

基于血清药物化学与网络药理学的六味地黄丸抗皮肤光老化

入血成分筛选及多靶点协同机制研究

刘静¹, 霍亚静^{2,3}, 赵晨皓², 王静涵², 魏一², 刘娇^{2,*}

中图分类号: R285.5 文献标识码: A

摘要 **目的:** 基于血清药物化学筛选六味地黄丸 (Liuwei Dihuang Wan, LWDH) 抗皮肤光老化的入血原型成分, 整合网络药理学、分子对接与成药性预测, 解析其多靶点协同机制。**方法:** 采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱 (Thermo-Orbitrap-QE HF) 鉴定 LWDH 含药血清中的入血原型成分; 经 SwissTargetPrediction、GeneCards 及 DisGeNET 数据库预测成分-靶点-疾病关联, Cytoscape 3.9.1 构建成分-靶点网络并拓扑分析筛选核心靶点; AutoDock Vina 1.2.7 验证关键成分与靶点的结合模式; SwissADME、ADMETlab 2.0 及 pkGSM 三平台联用评价吸收、分布、代谢、排泄和毒性 (absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity, ADMET) 成药性。**结果:** 从 LWDH 含药血清中鉴定出肉碱、咖啡酸乙酯、对羟基苯乙酮、N-乙酰神经氨酸及羟基酪醇 5 个入血原型成分。网络分析筛选出 β -葡萄糖脑苷脂酶 (GBA)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)、儿茶酚-O-甲基转移酶 (catechol-O-methyltransferase, COMT) 等核心靶点。分子对接显示, 咖啡酸乙酯与 EGFR、BBOX1 结合能分别为 -7.172、-7.081 kcal/mol, 与 MMP9 结合能达 -9.495 kcal/mol; N-乙酰神经氨酸与 GBA 结合能为 -6.681 kcal/mol。成药性预测显示, 对羟基苯乙酮与肉碱系统吸收潜力最优 (Caco-2 细胞通透性分别为 8.73×10^{-6} 、 12.8×10^{-6} cm/s), 且不违反 Lipinski 规则; N-乙酰神经氨酸口服生物利用度极低。**结论:** LWDH 可能通过咖啡酸乙酯-MMP9/EGFR 轴调控胶原稳态与表皮修复、N-乙酰神经氨酸-GBA 轴修复皮肤屏障、对羟基苯乙酮-COMT/ERN1 轴调节应激-代谢偶联等多维度协同机制干预皮肤光老化, 为阐释“肾-皮相应”理论提供现代科学依据。

关键词: 六味地黄丸; 皮肤光老化; 血清药物化学; 网络药理学; 分子对接

作者信息: 1. 郑州人民医院整形外科, 河南 郑州 450046; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 3. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

基金资助: 首都医科大学人才引进项目 (3100-124001), 北京中医药新时代 125 工程 (京中医药科【2025】2 号); 通讯作者: 刘娇, 邮箱: 20230015@ccmu.edu.cn.

Screening of absorbed components and multi-target synergistic mechanism of Liuwei

Dihuang Wan against skin photoaging based on serum

pharmacochemistry and network pharmacology

Liu Jing¹, Huo Yajing^{2,3}, Zhao Chenhao², Wang Jinghan², Wei Yi², Liu Jiao^{2,*}

(1. Department of Plastic Surgery, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450046, Henan, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. College of Chinese Medicinal Materials and Food Engineering, Shanxi University of

Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi, China)

