

基于网络药理学和实验验证探讨淫羊藿苷延缓皮肤光老化的作用机制

侯利^{1,2}, 邓锋^{1,2}, 王怡^{1,2}, 邱昆成^{1,2}, 温涛³, 刘翠华^{1*}

¹三峡大学健康医学院; ²三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室; ³宜昌市中医医院, 宜昌 443002

摘要: 基于网络药理学、分子对接技术及细胞实验, 探讨淫羊藿苷 (icariin, ICA) 在延缓皮肤光老化中的作用及潜在机制。利用 SwissTargetPrediction 和 GeneCard 等数据库筛选 ICA 的潜在作用靶点; 通过 OMIM 和 DrugBank 等数据库获取皮肤光老化相关靶点, 并将两者共有的靶点导入 STRING 数据库进行分析, 并运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建蛋白互作网络。进一步使用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析, 明确其关键信号通路。利用 AutoDock 4.2.6 软件对 ICA 与核心靶点进行对接验证。最后, 通过细胞实验对关键靶点进行验证。网络药理学分析得出, ICA 与皮肤光老化相关的潜在靶点共 123 个, 其中有 10 个关键核心靶点, 包括 B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma 2, BCL-2) 和半胱天冬酶 3 (cysteiny aspartate specific protease-3, Caspase-3) 等。GO 和 KEGG 富集分析显示, 这些靶点主要涉及磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 等信号通路。分子对接结果显示, ICA 与靶点 BCL-2、Caspase-3 具有较强的结合活性。细胞实验结果表明, ICA 可显著抑制 HaCaT 细胞衰老和凋亡。此外, 与中波紫外线 (ultraviolet B, UVB) 组相比, ICA 组, BCL-2 相关 X 蛋白 (BCL-2-associated X protein, BAX)、剪切的 Caspase-3 (Cleaved Caspase-3) 蛋白表达水平降低, 而磷酸化 PI3K (p-PI3K)、磷酸化 AKT (p-AKT)、BCL-2 的蛋白表达水平显著升高。综上, ICA 通过调控 PI3K/AKT 信号通路抑制细胞凋亡, 进而延缓皮肤光老化。

关键词: 淫羊藿苷; 皮肤光老化; 网络药理学; 分子对接; 作用机制; PI3K/AKT

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-6880(2026)8-1804-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2026.8.018

CSTR: 32307.14.1001-6880.2026.8.018

Mechanism of icariin in delaying skin photoaging based on network pharmacology and experimental verification

HOU Li^{1,2}, DENG Feng^{1,2},
WANG Yi^{1,2}, QIU Kun-cheng^{1,2}, WEN Tao³, LIU Cui-hua^{1*}

¹College of Medicine and Health Sciences, China Three Gorges University; ²Third-grade

Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese

Medicine, China Three Gorges University; ³Yichang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yichang 443002, China

Abstract: Based on network pharmacology, molecular docking technology, and cell experiments, this study explores the role and potential mechanisms of icariin (ICA) in delaying skin photoaging. The SwissTargetPrediction and GeneCard databases were used to screen for potential targets of ICA. Skin photoaging-related targets were obtained through the OMIM and DrugBank databases. The common targets between these two sets were imported into the STRING database for analysis and a protein interaction network was constructed using Cytoscape 3.7.2 software. Further, the DAVID database was used for gene ontology (GO) and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses to identify key signaling pathways. Molecular docking of ICA with core targets was performed using AutoDock 4.2.6 software. Finally, cell experiments were conducted to validate the key targets. Network pharmacology analysis identified 123 potential targets related to skin photoaging, with 10 key core targets, including B-cell lymphoma 2 (BCL-2) and cysteinyl aspartate specific protease-3 (Caspase-3). GO

收稿日期: 2025-03-06 接受日期: 2025-07-02

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划 (Q20221213); 宜昌市公立医院改革与高质量发展示范项目中医药科技研发专项 (YWGZ24-35)

* 通信作者: Tel: 86-015975551679; E-mail: lchctgu@163.com

and KEGG enrichment analyses showed that these targets are mainly involved in signaling pathways such as phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT). Molecular docking results indicated that ICA has strong binding activity with BCL-2 and Caspase-3. Cell experimental results demonstrated that ICA significantly inhibits the aging and apoptosis of HaCaT cells. Moreover, compared with the ultraviolet B (UVB) group, in the ICA group, the protein expression levels of BCL-2-associated X protein (BAX) and Cleaved Caspase-3 were decreased, while the protein expression levels of phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated AKT (p-AKT), and BCL-2 were significantly increased. In summary, ICA delays skin photoaging by regulating the PI3K/AKT signaling pathway to inhibit cell apoptosis.

