“3.1”项下潜在活性成分的作用靶点合并, 取交集, 得到交集靶点 431 个, 见图 1。

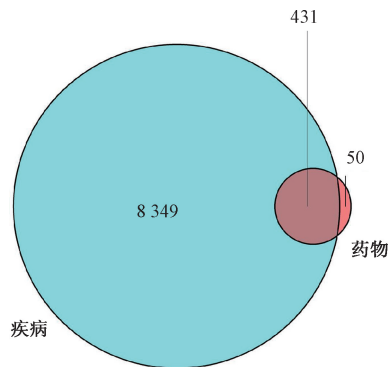
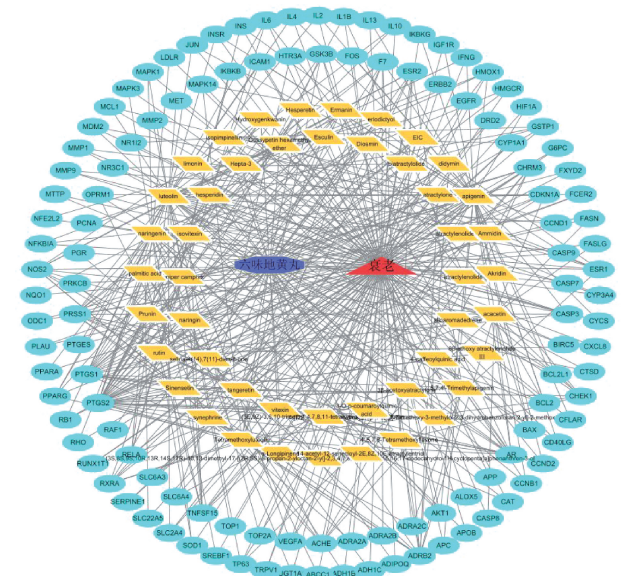


图 1 药物-疾病交集靶点韦恩图

3.3 药物-活性成分-疾病-靶点互作网络 由图 2 可知, 六味地黄丸延缓衰老的作用是通过组方药材所含熊果酸、丹皮酚、牡丹皮苷 C、mudanoside B、亚麻油酸、山柰酚、decaffeoylverbascoside 等 47 种潜在活性成分协同发挥所致。



注: 六边形为六味地黄丸, 平行四边形为潜在活性成分, 三角形为疾病, 椭圆形为潜在活性成分的作用靶点映射到疾病的靶点。

图 2 药物-活性成分-疾病-靶点互作网络图

3.4 KEGG 通路分析 共得到 181 条 KEGG 通路, 对 P 值排名前 20 者进行可视化分析, 结果见图 3, 可知主要富集于癌症信号通路和炎症信号通路。在癌症发展早期阶段, 细胞增殖的异常激活导致支持正常细胞 DNA 复制的核苷酸缺乏, 最终造成 DNA 损伤^[51], 之后又会启动核因子 (NF)- κ B 信号通路, 引起促炎介质的基因表达增加, 而六味地黄丸可能通过作用于癌症及炎症相关作用通路来发挥延缓衰老的作用。

3.5 六味地黄丸对小鼠血清 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平的影响 与正常组比较, 模型组小鼠血清 SOD、GSH-Px 活性降低 ($P<0.05$), MDA 水平升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 六味地黄丸中剂量组小鼠血清 SOD 活性升高 ($P<0.01$); 六味地黄丸高剂量组小鼠血清 MDA 水平降低 ($P<0.05$), SOD、GSH-Px 活性升高 ($P<0.01$); 阳性组小鼠血清 SOD 活性升高 ($P<0.01$), MDA 水平降低 ($P<0.01$), 见表 3。

3.6 六味地黄丸对小鼠脑组织端粒长度的影响 与正常组比较, 模型组小鼠脑组织端粒长度缩短 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸高剂量组小鼠脑组织端粒长度增加 ($P<0.01$), 见表 4。

3.7 六味地黄丸对小鼠血清、脑组织、肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠血清、脑组织、肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸中、高剂量组及阳性组小鼠血清、脑组织、肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 5~6。

3.8 六味地黄丸对小鼠脑组织 NF- κ B p65 表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠脑组织 NF- κ B p65 表达升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 六味地黄丸中、高剂量组及阳性组小鼠脑组织 NF- κ B p65 表达降低 ($P<0.01$), 见图 4、表 7。