Abstract

Objective: To screen the absorbed prototype components of Liuwei Dihuang Wan (LWDH) against skin photoaging based on serum pharmacochimistry, and to elucidate its multi-target synergistic mechanism by integrating network pharmacology, molecular docking and drug-likeness prediction. **Methods:** Thermo-Orbitrap-QE HF was used to identify the absorbed prototype components in LWDH-containing serum. SwissTargetPrediction, GeneCards and DisGeNET databases were used to predict component-target-disease associations. Cytoscape 3.9.1 was used to construct the component-target (C-T) network and screen core targets by topological analysis. AutoDock Vina 1.2.7 was applied to verify the binding modes between key components and targets. ADMET properties were evaluated using SwissADME, ADMETlab 2.0 and pkCSM. **Results:** Five absorbed prototype components were identified, namely carnitine, ethyl caffeate, 4-hydroxyacetophenone, N-acetylneuraminic acid and hydroxytyrosol. Core targets including glucocerebrosidase (GBA), epidermal growth factor receptor (EGFR), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and catechol-O-methyltransferase (COMT) were screened. Molecular docking showed that the binding energies of ethyl caffeate with EGFR, BBOX1 and MMP9 were -7.172, -7.081 and -9.495 kcal/mol, respectively, and that of N-acetylneuraminic acid with GBA was -6.681 kcal/mol. ADMET prediction indicated that 4-hydroxyacetophenone and carnitine had the greatest systemic absorption potential, whereas the oral bioavailability of N-acetylneuraminic acid was extremely low. **Conclusion:** LWDH may synergistically intervene in skin photoaging through the ethyl caffeate-MMP9/EGFR axis regulating collagen homeostasis and epidermal repair, the N-acetylneuraminic acid-GBA axis repairing the skin barrier, and the 4-hydroxyacetophenone-COMT/ERN1 axis modulating stress-metabolism coupling, providing modern scientific evidence for the “kidney-skin correlation” theory.

Key words: Liuwei Dihuang Wan; skin photoaging; serum pharmacochimistry; network pharmacology; molecular docking

皮肤光老化是长期暴露于紫外线辐射导致的皮肤慢性损伤，临床表现为皮肤松弛、皱纹加深、色素沉着，影响患者容貌美观与心理健康^[1]。全球环境变化背景下，皮肤光老化已成为公众健康领域的重要议题^[2]。目前干预手段包括外用维A酸类制剂、抗氧化剂、化学剥脱及光电治疗等，但存在皮肤刺激性大、疗效维持时间短及成本高昂等局限^[3]。从传统中药中寻找具有多靶点调控、系统性保护且安全性高的光老化防治药物，具有重要的价值。

中医理论认为，皮肤疾患与脏腑功能失调密切相关。肾藏精，肾精充盈，则气血生化有源，肌肤得以濡养而润泽有光。反之，肾精亏虚，精血不能上荣于面，则肌肤枯槁、失于弹性，易受外邪侵袭而早衰。这一“肾-皮相应”理论为从补肾填精角度防治皮肤光老化提供了经典依据^[4]。

六味地黄丸（Liuwei Dihuang Wan, LWDH）出自宋代钱乙《小儿药证直诀》，由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、牡丹皮、茯苓六味药材组成，是滋补肾阴的代表方。现代临床研究表明，LWDH可通过抗氧化、调节免疫及改善微循环等延缓衰老^[5]。然而，其成分复杂，口服后发挥系统药效的入血物质基础及其多靶点协同机制尚不明确。

中药血清药物化学认为，吸收入血的成分可能是中药发挥系统性药效的重要物质基础^[6]。此外，网络药理学可系统阐释中药多成分、多靶点的协同作用模式提供了有力工具^[7]。基于此，本研究采用血清药物化学捕获LWDH的入血原型成分，整合网络药理学、分子对接、ADMET成药性评价，从LWDH复杂的化学体系中筛选具有系统性吸收潜能的抗皮肤光老化活性成分，为经典名方的现代化研究与皮肤领域应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

六味地黄丸浓缩丸（LWDH，中国北京同仁堂科技发展股份有限公司，批号：Z19993068）；甲醇、乙腈（色谱纯，德国 Merck KGaA 公司）；甲酸（质谱纯，美国 Sigma-Aldrich 公司）

1.2 血清药物化学分析

1.2.1 动物处理

雄性C57BL/6小鼠（体重20±2 g，SPF级）禁食12 h后，按2.75 g/kg（相当于成人临床等效剂量）灌胃给予LWDH汤剂，给药后1 h眼眶取血，分离血清。同法设置空白对照组（给予等体积生理盐水）（n=3）。本研究经首都医科大学实验动物伦理委员会审批（批号：AEEI-2026-134），实验动物使用许可证号：SYXK（京）-20260034，动物实验遵循替代（replacement）、减少（reduction）和优化（refinement）的3R原则。

