

本文引用: 王梦云, 朱明芳, 李文姣, 李鹏宇, 石继连, 梁玲, 刘传义. UHPLC-Orbitrap-MS 联合网络药理学分析杜仲雄花的化学成分及抗衰老作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(9): 1825-1833.

UHPLC-Orbitrap-MS 联合网络药理学分析杜仲雄花的化学成分及抗衰老作用机制

王梦云¹, 朱明芳^{1*}, 李文姣¹, 李鹏宇¹, 石继连², 梁玲², 刘传义³

1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208;

3. 湖南神舟中药饮片有限公司, 湖南 张家界 427200

〔摘要〕 **目的** 采用超高效液相色谱耦合静电轨道阱高分辨质谱(UHPLC-Orbitrap-MS)技术和网络药理学方法探讨杜仲雄花的化学成分及其抗衰老作用机制。**方法** 通过 UHPLC-Orbitrap-MS 鉴定杜仲雄花的主要化学成分, 结合 SwissTargetPrediction 数据库预测其相关靶点; 利用 GeneCards 及 OMIM 数据库获取衰老相关靶点, 与杜仲雄花化学成分靶点取交集, 筛选出共同靶点; 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI), 通过 GO 和 KEGG 富集分析, 筛选杜仲雄花抗衰老的重要信号通路; 通过 ABTS 与 DPPH 自由基清除实验, 评价杜仲雄花抗氧化活性。**结果** 从杜仲雄花中鉴别出 40 个化学成分, 共获得杜仲雄花化学成分与衰老的交集靶点 187 个, PPI 网络得到 159 个节点, 核心成分是槲皮素和柚皮素, 其中槲皮素对 ABTS 和 DPPH 自由基表现出较强的体外清除活性, 核心靶点包括肿瘤蛋白 p53(p53)、信号转导与转录激活因子 3(STAT3)、热激蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(HSP90AA1)、SRC 原癌基因非受体酪氨酸激酶(SRC)、蛋白激酶 B1(Akt1)。GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析结果表明, 杜仲雄花发挥抗衰老作用与磷脂酰肌醇 3-激酶-Akt(PI3K-Akt)信号通路相关。**结论** 杜仲雄花中的化学成分可能通过多通路、多靶点协同调节细胞周期, 减轻氧化应激损伤, 抑制慢性炎症, 维持细胞稳态, 进而发挥延缓细胞衰老、改善机体衰老相关病理生理进程的作用。

〔关键词〕 UHPLC; 杜仲雄花; 抗衰老; 网络药理学; PI3K-Akt

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.09.010

Chemical constituents and anti-aging mechanisms of action of *Eucommia ulmoides* Oliv. male flowers based on UHPLC-Orbitrap-MS and network pharmacology

WANG Mengyun¹, ZHU Mingfang^{1*}, LI Wenjiao¹, LI Pengyu¹, SHI Jilian², LIANG Ling², LIU Chuanyi³

1. The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Shenzhou Chinese Herbal Decoction Pieces Co., Ltd., Zhangjiajie, Hunan 427200, China

〔Abstract〕 **Objective** To explore the chemical constituents and anti-aging mechanisms of action of *Eucommia ulmoides* Oliv. male flowers using ultra-high performance liquid chromatography-orbitrap mass spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS) and network pharmacology. **Methods** The major chemical constituents of *E. ulmoides* male flowers were identified by UHPLC-Orbitrap-MS, and their related targets were predicted using the SwissTargetPrediction database. Aging-related targets were retrieved from the

〔收稿日期〕 2026-05-14

〔基金项目〕 湖南省芙蓉计划卫生健康高层次人才项目(湘卫函[2024]182号); 湖南中医药大学和湖南省中医药民族医药国际联合实验室开放基金项目(2025ZYKF11)。

〔通信作者〕 * 朱明芳, 女, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: 26715858@qq.com。

GeneCards and OMIM databases and intersected with the targets of the identified constituents of *E. ulmoides* male flowers to identify the common targets. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed, and GO and KEGG enrichment analyses were performed to identify key signaling pathways involved in the anti-aging effects of *E. ulmoides* male flowers. The antioxidant activity of *E. ulmoides* male flowers was evaluated by 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging assays. **Results** A total of 40 chemical constituents were identified from *E. ulmoides* male flowers, and 187 common targets were obtained between the chemical constituent-related targets and aging-related targets. The PPI network comprised 159 nodes. The core constituents were quercetin and naringenin, among which quercetin showed strong in vitro scavenging activity against ABTS and DPPH free radicals. The core targets included tumor protein p53 (TP53), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1), SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase (SRC), and Akt serine/threonine kinase 1 (Akt1). GO and KEGG enrichment analyses indicated that the anti-aging effects of *E. ulmoides* male flowers were associated with the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathway. **Conclusion** The chemical constituents in *E. ulmoides* male flowers may exert anti-aging effects by coordinately regulating the cell cycle through multiple pathways and targets, alleviating oxidative stress, inhibiting chronic inflammation, and maintaining cellular homeostasis, thereby delaying cellular senescence and ameliorating aging-related pathophysiological processes.