4 讨论

网络药理学研究结果表明, 熊果酸、丹皮酚、牡丹皮苷 C 等 47 种成分为延缓衰老的潜在活性成分。熊果酸可以通过上调老年大鼠白色脂肪组织 (eWAT) 中的 p-Akt、p-Akt 与 Akt 的比值、总蛋白和细胞膜上 GLUT4 的表达, 从而抑制 NF- κ B 和促炎细胞因子 (IL-6、IL-1 β) 的表达, 发挥改善老年大鼠脂肪组织胰岛素抵抗的作用^[52]。丹皮酚可通过调节抗氧化 Nrf2 通路, 以及抗衰老 p16/Id-1 和 p53/

表 3 六味地黄丸对小鼠血清 SOD、GSH-Px 活性及 MDA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	SOD/($U\cdot L^{-1}$)	MDA/($nmol\cdot L^{-1}$)	GSH-Px/($U\cdot mL^{-1}$)
正常组	267.512 $\pm$ 14.273	4.447 $\pm$ 38.644	286.022 $\pm$ 15.202
模型组	148.966 $\pm$ 24.483 $\Delta\Delta$	8.212 $\pm$ 24.465 $\Delta\Delta$	156.732 $\pm$ 27.832 $\Delta\Delta$
阳性组	234.757 $\pm$ 22.957**	5.823 $\pm$ 33.637**	199.497 $\pm$ 15.479
六味地黄丸低剂量组	110.123 $\pm$ 40.315	8.161 $\pm$ 20.072	163.326 $\pm$ 22.056
六味地黄丸中剂量组	210.022 $\pm$ 17.294**	7.002 $\pm$ 21.209	191.340 $\pm$ 25.896
六味地黄丸高剂量组	220.154 $\pm$ 21.737**	5.457 $\pm$ 13.277*	247.958 $\pm$ 21.681**