Key words: icariin; skin photoaging; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action; PI3K/AKT

皮肤老化是生物体内一种普遍且不可避免的自然规律^[1]。皮肤老化主要分为内源性衰老和外源性衰老^[2]。外源性老化最重要的诱因是紫外线照射。皮肤长期受到紫外线照射,会出现粗糙、松弛、皱纹以及局部色素沉着等表现,甚至可能诱发良性或恶性肿瘤^[3]。中波紫外线 (ultraviolet B, UVB) 主要作用于皮肤的表皮和真皮浅层,是导致皮肤光老化的重要原因之一^[4]。

皮肤主要由表皮、真皮和皮下组织组成。在表皮中,角质形成细胞 (HaCaT) 是最丰富的细胞类型,约占表皮细胞总数的 90%^[5]。角质形成细胞不仅是表皮的主要结构细胞,也是皮肤防御紫外线辐射的关键细胞类型^[6]。

淫羊藿苷 (icariin, ICA) 是淫羊藿的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化、延缓衰老和抗肿瘤等多种药理作用^[7]。ICA 还可以通过抗炎、抗氧化等多种途径有效延缓紫外线诱导的皮肤衰老^[8,9]。课题组已证实 ICA 具有延缓生殖衰老和皮肤自然衰老的药理作用^[10,11]。然而,目前对于其在光老化领域的潜在作用以及相关机制尚未进行深入探讨。因此,本研究借助网络药理学及分子对接技术,并通过构建 UVB 诱导的皮肤光老化细胞模型,系统探讨 ICA 对皮肤光老化的延缓作用及其潜在机制,旨在为 UVB 诱导的皮肤光老化防治提供新的理论依据和研究思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株

永生化人角质形成细胞 (HaCaT) (批号:SNL-163,武汉尚恩生物技术有限公司)。

1.2 药物与试剂

ICA (纯度:98.61%,批号:160920,四川成都植标化纯生物技术有限公司)。

磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体、磷酸化 PI3K (p-PI3K) 抗体 (批号为:54f8512、51u8853,江苏亲科生物研究中心有限

公司);细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒 (批号:091821220330,上海碧云天生物技术有限公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒 (批号:LGA24014,和元李记(上海)生物技术有限公司);DMEM 培养基 (批号:6124406,赛默飞世尔(苏州)科技研发有限公司);辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗小鼠及 HRP 标记山羊抗兔、 β -肌动蛋白抗体 (β -actin)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒、MTT、超敏 ECL 化学发光试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒 (批号:AC2409113058、AC2408111005、AC240922007、MPC2404046、CR2409065、CR2410203、CR2409012,武汉赛维尔生物科技有限公司);Hochest 33342 荧光染色试剂盒和蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 抗体、磷酸化 AKT (p-AKT) 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma 2, BCL-2) 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (BCL-2-associated X protein, BAX) 抗体、剪切的半胱天冬酶 3 (cleaved cysteinyl aspartate specific protease-3, Cleaved Caspase-3) 抗体 (批号为:14A051、T11130003、103253309、M08241556、M01191637、T09062117,沈阳万类生物科技有限公司)。

1.3 主要仪器

NovoCyt 流式细胞仪 (美国 Agilent 公司);ChemScope S7 型化学发光仪 (上海勤翔科学仪器有限公司);1658021 型 Western blot 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司);Centrifuge 5418 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.4 网络药理学分析

1.4.1 ICA 和光老化相关靶点筛选

通过 SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>)、TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/>)、SuperPred (<https://prediction.charite.de/>)、SEA (<https://sea.bkslab.org/>) 和 PharmMapper (<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>) 数据库筛选, SwissTargetPrediction 和 TargetNet 数据库保留