[**Keywords**] ultra-high performance liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry; *Eucommia ulmoides* Oliv. male flowers; anti-aging; network pharmacology; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B

衰老是机体随着年龄增长,对环境适应能力逐渐下降而趋于死亡的过程。衰老主要表现为随着年龄的增长,在遗传因素、精神因素、环境因素等作用下,机体各组织器官的结构与功能发生退行性变化^[1-2]。衰老作为人体生命周期中自然发生的生理退行性变化,属于非疾病状态,但衰老伴随多系统功能衰退,会显著提升多种慢性疾病的发病风险,如帕金森病、阿尔茨海默病和肌萎缩性侧索硬化症等神经退行性疾病,这些疾病及其并发症是导致老年人死亡的主要原因^[3-4]。随着现代医学与科技的进步,人类平均寿命明显提高,我国人口老龄化态势持续增长,为社会保障体系带来巨大挑战。由此可见,深入开展抗衰老药物研究,对提高老年人生活质量具有重要意义。

杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.)又名思仲、胶木等,为杜仲科杜仲属药食同源类物质,在我国已有两千多年的用药历史^[5-6]。其味甘,性温,归肝、肾经,具有补肝肾、强筋骨、安胎之功效,主治肝肾不足、腰膝酸痛、筋骨无力、头晕目眩、妊娠漏血、胎动不安等^[7]。我国杜仲的栽培面积占全球 99%以上,广泛分布于陕西、甘肃、四川、云南、贵州等地^[8-9]。杜仲被誉为“植物黄金”,其树皮、叶、雄花及种子均具有独特药用价值^[10]。其中,杜仲雄花因其含有丰富的活性成分受到研究者的广泛关注。杜仲雄花花期短暂,采集窗口期短,资源珍贵。杜仲、杜仲叶已被《中华人民共和国药典》收录为正式药材,杜仲雄花于 2014 年纳

入国家卫生健康委员会批准的新食品原料名单,为其在保健食品领域的开发应用提供了法规支持^[11]。

研究表明,杜仲雄花含有多种活性成分,包括黄酮类、环烯醚萜类、苯丙素类等,具有抗氧化、抑菌、抗炎等功效,且安全性良好^[12]。同时,杜仲雄花富含黄酮类与环烯醚萜类化合物,具有抗皮肤光老化、提高皮肤含水量、抗氧化、促进胶原蛋白合成、抗炎等作用^[12-16]。因此,杜仲雄花对皮肤病的抗衰老、抗炎具有潜在应用价值^[17-21]。丁艳霞等^[22]研究表明,从杜仲雄花提取物中分离得到的黄酮类化合物,具有较强的抗氧化活性。另有研究表明,杜仲雄花提取物能显著降低小鼠皮肤组织的丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC),从而改善小鼠皮肤组织光老化现象^[14]。高梦珂等^[23]通过实验发现,杜仲雄花粉总黄酮提取物能够提高实验小鼠主要器官和血清中 SOD 的活性及 T-AOC,减少脂质过氧化物的生成,发挥抗衰老作用。

本研究利用超高效液相色谱耦合静电轨道阱高分辨质谱(ultra-high performance liquid chromatography coupled to electrostatic orbitrap high-resolution mass spectrometry, UHPLC-Orbitrap-MS)技术对杜仲雄花中化学成分进行鉴定,通过网络药理学技术预测杜仲雄花抗衰老的主要有效成分和作用机

制阐释杜仲雄花通过多成分、多途径、多靶点发挥抗衰老作用。

1 材料、仪器与试剂

1.1 药材

杜仲雄花来源于湖南省张家界市慈利县(湖南神舟中药饮片有限公司),由湖南中医药大学石继连教授鉴定为杜仲科杜仲属植物(*Eucommia ulmoides* Oliv.)的干燥雄花序。

1.2 主要仪器

超高效液相色谱仪、高分辨质谱仪、多功能酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司,型号:Vanquish™ Flex UHPLC、Orbitrap Exploris 120、Lux);医用离心机(湘仪离心机仪器有限公司,型号:TGL-16);超声波清洗机(深圳市洁盟清洗设备有限公司,型号:JP-040S);电子分析天平[梅特勒托利多科技(中国)有限公司,型号:NewClassic MF]。

1.3 主要试剂

色谱甲醇(国药集团化学试剂有限公司,批号:WXBD9351V);怡宝纯净水(华润怡宝饮料有限公司);ABTS 自由基清除能力检测试剂盒、DPPH 自由基清除能力检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:BC4775、BC4750)。

2 网络药理学相关软件 and 数据库

中药系统药理数据库和分析平台(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>);HERB 数据库(<http://herb.ac.cn/>);PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>);SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>);GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>);OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>);Venny 2.1 在线工具(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>);Cytoscape 3.7.1 软件(<https://www.cytoscape.org/>);互作基因检索工具数据库(<https://www.stringdb.org/>);微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)。

3 方法

3.1 供试品溶液的制备

取杜仲雄花样品粉末(过4号筛)0.5 g,置于50 mL具塞锥形瓶中,精密加入70%色谱甲醇20 mL,密塞,称定重量,超声处理50 min,放冷,再次称重,用70%色谱甲醇补足失重。将混悬液进行离心,取上清液,过0.22 μm微孔滤膜,即得质谱分析样品。

3.2 基于 UHPLC-Orbitrap-MS 的杜仲雄花化学成分鉴定

3.2.1 UHPLC-Orbitrap-MS 质谱分析条件 UHPLC-Orbitrap-MS 分析流动相由0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B)组成,洗脱条件:0~8 min,5%~95% B;柱温:25 ℃;流速:0.3 mL/min;进样量:2 μL;色谱柱为Hypersil GOLD™ Aq-C₁₈,100 mm×2.1 mm,1.9 μm。在正负离子切换扫描模式下,采用全扫描一级质谱/数据依赖二级质谱(full-scan mass spectrometry/data-dependent MS₂, Full MS/dd-MS₂)模式完成样品数据采集。正离子模式的喷雾电压:3 500 V;负离子模式的喷雾电压:2 500 V;一级分辨率:60 000;二级分辨率:15 000;一级质谱质荷比扫描范围:100~1 000 Da;鞘气压力:50 arb;辅助气压力:10 arb;吹扫气压力:0 arb;汽化温度:350 ℃;离子传输管温度:325 ℃;碰撞能量采用阶梯归一化能量,分别为30%、45%、70%。数据采集软件为Thermo Scientific Xcalibur 4.5.474.0。