注: 与正常组比较, $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

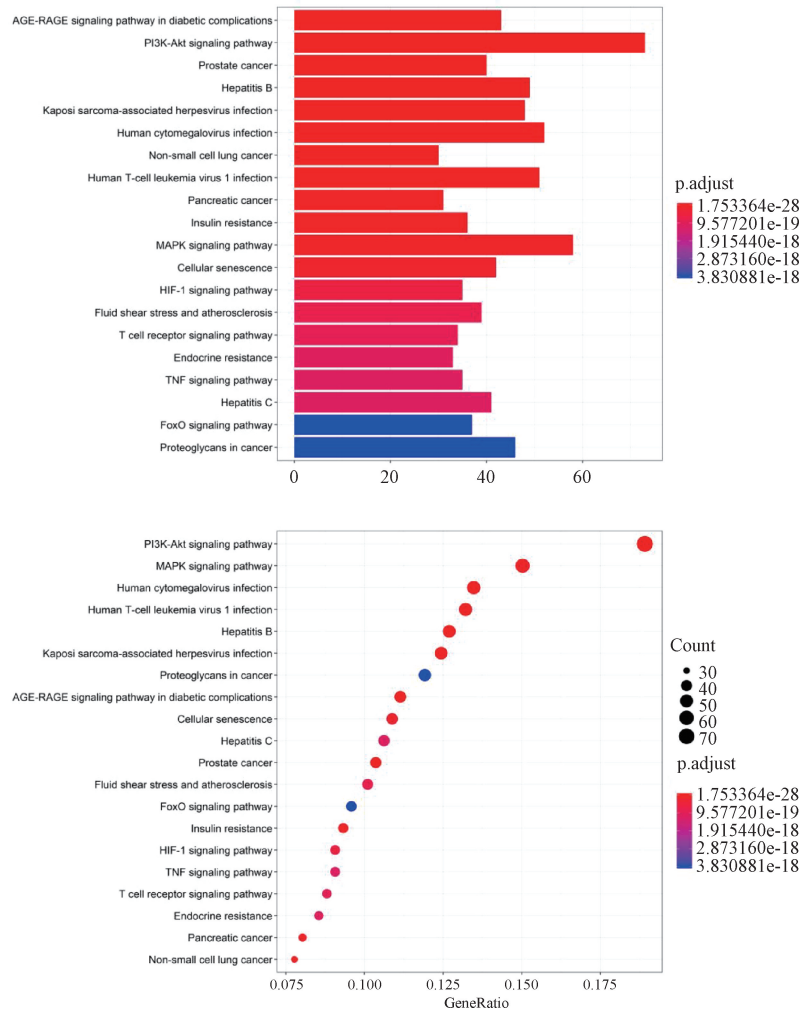


图 3 KEGG 富集分析

表 4 六味地黄丸对小鼠脑组织端粒长度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	端粒长度 (T/S 值)
正常组	2.10 ± 0.64
模型组	0.31 ± 0.71 ^{△△}
阳性组	0.53 ± 0.10
六味地黄丸低剂量组	0.64 ± 0.71
六味地黄丸中剂量组	1.13 ± 0.85
六味地黄丸高剂量组	2.10 ± 0.65 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$ 。
p21 通路来逆转 H_2O_2 诱导的人肺胚成纤维细胞 MRC-5 细胞氧化和衰老, 表明丹皮酚具有较强的抗衰老作用^[53]。此

外, 山柰酚可以下调 ROS/FoxO 信号途径的表达, 引起后者转录抗氧化基因和 DNA 损伤修复基因水平降低, 从而保护骨髓间充质干细胞免受氧化应激诱导的凋亡^[54]。

KEGG 通路分析结果显示, 六味地黄丸活性成分作用靶点主要富集在 MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路以及 NF- κ B 信号通路, 其中 MAPK 和 PI3K 通路的差异性最为显著, 且已有文献报道六味地黄丸可作用于以上 2 条通路^[55-60]。本研究选择作为 MAPK 和 PI3K 信号通路下游的 NF- κ B 通路^[61-62]进行实验验证, 结果表明六味地黄丸可通过干预小鼠 NF- κ B p65 入核, 从而影响 NF- κ B 信号通路的激活。

表 5 六味地黄丸对小鼠血清、脑组织、肾组织 TNF- α 表达的影响 (ng/L, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	血清	脑组织	肾组织
正常组	457.133 ± 28.571	384.458 ± 33.924	83.540 ± 16.049