Probability ≥ 0.5 的靶点, SuperPred 数据库保留 Probability > 0.5 的靶点, SEA 数据库保留 Tanimoto ≥ 0.4 的靶点, 而 PharmMapper 数据库则保留拟合分数 > 0.8 的靶点。筛选去重得到 ICA 的有效作用靶点; 以“skin photoaging”“solar elastosis”“light aging”为关键词分别从五个疾病基因数据库: GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>)、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>)、TTD (<http://db.idrblab.org/ttd/>) 数据库筛选, GeneCards 数据库保留 Gifts > 8 的基因, OMIM 数据库保留通过排序和筛选出带有“*”的基因, PharmGKB 和 DrugBank 数据库搜索基因数量少, 进行全部保留, TTD 数据库保留 Relevance Score ≥ 10 的基因。检索得到光老化相关基因, 将从上述数据库中检索到的光老化相关基因进行整理、去重, 得到光老化的潜在靶点。将 ICA 相关靶点和光老化潜在靶点导入 Venny 分析平台, 并获得药物-疾病交集靶点, 即获得 ICA 治疗光老化的潜在靶点。

1.4.2 蛋白互作网络的构建及核心靶点的筛选

将 ICA 治疗光老化的潜在作用靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 获取这些靶点之间的蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 关系, 并导出相应的 PPI 数据。使用 Cytoscape 3.7.2 软件对 STRING 数据库导出的 PPI 数据进行可视化处理。使用 CytoHubba 插件, 选择最大团中心性算法 (maximal clique centrality) 算法进行分析, 筛选出排名前 20 的节点作为初步核心靶点。再结合前期分析的中位数设定, 筛选出介数中心性 (betweenness centrality) > 35.5 , 接近中心性 (closeness centrality) > 0.5 , 度中心性 (degree centrality) > 34 的节点。最终通过取交集, 确定核心靶点。推测这些靶点是 ICA 调控光老化的关键靶点。

1.4.3 靶点的富集分析

通过 DAVID 平台 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>), 将 ICA 治疗光老化的潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 通过微生信生物信息分析平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行通路可视化分析。

1.4.4 活性成分-靶点的分子对接

将 ICA 与前 5 个核心靶点进行分子对接。在 PDB 数据库下载关键靶点蛋白受体的结构, BCL-2、Caspase-3、缺氧诱导因子 1α (hypoxia-inducible factor

1 α , HIF1A)、磷酸酶及张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN)、信号转导及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 的 PDB ID 分别是 6ZX7、1RE1、1H2M、1D5R、6NJS。采用 PyMOL 2.3.4 软件对蛋白受体进行去水提取配体等前处理, 保存为 PDB 格式。在 PubChem 检索 ICA 的结构, 并将其转换为 MOL2 格式。运用 AutoDock 4.2.6 软件进行分子对接, 一般认为结合能 ≤ -5 kcal/mol 表明该对接有效, 即结合能力越强, 结合能值越小。最后将对接结果通过 Pymol 2.3.4 软件进行可视化处理, 得到分子对接 3D 图。

1.5 体外细胞实验

1.5.1 UVB 诱导光老化模型的建立

提前开启 UVB 灯管预热, 在 6 孔板中加入 1 mL 的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS), 无盖照射确保紫外线能够直接作用于细胞。UVB 灯管距离细胞 15 cm, 按照设定的总剂量为 120 mJ/cm^2 (约 222 s) 的 UVB 进行照射。照射结束后, 用 PBS 清洗并更换完全培养基继续培养至待测时间点。

1.5.2 β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老水平

当细胞在六孔板中生长至 50% ~ 60% 时, 采用 UVB 照射处理后继续培养。分别在 24、48、72 h 检测细胞衰老状况。每个时间点培养完成后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 1 次, 加入 1 mL β -半乳糖苷酶固定液, 室温固定 15 min。固定完成后, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 根据 β -半乳糖苷酶染色试剂盒说明配制染色工作液, 每孔加入 1 mL 染色工作液, 37°C 避光孵育, 在普通光学显微镜下观察并拍照记录细胞的衰老情况。