3.2.2 数据分析 质谱数据采用Compound Discoverer 3.3进行峰提取和处理。杜仲中化合物的非靶向鉴定由mzCloud在线和mzVault本地数据库鉴定。

3.3 基于网络药理学的杜仲雄花抗衰老作用机制研究

3.3.1 杜仲雄花中化合物靶点筛选 基于UHPLC-Orbitrap-MS的鉴定结果,在中药系统药理数据库和分析平台检索杜仲雄花相关活性成分,以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%及类药性(drug likeness, DL)≥0.18为标准进行有效组分的筛选。在HERB数据库中检索杜仲雄花相关化学成分,通过PubChem数据库检索获取SMILES编号,导入Swiss-TargetPrediction数据库预测其相关靶点,合并后去除重复项,得到最终靶点。

3.3.2 衰老靶点筛选 本研究通过GeneCards和OMIM数据库检索、整合衰老(Aging)相关基因靶点,以“衰老”或“Aging”为检索词,在GeneCards数据库中初步检索获得35 051个靶点,经相关性得分筛选,获得1 011个高相关性靶点。

3.3.3 杜仲雄花中化合物抗衰老的潜在靶点 在中药系统药理数据库和分析平台检索杜仲雄花相关活性成分,同时从GeneCards和OMIM数据库中筛选并整合衰老的相关基因靶点,将杜仲雄花化合物靶点与衰老靶点导入Venny 2.1在线工具进行交集分析,绘制韦恩图。

3.3.4 杜仲雄花“药物-成分-靶点”网络构建 为进一步筛选杜仲雄花发挥抗衰老作用的核心活性成分,将 187 个潜在交集靶点对应的活性成分靶点关系数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建“药物-成分-靶点”可视化网络模型,通过 Degree 值筛选核心活性成分。

3.3.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建及关键靶点筛选 将杜仲雄花抗衰老的 187 个潜在靶点,导入 STRING 数据库构建 PPI 网络。将种类定义为“Homo sapiens”进行分析,设置最高置信度为 0.9,隐藏孤立节点得到 PPI 数据文本。将其导入 Cytoscape 3.7.1 软件,计算连接度 (Degree)、节点介度 (Betweenness) 和连接紧密度 (Closeness) 等拓扑结构特征参数,利用 Degree 值进行筛选,得到核心靶点。

3.3.6 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 通过微生物信平台,对杜仲雄花抗衰老的 187 个潜在靶点,进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析,对分析结果进行可视化。

3.3.7 抗氧化活性测定 准确称取 1.0 mg 槲皮素和 1.0 mg 阳性对照药 (维生素 C),用无水乙醇溶解,配制成浓度为 0.5 mmol/L 的母液,稀释制备得到 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol/L}$ 的一系列待测液。使用试剂盒检测 ABTS 自由基清除率,于 96 孔板中进行实验,将工作液充分混匀后,室温避光静置 6 min,使用多功能酶标仪测定 405 nm 处吸光度。使用试剂盒检测 DPPH 自由基清除率,于 96 孔板中进行

实验,工作液充分混匀后,室温避光静置 30 min,于 515 nm 处测定吸光度。

4 结果

4.1 基于 UHPLC-Orbitrap-MS 的杜仲雄花化学成分分析

本研究初步建立了杜仲雄花化学成分质谱数据库。杜仲雄花样品的总离子流图 (total ion chromatogram, TIC) 如图 1 所示。通过 UHPLC-Orbitrap-MS 对杜仲雄花中化学成分进行鉴定,结合 mzCloud、mzVault 和内部数据库鉴定分析,共鉴定出 40 个化合物,主要包括黄酮类、酚酸类、木脂素类、萜类及甾醇类等化合物,详见表 1。

4.2 基于网络药理学的杜仲雄花抗衰老作用机制研究

4.2.1 杜仲雄花中化合物靶点筛选 对杜仲雄花中 40 个化合物的靶点进行筛选,去重后得到 621 个相关靶点。

4.2.2 衰老靶点筛选 从 GeneCards 和 OMIM 数据库中筛选并整合衰老的相关基因靶点,在 GeneCards 数据库初步检索到 35 051 个靶点,经相关性得分筛选,结合 OMIM 数据库检索到的靶点合并去重得到最终靶点 1 011 个。

4.2.3 杜仲雄花中化合物抗衰老的潜在靶点 在中药系统药理数据库和分析平台检索杜仲雄花相关活性成分,去重后得到 621 个相关靶点。同时从 GeneCards 和 OMIM 数据库中筛选并整合衰老的相关基因靶点,去重得到最终靶点 1 011 个。将杜仲雄花化合物