1.2.2 超高效液相色谱-高分辨质谱分析

采用UPLC-QE HF技术分析。血清经蛋白沉淀（甲醇-乙腈，2:1）、超声、氮吹复溶后进样；中药经70%甲醇超声提取60 min。色谱条件：ACQUITY HSS T3柱（100 mm×2.1 mm，1.8 μm），0.1%甲酸水-乙腈梯度洗脱，流速0.35 mL/min。质谱采用加热电喷雾离子

源（heated electrospray ionization, HESI），正负离子模式，Full MS 分辨率 60000，阶梯碰撞能量 10/20/40 eV。数据经 XCMS 处理，基于 LuMet-TCM 数据库鉴定。

1.3 网络药理学分析

1.3.1 成分靶点预测

将鉴定出的入血成分导入 SwissTargetPrediction 平台（<http://www.swisstargetprediction.ch>），选择物种为“Homo sapiens”，Probability 阈值 >0.05，获取潜在作用靶点。

1.3.2 疾病靶点获取

以“Skin Photoaging”、“UVB-induced Skin Damage”、“Mitochondrial Dysfunction in Skin”为关键词，检索 GeneCards（Relevance Score>5）、DisGeNET 数据库，整合疾病相关靶点。

1.3.3 网络构建与拓扑分析

采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建成分-靶点（component-target, C-T）网络，节点为成分及靶点，边为预测相互作用。网络拓扑参数设定：节点度值（Degree） ≥ 2 判定为 Hub 靶点，介数中心性（Betweenness Centrality）>0.05 为关键桥梁节点。依据京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路注释，在靶点间添加功能关联边（如基质金属蛋白酶（matrix metalloproteinase, MMP）家族协同作用、 β -葡萄糖脑苷脂酶（glucocerebrosidase, GBA）-尿苷二磷酸葡萄糖神经酰胺葡萄糖基转移酶（UDP-glucose ceramide glucosyltransferase, UGCG）屏障修复关联），构建功能关联子网络。

1.3.4 功能富集分析

利用 Metascape 平台（<http://metascape.org>）进行基因本体（GO）生物过程及 KEGG 通路富集分析，设定阈值 $P < 0.05$ 且错误发现率（false discovery rate, FDR）<0.05，重点锁定神经鞘脂代谢（GO:0006684）、角质形成细胞分化（GO:0030216）及 G 蛋白偶联受体信号（GO:0007186）通路。

1.4 分子对接验证

基于 C-T 网络拓扑分析，选取 Degree ≥ 2 的 Hub 靶点（ γ -丁酰甜菜碱双加氧酶（ γ -butyrobetaine dioxygenase, BBOX1）、EGFR、肌醇需求蛋白 1（inositol-requiring protein 1, ERN1）、GBA、COMT）及炎症相关靶点（大麻素受体 2（cannabinoid receptor 2, CNR2）、前列腺素 E2 受体 3（prostaglandin E receptor 3, PTGER3）进行分子对接验证。从 RCSB PDB 数据库下载人源晶体结构（BBOX1 基于 6A0G 模板同源建模，碳酸酐酶 5A（carbonic anhydrase 5A, CA5A: 5DLA），EGFR: 1M17, ERN1: 2HZ6, GBA: 5GXX），PyMOL 去除水分子及原配体后，AutoDockTools 1.5.7 加极性氢、计算 Kollman 电荷并保存为 PDBQT 格式；配体（咖啡酸乙酯、对羟基苯乙酮、肉碱、N-乙酰神经氨酸）从 PubChem 获取 3D 结构，经 Open Babel 转换格式后加 Gasteiger 电荷、设置可旋