模型组	972.797 ± 26.617 ^{△△}	1 021.482 ± 23.056 ^{△△}	191.318 ± 38.050 ^{△△}
阳性组	663.269 ± 32.584 ^{**}	541.193 ± 15.576 ^{**}	111.963 ± 27.860 ^{**}
六味地黄丸低剂量组	892.787 ± 24.167	959.522 ± 15.688	176.566 ± 16.171
六味地黄丸中剂量组	733.183 ± 30.816 [*]	822.829 ± 20.694 ^{**}	148.873 ± 20.395 ^{**}
六味地黄丸高剂量组	711.717 ± 25.820 [*]	630.121 ± 20.879 ^{**}	136.783 ± 27.532 ^{**}

注: 与正常组比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

表 6 六味地黄丸对小鼠血清、脑组织、肾组织 IL-1 β 表达的影响 (ng/L, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	血清	脑组织	肾组织
正常组	93.512 $\pm$ 38.009	350.867 $\pm$ 33.311	57.263 $\pm$ 37.145
模型组	196.328 $\pm$ 22.659 $\Delta\Delta$	931.346 $\pm$ 16.579 $\Delta\Delta$	188.080 $\pm$ 24.276 $\Delta\Delta$
阳性组	116.893 $\pm$ 31.243 ^{**}	454.142 $\pm$ 20.185 ^{**}	78.144 $\pm$ 32.359 ^{**}
六味地黄丸低剂量组	165.635 $\pm$ 23.965	842.980 $\pm$ 22.316	164.038 $\pm$ 21.011
六味地黄丸中剂量组	142.126 $\pm$ 41.685 ^{**}	822.755 $\pm$ 17.857	158.876 $\pm$ 18.260 [*]
六味地黄丸高剂量组	121.634 $\pm$ 34.035 ^{**}	602.175 $\pm$ 27.473 ^{**}	106.929 $\pm$ 23.400 ^{**}