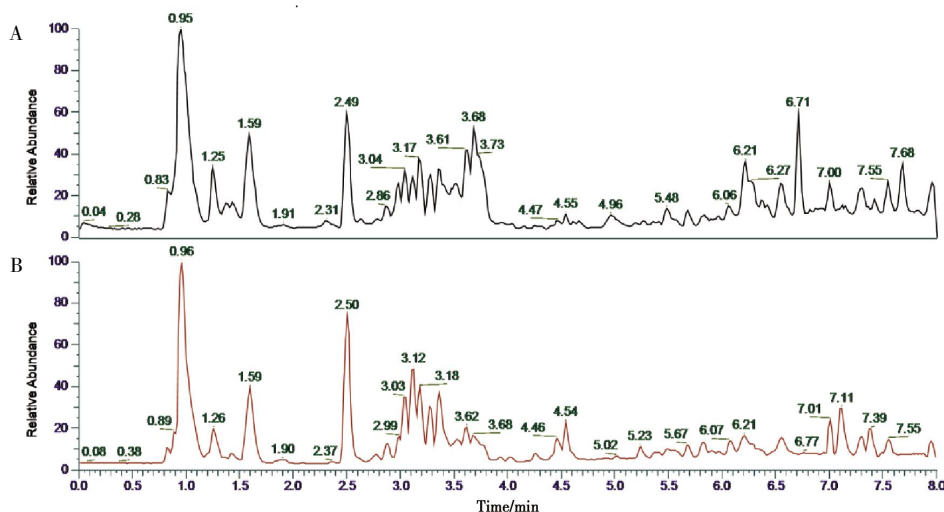


图 1 杜仲雄花的 TIC 图

Fig.1 Total ion chromatogram of *E. ulmoides* male flowers

注:A.正离子模式;B.负离子模式。

表 1 杜仲雄花中化学成分鉴定结果信息

Table 1 Identified chemical constituents in *E. ulmoides* male flowers

序号	保留时间/min	分子式	离子类型	质荷比/(m/z)	误差/ppm	子离子	鉴定结果	
1	1.216	C ₄ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	133.013	8	-3.26	115.003 4,89.024 2,72.992 9	L-(-)-苹果酸
2	1.219	C ₄ H ₄ O ₄	[M-H] ⁻	115.003	3	-2.93	87.008 8,71.013 7,47.002 2	富马酸
3	1.251	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	[M-H] ⁻	243.061	2	-4.24	200.055 7,153.029 9,94.029 8,66.034 9	尿苷
4	1.253	C ₆ H ₆ O ₆	[M-H] ⁻	173.008	5	-3.72	111.008 4,85.029 3,67.018 8	反式乌头酸
5	1.348	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	[M-H] ⁻	282.083	3	-4.72	164.058 4,150.041 6,133.015 2,107.036 2	鸟苷
6	1.423	C ₄ H ₄ O ₄	[M-H] ⁻	115.003	4	-2.63	96.102 7,71.013 7,59.013 5	马来酸
7	1.428	C ₄ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	117.019	0	-2.77	100.012 1,74.032 7,54.476 3	甲基丙二酸
8	1.455	C ₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	133.050	2	-3.21	115.003 4,89.024 2,43.018 7	二羟基戊酸酯
9	2.085	C ₁₅ H ₂₁ NO ₇	[M+H] ⁺	328.137	4	-4.99	292.116 6,246.112 1,166.085 5,97.028 9	N-果糖基苯丙氨酸
10	2.501	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	195.064	0	-5.97	177.053 7,149.059 0,121.064 2,79.053 9	4-羟基蜂蜜曲菌素
11	2.502	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	373.111	7	-5.88	211.060 1,167.070 8,123.044 8,89.024 2	京尼平苷酸
12	2.728	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	153.018	8	-3.36	110.032 7,108.021 3,76.929 9	原儿茶酸
13	3.042	C ₇ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	191.055	2	-4.63	171.030 0,127.039 8,93.034 1,59.013 7	D-(-)-奎宁酸
14	3.067	C ₁₅ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	325.091	6	-4.22	243.740 4,164.042 7,119.049 8,73.056 5	白果内酯
15	3.277	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	[M-H] ⁻	625.138	4	-4.67	464.086 2,302.037 0,178.997 9,152.000 2	槲皮素-3,4'-O-二-β-葡萄糖苷
16	3.409	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	609.143	5	-4.83	343.043 3,285.039 9,178.997 8	芦丁
17	3.436	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	[M-H] ⁻	337.091	6	-4.11	219.198 8,191.055 4,93.034 2	香豆酰奎宁酸
18	3.483	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	593.148	8	-4.38	473.105 1,327.049 5,284.031 4,152.010 8	山柰酚-7-新橙皮糖苷
19	3.555	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.106	9	-4.42	287.055 2,151.003 2,107.013 5,85.029 1	圣草酚-7-O-葡萄糖苷
20	3.591	C ₈ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	173.081	2	-4.43	129.091 8,111.081 2,83.049 9,57.034 2	辛二酸
21	3.748	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	[M-H] ⁻	303.049	8	-4.44	285.039 4,199.039 1,125.024 0,83.013 6	二氢槲皮素
22	3.776	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	433.112	0	-4.53	343.084 3,271.060 2,177.018 1,119.048 9	樱桃苷(柚皮素-7-O-葡萄糖苷)
23	3.801	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	449.106	8	-4.65	287.055 0,269.043 8,151.003 1,125.024 1	落新妇苷
24	3.898	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	[M+H] ⁺	197.116	2	-4.89	179.105 7,135.116 2,79.054 4,57.069 5	黑麦草内酯
25	3.929	C ₉ H ₁₆ O ₄	[M-H] ⁻	187.096	9	-3.74	169.086 6,143.107 3,125.096 8,97.065 5	壬二酸
26	4.026	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.055	0	-3.99	259.060 1,180.005 7,125.024 0,65.003 0	二氢山柰酚
27	4.041	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	[M+FA-H] ⁻	493.227	1	-4.31	447.221 3,315.179 5,233.066 8,131.034 6	苍术苷 A
28	4.258	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	[M-H] ⁻	287.055	1	-4.16	269.043 8,177.019 4,151.003 1,83.013 8	圣草酚
29	4.263	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M-H] ⁻	301.034	2	-4.32	273.039 3,178.997 9,107.013 6,83.014 1	槲皮素
30	4.543	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	271.060	0	-4.75	227.071 0,165.018 6,107.013 5,83.013 5	柚皮素
31	4.561	C ₁₈ H ₃₄ O ₅	[M-H] ⁻	329.232	0	-4.19	311.222 3,229.143 7,127.112 3,99.081 1	(15Z)-9,12,13-三羟基-15-十八碳烯酸
32	4.572	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	[M-H] ⁻	301.070	5	-4.29	286.048 3,199.040 0,151.003 1,125.024 1	橙皮素
33	4.921	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	221.081	1	-3.81	177.091 5,149.096 8,121.029 1,71.050 1	邻苯二甲酸单丁酯
34	5.239	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	[M-H] ⁻	293.174	7	-3.92	237.108 5,192.115 6,127.076 5,71.200 6	6-姜酚
35	5.367	C ₃₀ H ₄₆ O ₃	[M+H] ⁺	455.349	6	-5.08	409.345 4,321.253 3,215.179 2,95.084 9	齐墩果酮酸
36	5.812	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	[M-H] ⁻	293.211	1	-3.94	275.200 7,224.140 1,109.065 3,59.013 5	13(S)-羟基十八碳三烯酸
37	6.098	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	279.230	3	-5.46	223.169 1,187.147 9,123.116 1,81.069 5	α-桐酸
38	6.744	C ₃₂ H ₄₈ O ₅	[M+H] ⁺	513.354	9	-4.77	467.349 5,407.329 5,271.204 1,189.162 9	3-乙酰-11-氧代-β-乳香酸
39	7.004	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	[M+H] ⁺	279.230	4	-5.10	243.210 0,187.147 3,109.100 6,81.069 5	α-亚麻酸
40	7.583	C ₃₅ H ₅₆ N ₄ O ₅	[M+H] ⁺	593.273	1	-4.59	533.251 9,460.222 4,180.489 0,114.451 4	脱镁叶绿酸 A