转键。

对接参数设置：使用 AutoDock Vina 1.2.7 进行分子对接，搜索空间（Grid Box）设置为：Center_x, y, z 根据各靶点活性中心坐标设定（如 EGFR: -0.5, 3.5, 20.0; BBOX1: 15.2, -5.3, 12.1），Size_x=y=z=20 Å，exhaustiveness=32，num_modes=9。采用 PyMOL 2.5.0 软件进行三维可视化，LigPlot+ v.2.2 分析氢键及疏水相互作用。

1.5 成药性及 ADMET 预测

通过 PubChem 获取入血成分简化分子线性输入规范（simplified molecular input line entry system, SMILES）结构，采用 SwissADME、ADMETlab 2.0 及 pkCSM 三平台联用进行成药性评价。主要指标：胃肠道吸收（GI absorption, SwissADME）、口服生物利用度（F30%, ADMETlab 2.0）、Caco-2 细胞通透性（pkCSM）、表观分布容积（apparent volume of distribution, Vd）、血浆蛋白结合率（plasma protein binding, PPB）、半衰期（T1/2）、毒性风险（肝毒性、致癌性、皮肤致敏性）。三平台预测值取算术平均，变异系数（coefficient of variation, CV）<20% 视为一致，CV>40% 的成分标记为预测不确定性高，不纳入主要结论。

2 结果

2.1 LWDH 入血成分鉴定

通过 Thermo-Orbitrap-QE HF 分析，共鉴定出入血成分 86 个（给药血清检出而空白血清未检出或峰面积比值 ≥ 2，质量误差 ≤ 5 ppm，MS/MS 匹配度 ≥ 0.8）。经与原方对比确认为原型成分后，按含量、结构可预测性及抗皮肤光老化相关活性筛选出 5 个关键原型成分：肉碱、咖啡酸乙酯、对羟基苯乙酮、N-乙酰神经氨酸及羟基酪醇（图 1，表 1）。

表 1 Thermo-Orbitrap-QE HF 鉴定 LWDH 入正常小鼠血清关键成分

肉碱				
咖啡酸乙酯				
对羟基苯乙酮				
N-乙酰神经氨酸				
羟基酪醇				

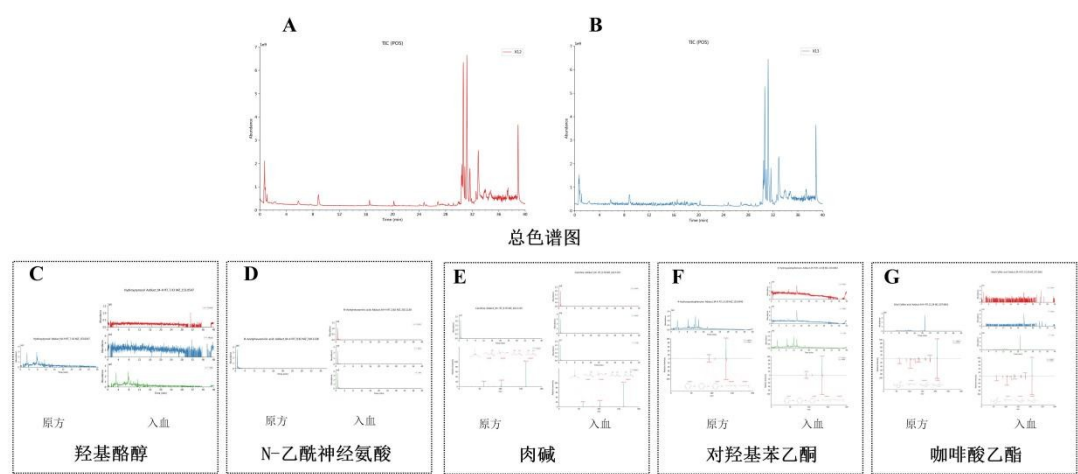


图 1 LWDH 入血成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析

注：A、B 分别为 LWDH 原方及给药血清的总离子流色谱图；C-G 为 5 个关键入血原型成分的提取离子流色谱图（extracted ion chromatogram, EIC），从左至右依次为羟基酪醇、N-乙酰神经氨酸、肉碱、对羟基苯乙酮、咖啡酸乙酯，显示各成分在原方与入血样品中的色谱保留行为及质谱特征一致性，证实其为入血原型成分。