1.5.3 活性氧检测

细胞按照“1.5.2”进行培养和造模, 分别在 24、48、72 h 检测细胞活性氧水平。每个时间点培养完成后, 弃去培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 按照活性氧检测试剂盒说明配制 DCFH-DA 工作液, 每孔加入 1 mL 工作液, 将细胞置于 37°C 含 5% CO_2 培养箱内孵育 20 min。孵育结束后, 用 PBS 溶液洗涤 3 次。最后, 每孔加入 1 mL PBS 覆盖细胞, 置于荧光显微镜下观察。

1.5.4 MTT 法检测活力

ICA 溶液的配制: 称取 3.38 mg ICA 粉末, 加入 100 μL DMSO 溶液配置成 50 mmol/L 的溶液, 在超

净台中进行分装, -20℃避光保存。

ICA 细胞毒性检测:细胞按照 1×10^5 个/mL 的密度,每孔 100 μ L 接种到 96 孔板。细胞培养 24 h, 加入含不同浓度 ICA (0.25、0.5、1、2、4、8、16、32、50) μ mol/L 的培养基,继续培养 24 h 后,加入 MTT, 孵育 4 h 后,弃上清加入 DMSO 振荡溶解,使用酶标仪测定 490 nm 波长的吸光度,计算细胞活力。

ICA 对 UVB 损伤细胞保护作用的检测:按上述方法将细胞接种到 96 孔板,细胞培养 24 h,贴壁更换含药培养基,预保护 12 h,随后将细胞分别暴露于五个不同剂量的 UVB 照射 (30、60、120、240、480 mJ/cm^2),照射结束后,继续培养 24 h。加入 MTT 孵育 4 h,弃上清加入 DMSO 振荡溶解,使用酶标仪测定 490 nm 波长的吸光度,计算细胞活力。

1.5.5 实验分组及给药

取对数生长期的 HaCaT 细胞进行实验,随机分为空白对照组 (control, Con)、模型组 (UVB)、ICA 低剂量组 (low-dose ICA, ICA-L; 3.2 μ mol/L) 和 ICA 高剂量组 (high-dose ICA, ICA-H; 6.4 μ mol/L)。提前开启灯管预热,将 UVB、ICA-L 和 ICA-H 组细胞置于总剂量为 120 mJ/cm^2 (约 222 s) 的 UVB 下照射。6 孔板中每孔加入 1 mL 的 PBS,进行无盖照射。照射结束后,UVB 组和 Con 组使用完全培养基培养,而 ICA-L 和 ICA-H 组使用含药培养基培养,每孔加入 2 mL 培养基。置于 37℃,含 5% CO_2 培养箱内培养。

1.5.6 流式分析角质形成细胞凋亡情况

当细胞在六孔板中生长到 50% ~ 60% 左右,UVB 照射细胞后加药培养 24 h 后,弃去培养基,根据 AnnexinV-FITC/PI 试剂盒说明书进行操作,PBS 清洗后收集细胞,加入 Buffer 试剂重悬,加入室温避光孵育后,流式细胞仪上机检测,采用 488 nm 激光,使用 FITC 通道和 PerCP/Cy5.5 通道检测,根据细胞大小设 FSC 阈值,并调整 FSC 和 SSC 电压使细胞群居中,检测结束后,用 FlowJo 进行数据分析。

1.5.7 Hoechst 33342 观察细胞凋亡情况

将细胞接种到 6 孔板中,当细胞的融合度达到 50% ~ 60% 时,便可进行 UVB 照射造模后加药 24 h 后,弃去培养基,PBS 清洗细胞 3 次,每孔加入 1 mL Hoechst 33342 染色液,充分摇晃均匀,将细胞放入 37℃ CO_2 培养箱避光孵育 30 min,孵育结束后,PBS 洗涤细胞 3 次,每次 6 min。最后,将六孔板置于荧光显微镜下观察并取图。