靶点与衰老靶点导入 Venny 2.1 在线工具进行交集分析。最终获得共同交集靶点 187 个,即为杜仲雄花抗衰老的潜在作用靶点,如图 2 所示。

4.2.4 杜仲雄花的有效成分基因网络

本研究根

据 Degree 值排序筛选得到核心活性成分为槲皮素(Quercetin)、柚皮素(Naringenin)。本次构建的杜仲雄花“成分-靶点”网络图如图 3 所示,其中菱形节点代表杜仲雄花的活性成分,圆形节点代表抗衰老

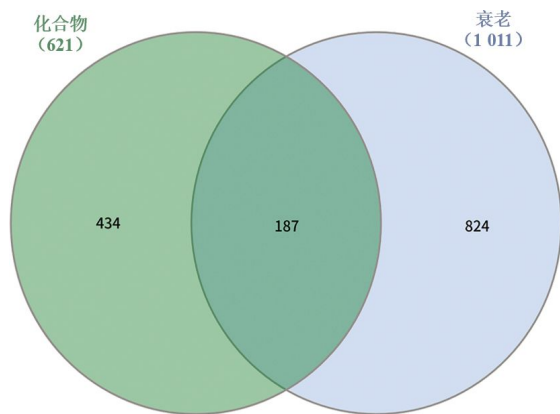


图2 杜仲雄花中化合物靶点与衰老靶点韦恩图

Fig.2 Venn diagram of constituent targets of *E. ulmoides* male flowers and aging-related targets

潜在核心靶点。

4.2.5 杜仲雄花抗衰老潜在靶点 PPI 网络构建 构建 PPI 网络,最终得到 159 个靶点节点、488 条相互作用边,网络平均度值为 6.411,依据 Degree 值大小进行核心靶点筛选与排序,最终确定排名前 5 的核心靶点,分别为:肿瘤蛋白 p53(tumor protein p53, p53)、信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、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)、SRC 原癌基因非受体酪氨酸激酶(SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase, SRC)、蛋白激酶 B1(protein kinase B1, Akt1)。结果如图 4 所示,图中的节点大

小与颜色深浅根据 Degree 值进行调整,圆圈越大、颜色越深,表明该靶点与其他靶点的蛋白相互作用越密切。

4.2.6 GO 和 KEGG 富集分析 如图 5 所示,将药物疾病共有靶点进行 GO 的生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)富集,将具有统计学意义的项目进行筛选,总共富集到 2 829 项 BP 条目、118 项 CC 条目、252 项 MF 条目。KEGG 通路富集分析共筛选得到 177 条显著性富集通路,本研究选取与衰老调控密切相关、具有显著差异的 PI3K-Akt 信号通路进行可视化分析,通路网络图中红色节点为杜仲雄花干预衰老的潜在作用靶点,这反映了杜仲雄花可通过调控 PI3K-Akt 信号通路介导机体衰老进程。

4.2.7 槲皮素的抗氧化活性测定结果 本实验测定槲皮素对 ABTS 和 DPPH 自由基的体外清除能力,平行重复 3 次实验,结果以半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)表示,维生素 C 作为阳性对照药。结果表明,槲皮素对 ABTS 和 DPPH 自由基有较强的体外清除能力,其 IC₅₀ 分别为(8.62 $\pm$ 0.26) μ mol/L 和(44.94 $\pm$ 6.99) μ mol/L。维生素 C 的 IC₅₀ 分别为(11.27 $\pm$ 0.05) μ mol/L 和(30.62 $\pm$ 1.64) μ mol/L。