2.2 成分-靶点网络与功能模块分析

构建的 C-T 网络包含 50 个节点（5 成分+45 靶点），呈现典型“多星型”协同作用结构（图 2A）。拓扑分析显示，咖啡酸乙酯连接靶点最多（Degree=23），主要涉及能量代谢（BBOX1、CA5A）、表皮修复（EGFR）及内质网应激（ERN1）；N-乙酰神经氨酸主要关联屏障修复靶点（GBA）；肉碱侧重能量代谢相关靶点。

基于上述拓扑特征，识别出 3 个功能模块：①能量代谢模块（BBOX1/CA5A），由咖啡酸乙酯和肉碱协同调控；②表皮修复与应激模块（EGFR/ERN1），由咖啡酸乙酯主导调控；③屏障修复模块（GBA），由 N-乙酰神经氨酸主导调控。此外，基于 KEGG 炎症通路注释，CNR2（大麻素受体 2）与 PTGER3（前列腺素 E2 受体 3）被识别为神经源性炎症调控关键节点，纳入后续验证。

2.3 核心靶点功能验证

基于网络拓扑分析（Degree≥2）筛选出 6 个核心靶点：GBA、EGFR、BBOX1、ERN1、CNR2 及 PTGER3。功能注释显示，GBA 富集于神经鞘脂代谢及角质形成细胞分化通路，直接参与角质层神经酰胺代谢；EGFR 富集于表皮生长因子受体信号通路，调控角质形成细胞增殖与迁移；BBOX1 参与肉碱合成终末步骤，关联线粒体脂肪酸氧化；CNR2 及 PTGER3 富集于 G 蛋白偶联受体信号及炎症反应调控通路，介导皮肤神经源性炎症信号传导。

2.4 分子对接验证结果

图 2 六味地黄丸入血成分-靶点 (C-T) 相互作用网络图

三平台 **ADMET** 交叉验证显示 (表 3、图 3)，咖啡酸乙酯、对羟基苯乙酮及羟基酪醇在胃肠道吸收、皮肤渗透性及安全性维度评分均 >0.55 ，其中咖啡酸乙酯与对羟基苯乙酮生物利用度评分达 0.55 且不违反 **Lipinski** 规则。定量预测显示：对羟基苯乙酮 **Caco-2** 细胞通透性 (8.73×10^{-6} cm/s) 显著优于咖啡酸乙酯 (0.96×10^{-6} cm/s)，羟基酪醇呈“高通透-中等吸收”特征 (14.45×10^{-6} cm/s、64.1%)；**N-乙酰神经氨酸**因多羟基糖酸结构(氢键供体/受体超标)致肠道吸收率 $<5\%$ ，生物利用度评分仅 0.11 ，但毒性预测均为阴性。提示对羟基苯乙酮与肉碱可作为 **LWDH** 系统起效的核心候选成分；咖啡酸乙酯与羟基酪醇需关注首过代谢；**N-乙酰神经氨酸**口服生物利用度极低，可能主要于肠道局部调控菌群-宿主互作，或经肝脏首过代谢转化为活性代谢产物发挥作用。

表3 六味地黄丸入血成分的 ADMET 成药性预测

毒 性 预 测
(Ames 试验 /

注: GI 吸收: 肠道吸收百分率; GI 吸收分级: SwissADME 预测的胃肠道吸收分级 (High/Low); F30%: 口服生物利用度; Caco-2 通透性: Caco-2 细胞单层通透性; Vd: 表观分布容积; PPB: 血浆蛋白结合率, 由 pkCSM 预测的游离分数 (fraction unbound, Fu) 换算 ($PPB = 1 - Fu$); Lipinski 违规数: Lipinski 类药性五规则违规项数; SwissADME 生物利用度评分 (0~1, >0.5 为可接受); N-乙酰神经氨酸违反 Lipinski 规则 (氢键供体/受体数>5)。