1.5.8 Western blot 检测细胞 PI3K/AKT 信号通路和凋亡相关蛋白的表达

提取各组细胞蛋白后,按照说明书配制 BCA 工作液测蛋白浓度,根据标准曲线计算出样品蛋白的浓度以及上样体积,按照计算数值加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液,加热变形后,放入 -20℃ 冰箱,待后续使用。随后,制胶和上样,将电泳仪调至恒压 60 V 电泳,使样品压齐。待样品进入分离胶后,调节电压至 110 V 继续电泳。电泳完成后,根据目的蛋白的分子量,切胶并转膜。根据分子量大小,横流 250 mA,进行冰浴转膜。转膜结束后,摇床室温封闭 1 h,加入一抗 4℃ 摇床孵育 14 h。一抗孵育完成后,用含 Tween-20 的 Tris 缓冲盐溶液 (tris buffered saline with tween-20, TBST) 洗膜三次,每次 8 min。加入一抗匹配的 HRP 标记二抗 (山羊抗小鼠或山羊抗兔),摇床室温孵育 1 h。孵育结束后,TBST 洗膜 3 次,每次 8 min。配制超敏 ECL 化学发光试剂,化学发光仪采集并保存图片,用 Image J 软件扫灰度值并分析。

1.5.9 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.5.0 软件对数据进行分析。所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析法进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学

2.1.1 收集 ICA 和光老化相关靶点

通过 SwissTargetPrediction、TargetNet、SuperPred、SEA 和 PharmMapper 数据库,筛选并去重得到 ICA 的有效作用靶点共 337 个。同时,以“skin photoaging”“solar elastosis”“light aging”为关键词,从 GeneCards、OMIM、PharmGKB、TTD、DrugBank 等 5 个疾病基因数据库中检索得到光老化相关基因,经数据信息排列和去重后,获得疾病潜在靶点 1 521 个。将 ICA 的 337 个靶点和 1 521 个光老化潜在靶点进行 Venny 分析,最终获得 123 个药物-疾病交集靶点 (见图 1)。

2.1.2 PPI 网络的构建

将筛选得到的 ICA 对应靶点与光老化相关靶点导入 Venny 2.1.0 平台,绘制 Venn 图以展示两组靶点的交集,交集基因作为 ICA 治疗光老化的潜在作用靶点,进一步导入 STRING 数据库进行 PPI 分析。随后,使用 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络 (见图 2)。通过 CytoHubba 插件筛选得出核心靶点,包括 HIF1A、STAT3、BCL-2、Caspase-3、PTEN、热

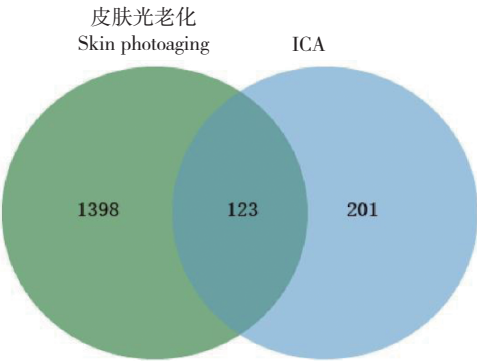


图 1 ICA 治疗皮肤光老化的潜在靶点

Fig. 1 Potential targets for ICA in the treatment of skin photoaging

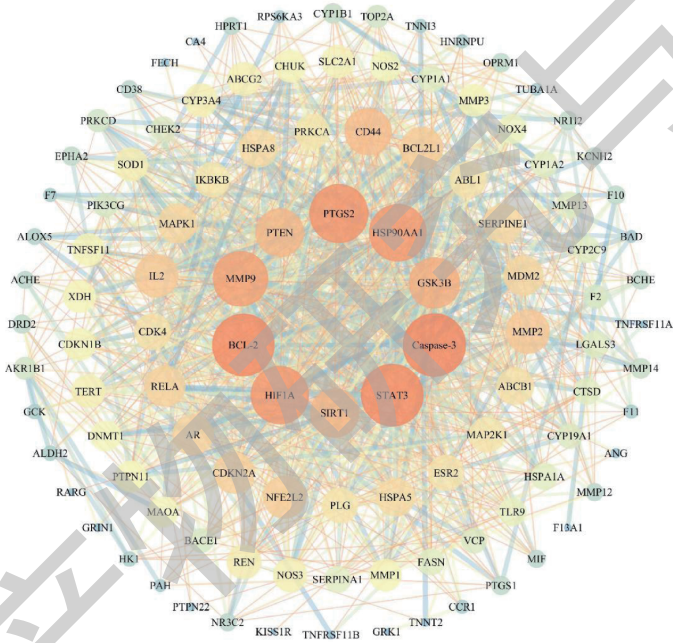


图 2 PPI 网络分析图

Fig. 2 PPI network analysis diagram

休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class a member 1, HSP90AA1)、小鼠双微体 2 (mouse double minute 2, MDM2)、糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3B)、细胞周期依赖性激酶抑制因子 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, CDKN2A)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9), 并进行可视化分析。推测这些靶点是 ICA 调控光老化的关键靶点 (见图 3)。