槲皮素对 ABTS 和 DPPH 自由基清除作用具有浓度依赖性,随着槲皮素浓度升高,ABTS 和 DPPH

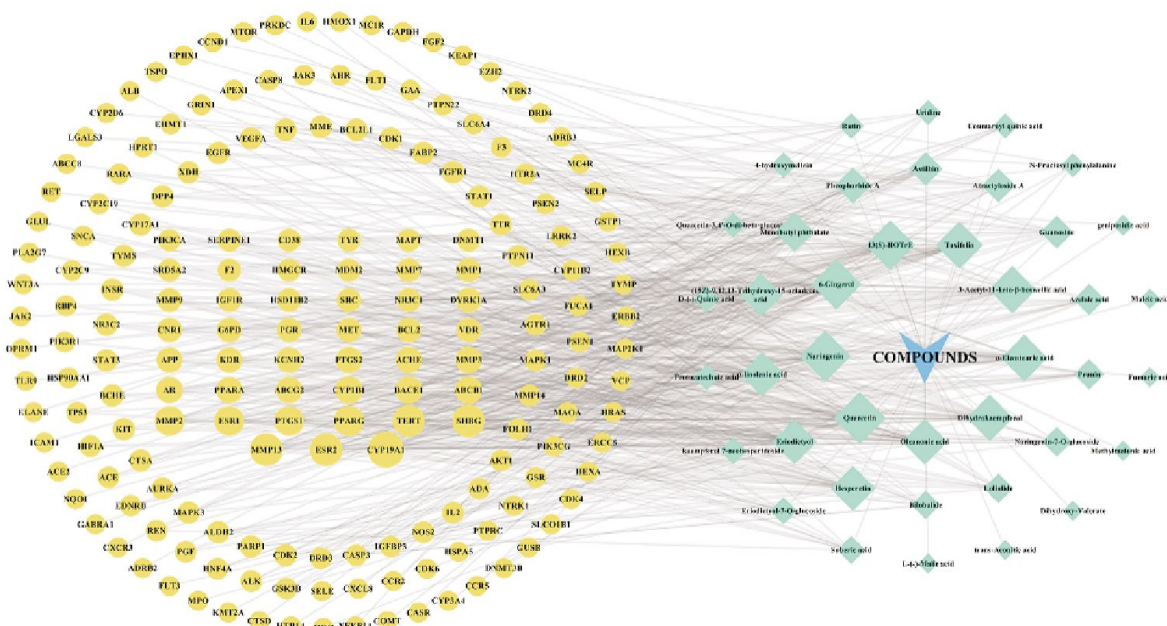


图3 杜仲雄花“成分-治疗靶标”网络图

Fig.3 Constituents-therapeutic target network diagram of *E. ulmoides* male flowers

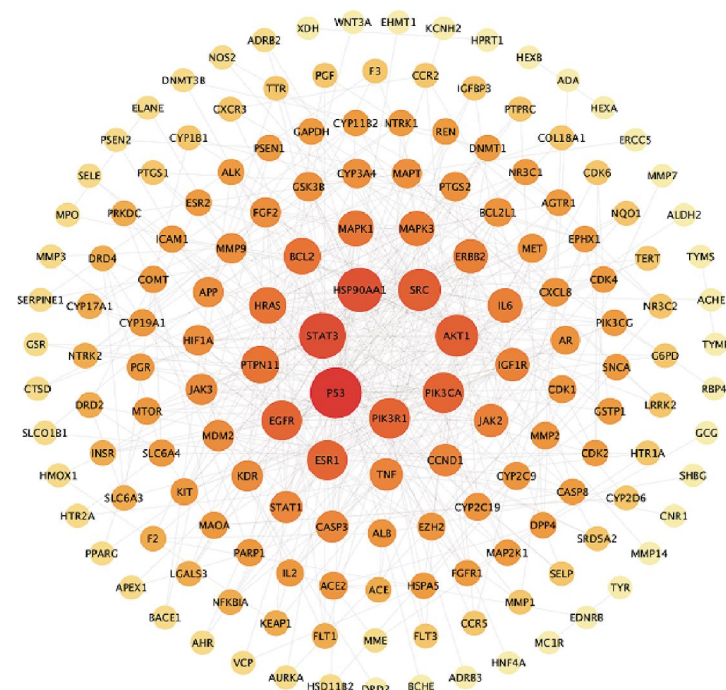


图 4 杜仲雄花抗衰老潜在靶点的 PPI 网络图

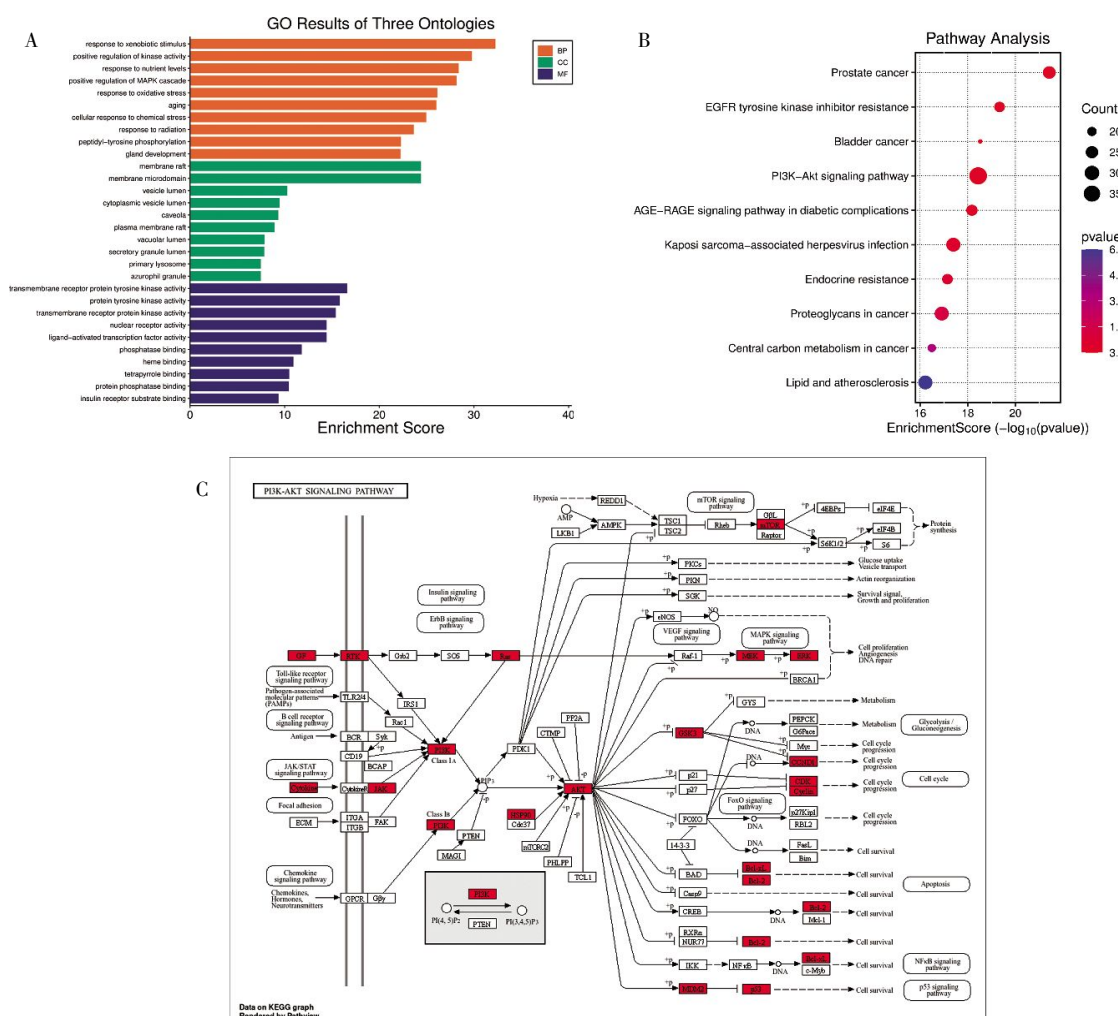
Fig.4 PPI network of potential anti-aging targets of *E. ulmoides* male flowers