注:与正常组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

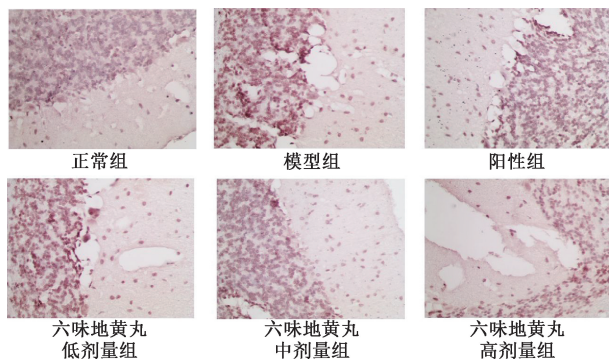


图 4 各组小鼠脑组织 NF- κ B p65 表达 ($\times 200$)

表 7 六味地黄丸对小鼠脑组织 NF- κ B p65 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	NF- κ B p65
正常组	6 422.35 $\pm$ 0.16
模型组	13 159.27 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$
阳性组	8 768.73 $\pm$ 0.07 ^{**}
六味地黄丸低剂量组	12 170.50 $\pm$ 0.09
六味地黄丸中剂量组	10 648.33 $\pm$ 0.11 ^{**}
六味地黄丸高剂量组	9 719.21 $\pm$ 0.10 ^{**}

注:与正常组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。

衰老的自由基学说认为随着人体衰老,机体内自由基与自由基清除系统的平衡遭到破坏,最终导致细胞功能严重受损以至衰老、死亡,因而增强机体抗氧化能力,加强自由基的清除,可有效延缓细胞衰老^[63]。体内自由基攻击,造成的端粒 DNA 损伤和基因组不稳定会加速细胞衰老^[64]。本研究结果表明,与正常组比较,模型组小鼠氧自由基清除能力下降,同时细胞端粒长度缩短,给药后上述现象改善,表明六味地黄丸可能通过增强抗氧化和自由基清除能力从而减少端粒 DNA 损伤,从而发挥延缓衰老的作用。

Jurk 等^[65]发现,转基因小鼠的慢性低度炎症可以诱导早衰,推测是由于因含有氧化化学活性分子造成的 DNA 损伤而导致的端粒变短效应的增强。因此,控制促炎因子间的转录表达与协同作用就显得尤为重要^[66]。TNF- α 和 IL-1 β 作为促炎细胞因子,在生理条件下水平较低,但在慢性炎症性疾病状态下水平就会增加^[67-68]。本研究发现,与正常组比较,模型组小鼠端粒变短效应增强,同时参与慢性炎症反应的促炎因子水平增加,给药后上述现象改善,表明六味地黄丸可能通过抑制端粒变短效应从而减缓老化细胞

积累、干预促炎因子表达和 NF- κ B p65 的入核来影响 NF- κ B 信号通路的激活。

综上所述,六味地黄丸可能通过降低细胞脂质过氧化反应代谢产物以及增强自由基清除能力,从而减少端粒 DNA 损伤、抑制端粒变短效应,进而减缓老化细胞积累、干预促炎因子表达和 NF- κ B p65 的入核来影响 NF- κ B 信号通路的激活,最终发挥延缓衰老的作用。

参考文献:

- [1] Chauhan A, Vera J, Wolkenhauer O. The systems biology of mitochondrial fission and fusion and implications for disease and aging[J]. *Biogerontology*, 2014, 15(1): 1-12.
- [2] Pangrazzi L, Meryk A, Naismith E, et al. "Inflamm-aging" influences immune cell survival factors in human bone marrow[J]. *Eur J Immunol*, 2017, 47(3): 481-492.
- [3] Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, et al. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2000, 908(1): 244-254.
- [4] Martinis M D, Franceschi C, Monti D, et al. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity[J]. *Febs Lett*, 2005, 579(10): 2035-2039.
- [5] Fuente M D L. Immunology of aging[M]. Berlin: Springer, 2014: 3-23.
- [6] 夏世金,孙涛,吴俊珍.自由基、炎症与衰老[J]. *实用老年医学*, 2014, 28(2): 100-103.
- [7] 刘艳,赵桢熠,倪凤燕,等.六味地黄丸产品优质性评价和分析[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(5): 1194-1201.
- [8] 李玲.六味地黄丸(汤)研究新进展[J]. *中国中药杂志*, 1995, 20(5): 310-312.
- [9] 谢宝刚,方修忠,陈颖,等.基于 HPLC-UV 的代谢组学方法对六味地黄丸的抗炎药效评价[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(17): 2635-2638.
- [10] 熊兴江,王阶.经典名方治疗高血压病临床实践[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(5): 929-933.
- [11] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [12] Nadeem M, Mumtaz M W, Danish M, et al. Antidiabetic functionality of *Vitex negundo* L. leaves based on UHPLC-QTOF-MS/MS based bioactives profiling and molecular docking insights[J]. *Ind Crop Prod*, 2020, 152(2020): 112445.
- [13] Santos T R, Feitosa P R, Gualberto N C, et al. Improvement of bioactive compounds content in granadilla (*Passiflora ligularis*) seeds after solid-state fermentation[J]. *Food Sci*