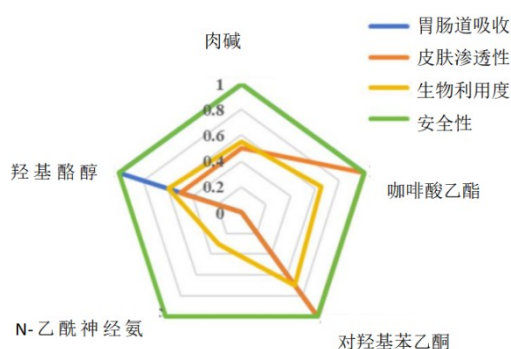


图3 关键入血成分 ADMET 属性雷达图 (基于 SwissADME 预测)

3.1 LWDH入血成分的潜在多靶点协同作用模式

对羟基苯乙酮虽在网络中连接度较低，但其与 CNR2 及 PTGER3 的有效结合提示 LWDH 可能具有抗炎与神经源性瘙痒调控的潜在靶点。UVB 诱导皮肤炎症反应中，PGE2 通过 EP 受体家族（EP2/EP4）激活下游炎症级联，而 PTGER3（EP3 受体）通过负反馈机制限制炎症过度放大；同时，CNR2 作为内源性大麻素系统重要组分，可抑制感觉神经肽释放、减轻神经源性炎症。对羟基苯乙酮同时与内质网应激传感器 ERN1 及代谢酶 COMT 呈现中等强度结合，提示其可能通过“应激-代谢”偶联机制阻断细胞应激反应，为

LWDH 改善光老化伴随的敏感、瘙痒症状提供了可能的分子靶点依据。

N-乙酰神经氨酸与 GBA（ β -葡萄糖脑苷脂酶）的结合支持其参与神经鞘脂代谢、促进角质层神经酰胺生成的屏障修复功能。ADMET 评价显示该成分因多羟基糖酸结构导致口服生物利用度极差，这一“高活性-低吸收”的矛盾提示其可能主要于肠道局部调控菌群-宿主互作，或通过肝脏首过代谢后转化为活性代谢产物发挥作用。以上发现提示经典名方的“补肾填精”效应可能并非单一成分系统分布，而是多成分在吸收、分布、代谢环节的时空协同结果。

3.2 成分成药性差异与“内调外养”整体观的契合

成药性评价显示，对羟基苯乙酮与肉碱系统吸收潜力最优，为口服系统起效的核心候选成分；咖啡酸乙酯 Caco-2 通透性低而血浆蛋白结合率高，可能经血液运输至皮肤组织后缓慢释放、维持局部有效浓度。这种“高通透成分系统分布以调内环境（内调）、低通透高结合成分皮肤局部蓄积以修外损（外养）”的时空协同模式，可能是复方“君臣佐使”配伍科学内涵的药代动力学体现，也为 LWDH 长期服用的累积效应提供依据。

3.3“肾-皮相应”理论的现代科学阐释

《素问》云“肾者，主蛰，封藏之本，精之处也”，肾精充盈则“肤革充盈”，反之则“肌肤枯槁”。本研究发现 LWDH 入血成分可能与肾-皮关联相关的三条潜在路径：其一，肉碱与咖啡酸乙酯协同调控线粒体能量代谢（BBOX1/CA5A），可能与“肾主生殖生长发育”所涵摄的能量代谢调控功能有关；其二，对羟基苯乙酮通过 CNR2/PTGER3 轴抑制神经源性炎症，和减轻“肾虚”所致的皮肤敏感易激状态相关；其三，N-乙酰神经氨酸-GBA 轴促进屏障神经酰胺合成，体现“精生髓、髓充皮”的物质基础。上述机制为“肾-皮相应”理论提供了现代生物学阐释。

本研究局限性在于缺乏细胞及动物实验验证，未来将通过体外细胞模型及体内光老化模型验证关键成分的药效学活性，并探索 N-乙酰神经氨酸的肠道局部作用机制。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

[REDACTED]

[REDACTED]

██████████

[REDACTED]

██████████