图 5 杜仲雄花活性成分作用靶点的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig.5 GO and KEGG enrichment analyses of targets of active constituents in *E. ulmoides* male flowers

注:A.GO 生物富集分析;B.KEGG 通路富集分析;C.PI3K-Akt 可视化通路。

自由基清除率显著提升,呈现良好的量效关系。实验结果表明,槲皮素具有优异的体外抗氧化能力,其抗氧化机制可能与清除活性氧自由基、抑制氧化应激反应相关,可为其后续抗氧化及抗衰老机制研究提供实验依据。

5 讨论

本研究采用 UHPLC-Orbitrap-MS 技术,从杜仲雄花中精准鉴别出 40 个化学成分,主要包括黄酮类、酚酸类、木脂素类、萜类及甾醇类等化合物。网络药理学将上述成分对应靶点与衰老相关靶点取交集,筛选获得 187 个药物-衰老交集靶点,进一步经 PPI 网络构建与 Degree 值拓扑分析,挖掘出 159 个衰老关键靶点,并明确槲皮素和柚皮素为杜仲雄花发挥抗衰老功效的核心黄酮类物质基础,p53、STAT3、HSP90AA1、SRC、Akt1 为其核心作用靶点。这些靶点均为细胞衰老、氧化应激及信号传导过程中的关键调控节点。GO 富集与 KEGG 通路富集分析表明,杜仲雄花可能通过调控细胞衰老、氧化应激、细胞凋亡与细胞增殖等生物学过程,主要作用于 PI3K-Akt 信号通路发挥抗衰老作用。

近年来研究表明,槲皮素通过多种机制发挥抗衰老作用,这些机制包括抗氧化、抗炎、调节细胞凋亡及促进自噬等^[24]。此外,槲皮素通过与肠道微生物组的相互作用,改善胃肠道环境,维持机体健康,发挥延缓衰老的作用^[24]。槲皮素具有较强的抗氧化能力,表现为升高 SOD 及谷胱甘肽浓度、降低 MDA 浓度,抑制氧化应激反应,调节细胞程序性死亡^[25-26]。柚皮素可以降低 SOD2、周期蛋白依赖性激酶 2 蛋白的表达水平,提高 SOD 活性,降低 MDA 的含量^[27]。研究证实,杜仲雄花的核心黄酮类成分槲皮素和柚皮素为发挥抗衰老作用的主要活性成分;此外,液质联用技术检出了杜仲雄花的标志性环烯醚萜类活性成分京尼平苷酸。因此,杜仲雄花的抗衰老作用是由环烯醚萜成分协同多类黄酮组分,多组分之间相互配合,共同介导抗氧化、抑制细胞凋亡、延缓细胞衰老的药理效应。

KEGG 通路富集分析显示,PI3K-Akt 通路为富集程度较为显著的通路,其在细胞增殖、凋亡、代谢等多种生命过程中发挥重要调控作用,也是天然植

物活性成分发挥抗衰老、抗氧化药理作用的关键靶向通路^[28]。p53 是介导细胞衰老的关键诱导因子,活化的 SRC 能够通过磷酸化修饰激活 p53,进而启动细胞衰老程序;STAT3 是诱导和维持衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP) 的核心转录因子,可直接调控白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-8 等炎症因子的表达^[29-30]。目前,抑制细胞衰老有以下方法:一种是选择性地诱导衰老细胞凋亡,从而达到清除衰老细胞的目的;一种是降低 SASP 的水平^[31]。Akt1 通常传递生长信号、抑制细胞凋亡的作用;在衰老细胞中,HSP90AA1 可通过 Akt1 和 STAT3 等蛋白,维持衰老细胞的存活和 SASP 分泌功能^[32]。结合 GO 功能富集结果可知,PI3K-Akt 通路通过 SRC、Akt1、p53、STAT3、HSP90AA1 等核心靶点,整合氧化应激、细胞增殖凋亡、炎症应答、信号传导等多条衰老相关路径进行调控。本研究基于网络药理学方法初步阐释了杜仲雄花抗衰老的分子机制。体外实验表明,槲皮素对 ABTS 和 DPPH 自由基有较强的体外清除能力,其 IC₅₀ 分别为 (8.62±0.26) μmol/L 和 (44.94±6.99) μmol/L,提示其具有良好的抗氧化活性潜力。本研究仅通过体外实验验证杜仲雄花抗氧化活性,后续将构建体内、外衰老模型,针对 p53、STAT3 等靶点开展分子生物学验证,阐释其抗衰老机制。