- Technol Int*, 2021, 27(3): 234-241.
- [14] Liu K L, Du R F, Chen F S. Stability of the antioxidant peptide SeMet-Pro-Ser identified from selenized brown rice protein hydrolysates[J]. *Food Chem*, 2020, 319: 126540.
 - [15] Madi Y F, Choucri M A, El-Marasy S A, et al. UPLC-Orbitrap HRMS metabolic profiling of *Cymbopogon citratus* cultivated in Egypt; neuroprotective effect against AlCl₃-induced neurotoxicity in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 259: 112930.
 - [16] Mansouri H, Farhoosh R, Rezaie M. Interfacial performance of gallic acid and methyl gallate accompanied by lecithin in inhibiting bulk phase oil peroxidation[J]. *Food Chem*, 2020, 328: 127128.
 - [17] Koch K, Weldle N, Baier S, et al. *Hibiscus sabdariffa* L. extract prolongs lifespan and protects against amyloid- β toxicity in *Caenorhabditis elegans*: involvement of the FoxO and Nrf2 orthologues DAF-16 and SKN-1 [J]. *Eur J Nutr*, 2020, 59 (1): 137-150.
 - [18] Liu L H, Shi R J, Chen Z C. Paeonol exerts antitumor activity against colorectal cancer cells by inducing G₀/G₁ phase arrest and cell apoptosis via inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(2): 675-684.
 - [19] Li B, Tan J, Zou B S, et al. Exploring the potential effect and mechanisms of protocatechuic acid on human hair follicle melanocytes[J]. *Acta Pharmaceut*, 2020, 70(4): 539-549.
 - [20] Barragán-Zarate G S, Lagunez-Rivera L, Solano R, et al. *Prosthechea karwinskii*, an orchid used as traditional medicine, exerts anti-inflammatory activity and inhibits ROS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253: 112632.
 - [21] Djazet S, Kenfack L, Devi P B, et al. Phenolic profile, antioxidant and enzyme inhibitory activities of underutilized spices from Central Africa [J]. *J Food Sci Tech*, 2021, 58 (3): 1110-1123.
 - [22] Hai G, Jiang Z Q, Wang M Y, et al. 5-Hydroxymethylfurfural from wine-processed *Fructus corni* inhibits hippocampal neuron apoptosis[J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(28): 2605-2614.
 - [23] Purohit A, Mohan A. Antimicrobial effects of pyruvic and succinic acids on *Salmonella* survival in ground chicken [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2019, 116: 108596.
 - [24] Roginski A C, Wajner A, Cecatto C, et al. Disturbance of bioenergetics and calcium homeostasis provoked by metabolites accumulating in propionic acidemia in heart mitochondria of developing rats [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(5): 165682.
 - [25] Khentoul H, Bensouici C, Reyes F, et al. Chemical constituents and HRESI-MS analysis of an Algerian endemic plant-*Verbascum atlanticum* batt. -extracts and their antioxidant activity[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(20): 3008-3012.
 - [26] Lu Q X, Tan S C, Li F Q, et al. Phytochemical composition, isolation and hepatoprotective activity of active fraction from *Veronica ciliata* against acetaminophen-induced acute liver injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 243: 112089.
 - [27] Zhang M Q, Ren X, Yue S J, et al. Simultaneous quantification of four phenylethanoid glycosides in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study of *Acanthus ilicifolius* Herb [J]. *Molecules*, 2019, 24 (17): 3117.
 - [28] He X J, Qiao A M, Wang X L, et al. Structural identification of methyl protodioscin metabolites in rats' urine and their antiproliferative activities against human tumor cell lines [J]. *Steroids*, 2006, 71(9): 828-833.
 - [29] Wen H L, Xing L, Sun K, et al. Loganin attenuates intestinal injury in severely burned rats by regulating the tolllike receptor 4/NF κ B signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 20(1): 591-598.
 - [30] Saracoglu I, Harput U S. In vitro cytotoxic activity and structure activity relationships of iridoid glucosides derived from veronica species[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(1): 148-152.
 - [31] Gao X J, Xu J J, Liu H B. Protective effects of catalpol on mitochondria of hepatocytes in cholestatic liver injury [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 2424-2432.
 - [32] Wu Q C, Tang X Y, Dai Z Q, et al. Sweroside promotes osteoblastic differentiation and mineralization via interaction of membrane estrogen receptor- α and GPR30 mediated p38 signalling pathway on MC3T3-E1 cells [J]. *Phytomedicine*, 2019, 68: 153146.
 - [33] Mariló O V, Noelia S M, José A E, et al. The potential synergistic modulation of AMPK by *Lippia citriodora* compounds as a target in metabolic disorders [J]. *Nutrients*, 2019, 11 (12): 2961.
 - [34] Li W L, Ding J X, Bai J, et al. Research on correlation of compositions with oestrogenic activity of *Cistanche* based on LC/Q-TOF-MS/MS technology [J]. *Open Chem*, 2019, 17(1): 1-12.
 - [35] Wang H, Zhou X M, Wu L Y, et al. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation via Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury [J]. *J Neuroinflamm*, 2020, 17(1): 188.
 - [36] Lu Y J, Liu W J, Zhang M, et al. The screening research of NF- κ B inhibitors from *Moutan Cortex* based on bioactivity-integrated UPLC-Q/TOF-MS [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 6150357.
 - [37] Zhang T B, Lo C Y, Xiao M J, et al. Anti-influenza virus phytochemicals from *Radix Paeoniae Alba* and characterization of their neuraminidase inhibitory activities[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 253: 112671.
 - [38] Khedher M R B, Hafsa J, Haddad M, et al. Inhibition of protein glycation by combined antioxidant and antiglycation constituents from a phenolic fraction of sage (*Salvia officinalis* L.) [J]. *Plant Food Hum Nutr*, 2020, 75(4): 505-511.
 - [39] Wierczewska A, Buchholz T, Melzig M F, et al. In vitro α -amylase and pancreatic lipase inhibitory activity of *Cornus mas* L. and *Cornus alba* L. fruit extracts [J]. *J Food Drug Anal*, 2019, 27(1): 249-258.