参考文献

- [1] 孙晓康, 张艳艳, 张晓元, 等. 衰老机制及抗衰老治疗的研究进展[J]. 食品与药品, 2022, 24(1): 74-80.
- [2] 许志刚, 刘晓蕾, 董碧蓉. 衰老的意义、特征及相关生物标记与评估模式[J]. 中国临床保健杂志, 2022, 25(4): 472-476.
- [3] Childs B G, Durik M, Baker D J, et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy[J]. Nature Medicine, 2015, 21(12): 1424-1435.
- [4] Liu G H, Ding Z C, Izpisua Belmonte J C. iPSC technology to study human aging and aging-related disorders[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2012, 24(6): 765-774.
- [5] He X R, Wang J H, Li M X, et al. Eucommia ulmoides Oliv.: ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional Chinese medicine[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2014, 151(1): 78-92.
- [6] 龚频, 韩业雯, 翟鹏涛, 等. 杜仲叶的活性成分、药理作用及其在食品加工中的应用[J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 395-404.

- [7] 杨凤, 胡世睿, 李东翰, 等. 杜仲胶的提取方法研究进展[J]. 高分子材料科学与工程, 2020(4): 177–182, 190.
- [8] 向智, 李焕杰, 谌鑫阳, 等. 药食同源植物杜仲化学成分、药理作用及产品开发生态研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(2): 190–202.
- [9] 王青青, 周海燕, 周旭, 等. 经典名方中杜仲的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(19): 88–96.
- [10] 陈丽华, 柯雅兴, 朱文佳, 等. 杜仲不同部位标准分析及其产品发展现状[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(11): 6158–6162.
- [11] 付立业, 赵匀淑, 周辉. 杜仲雄花在保健酒产品开发中的前景展望[J]. 酿酒科技, 2025(5): 88–91.
- [12] 岳芽, 胡竟月, 谭欣, 等. 杜仲雄花活性成分及其生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(18): 219–224.
- [13] 成翠, 兰乾敏, 王婷玉, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨杜仲雄花多肽抗氧化机制[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(24): 253–260.
- [14] 郭洋静. 杜仲雄花中抗皮肤光老化活性成分的研究[D]. 开封: 河南大学, 2014.
- [15] 黄红莹, 李涛, 杜红岩, 等. 杜仲雄花水提液治疗特应性皮炎的实验研究[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(2): 119–121.
- [16] Ding Y X, Li Q, Zhang H, et al. Iridoid constituents from the male flower of *Eucommia ulmoides* and their promotion proliferation on ESF-1[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2015, 17(9): 867–875.
- [17] Morgado-Carrasco D, Gil-Lianes J, Jourdain E, et al. Oral supplementation and systemic drugs for skin aging: a narrative review[J]. Actas Dermo-Sifiliograficas, 2023, 114(2): 114–124.
- [18] Rivera-Yañez C R, Ruiz-Hurtado P A, Mendoza-Ramos M I, et al. Flavonoids present in propolis in the battle against photoaging and psoriasis[J]. Antioxidants, 2021, 10(12): 2014.
- [19] 余鹏, 田晶, 陈健. 黄酮类化合物在抗皮肤光老化中的作用及研究进展[J]. 华夏医学, 2025, 38(2): 12–17.
- [20] Calis Z, Mogulkoc R, Baltaci A K. The roles of flavonols/flavonoids in neurodegeneration and neuroinflammation[J]. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2020, 20(15): 1475–1488.
- [21] Khan H, Belwal T, Efferth T, et al. Targeting epigenetics in cancer: therapeutic potential of flavonoids[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2021, 61(10): 1616–1639.
- [22] 丁艳霞, 郭洋静, 任莹璐, 等. 杜仲雄花中黄酮类化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2014, 45(3): 323–327.
- [23] 高梦珂, 代俊俊, 许世伟, 等. 杜仲雄花粉总黄酮抗衰老作用[J]. 河南大学学报(医学版), 2023, 42(5): 330–336.
- [24] 高振坤, 林馨雨, 崔玉磊, 等. 槲皮素延缓衰老相关机制的研究进展[J/OL]. 天然产物研究与开发, 2026–09–14. <https://link.cnki.net/urlid/51.1335.Q.20250822.1600.002>.
- [25] 唐晓妹, 胡博, 陈雪梅, 等. 基于网络药理学探究槲皮素改善小鼠酒精性肝损伤的机制[J]. 中国食品学报, 2026, 26(2): 217–226.
- [26] 林艺燕, 吴月莹, 严锐, 等. 槲皮素防治急性肺损伤作用机制的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2025, 30(9): 1272–1280.
- [27] 李再巧, 王沙凝, 吴冲, 等. 柚皮素对 H_2O_2 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤的作用[J]. 西南农业学报, 2021, 34(2): 279–285.
- [28] 夏宇阳, 李扬, 何启旺, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探究葛根素改善肌少症小鼠骨骼肌细胞衰老与线粒体功能障碍的机制[J]. 药物评价研究, 2026, 49(1): 144–155.
- [29] Hinterleitner C, Goldberg H V, McHugh D, et al. Senescence in cancer: hallmarks, paradoxes, and therapeutic promise[J]. Cell, 2026, 189(8): 2357–2378.
- [30] 叶梦滢, 吕宏祥. Leptin 激活 JAK2/STAT3 信号通路分泌 SASP 促进小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 衰老[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(10): 896–900.
- [31] 陈军, 毛泽斌. 衰老相关分泌表型[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2024, 40(9): 1205–1214.
- [32] Yang S S, Nie T J, She H, et al. Regulation of TFEB nuclear localization by HSP90AA1 promotes autophagy and longevity[J]. Autophagy, 2023, 19(3): 822–838.

(本文编辑 徐易琳)