- [40] Sun Y, Zhu Y, Liu X Z, *et al.* Morroniside attenuates high glucose-induced BMSC dysfunction by regulating the Glo1/AGE/RAGE axis[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(8): e12866.
- [41] Yoshikawa M, Uchida E, Kawaguchi A, *et al.* Galloyloxy-paeoniflorin, suffruticosides A, B, C, and D, five new antioxidative glycosides, and suffruticoside E, A paeonol glycoside, from Chinese moutan cortex[J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 1992, 40(8): 2248-2250.
- [42] Chen L X, Chen H M, Lu Y, *et al.* Decoding active components in a formulation of multiple herbs for treatment of psoriasis based on three cell lines fishing and liquid chromatography-mass spectrometry analysis [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 186: 113331.
- [43] Sasaki H, Nishimura H, Morota T, *et al.* Immunosuppressive principles of *Rehmannia glutinosa* var. *hueichingensis* [J]. *Planta Med*, 1989, 55(5): 458-462.
- [44] Shi Y H, Zhu S, Tamura T, *et al.* Chemical constituents with anti-allergic activity from the root of *Edulis Superba*, a horticultural cultivar of *Paeonia lactiflora* [J]. *J Nat Med*, 2016, 70(2): 234-240.
- [45] Costa M F, Jesus T I, Lopes B, *et al.* *Eugenia aurata* and *Eugenia punicifolia* HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release [J]. *BMC Complem Altern Med*, 2016, 16(1): 403.
- [46] María C G, Mariló O V, María H L, *et al.* Bioassay-guided purification of *Lippia citriodora* polyphenols with AMPK modulatory activity[J]. *J Funct Foods*, 2018, 46: 514-520.
- [47] Kırmızıbekmez H, Erdoğan M, Kúsz N, *et al.* Secondary metabolites from the aerial parts of *Sideritis germanicopolitana* and their *in vitro* enzyme inhibitory activities[J]. *Nat Prod Res*, 2021, 35(4): 655-658.
- [48] Yeom H D, Kim Y M, Lee S B, *et al.* Effects of triterpenoid alisol F on human 5-hydroxytryptamine 3A and $\alpha 3\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor channel activity [J]. *Mol Cell Toxicol*, 2017, 13(3): 271-278.
- [49] Matsuda H, Kageura T, Toguchida I, *et al.* Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: Absolute stereostructures of alismaketones-B 23-acetate and -C 23-acetate [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9(21): 3081-3086.
- [50] Chalageri G, Dhananjaya S P, Raghavendra P, *et al.* Substituting plant vegetative parts with callus cell extracts: case study with *Woodfordia fruticosa* Kurz. -a potent ingredient in skin care formulations[J]. *S Afr J Bot*, 2019, 123: 351-360.
- [51] Bester A C, Roniger M, Oren Y, *et al.* Nucleotide deficiency promotes genomic instability in early stages of cancer development[J]. *Cell*, 2011, 145(3): 435-446.
- [52] 王同壮. 熊果酸改善老年大鼠脂肪组织胰岛素抵抗的研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
- [53] 杨丽花. 丹皮酚对 MRC-5 细胞的抗衰老和抑制 HaCaT 细胞的 EMT 作用 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [54] 张 胜. 山奈酚通过调控 FoxO 通路抑制氧化应激介导的间充质干细胞凋亡机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2016.
- [55] 郑先波, 徐无忌. 六味地黄丸对兔椎间盘退变模型髓核细胞 p38MAPK 信号级联 JNK 通路的影响 [J]. *中医药导报*, 2017, 23(20): 11-16.
- [56] 徐无忌, 刘思华, 杨 康. 六味地黄丸对椎间盘体外退变模型髓核细胞 MAPK 信号级联的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(12): 1861-1866.
- [57] 刘思华. 六味地黄丸对兔椎间盘体外退变模型间盘细胞 MAPK 信号级联的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [58] 杨铠丞. 六味地黄丸对兔椎间盘退变模型髓核细胞 MAPK 信号级联的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [59] 陶鹏宇. 六味地黄丸通过 PI3k/mTOR/Akt 通路防治糖尿病肾病的研究 [D]. 上海: 上海中医药大学, 2019.
- [60] 邢 瑞. 六味地黄汤对 2 型糖尿病大鼠的干预作用及对 PI3KP110、Akt 蛋白磷酸化水平的影响 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [61] Martínez-Zamudio R I, Robinson L, Roux P F, *et al.* Snapshot: cellular senescence pathways [J]. *Cell*, 2017, 170(4): 816.
- [62] Malemud C J. The PI3K/Akt/PTEN/mTOR pathway: a fruitful target for inducing cell death in rheumatoid arthritis? [J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(9): 1137-1147.
- [63] Imanishi T, Tsujioka H, Akasaka T. Endothelial progenitor cells dysfunction and senescence: contribution to oxidative stress [J]. *Curr Cardiol Rev*, 2008, 4(4): 275-286.
- [64] 景晓杨, 雷 燕, 王 强, 等. 端粒、端粒酶与血管老化的关系 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(7): 893-896.
- [65] Jurk D, Wilson C, Passos J F, *et al.* Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice [J]. *Nat Commun*, 2014, 2: 4172.
- [66] Ruan Q G, Chen Y H. Nuclear factor- κ B in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 946: 207-221.
- [67] Kimya Y, Akdiş C, Cengiz C, *et al.* Plasma interleukin-1 α , interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist levels in pre-eclampsia [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1997, 73(1): 17-21.
- [68] Wang Y J, Che M X, Xin J G, *et al.* The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110660.