2.1.3 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID 平台将 ICA 治疗光老化的潜在靶点进行 GO 富集分析 (见图 4A), 结果显示共富集到 422 个生物过程 (biological process, BP), 包括细胞凋亡过程、细胞群增殖的负调控、基因表达的阳性调

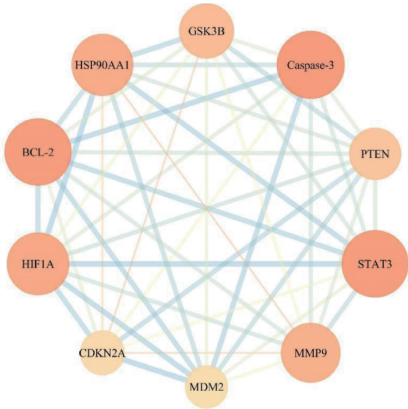


图 3 核心靶点图

Fig. 3 Core target diagram

节、细胞外信号调节激酶 1 (extracellular signal-regulated kinase 1, ERK1) 和细胞外信号调节激酶 2 (extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2) 级联反应的正调节等; 61 个细胞组分 (cellular component, CC), 包括细胞外区域、细胞外间隙、富含 Ficolin-1 的颗粒腔、线粒体等; 以及 101 个分子功能 (molecu-

lar function, MF), 包括酶结合、泛素蛋白连接酶结合、丝氨酸型内肽酶活性、内肽酶活性等。KEGG 富集分析共获得 141 条富集通路, 其中筛选与疾病相关的 20 条通路进行可视化分析, 结果显示, PI3K-AKT 信号通路具有显著性, 提示该通路在 ICA 调控光老化过程中可能发挥重要作用 (见图 4B)。

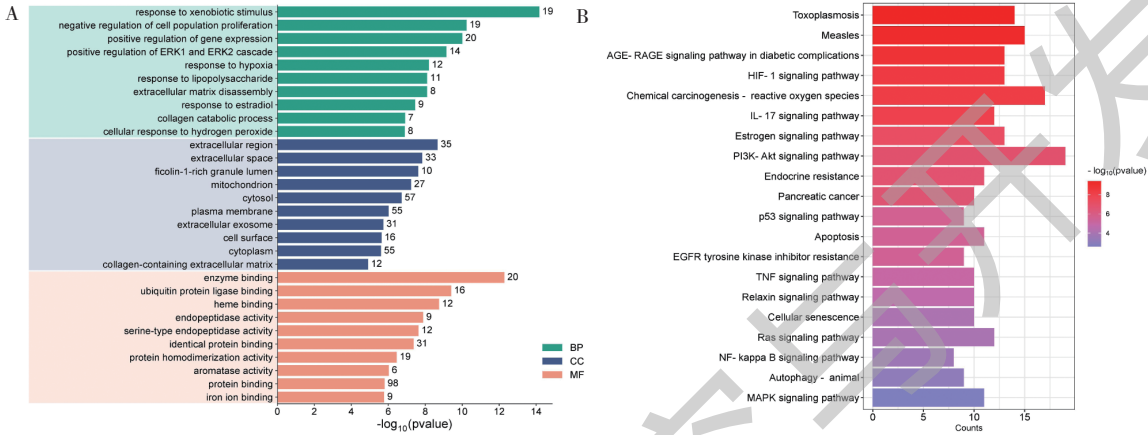


图 4 GO 功能富集(A) 和 KEGG 通路(B) 分析

Fig. 4 GO functional enrichment (A) and KEGG pathway (B) analysis

2.1.4 活性成分-靶点分子对接结果

为进一步验证 ICA 与光老化相关核心靶点的结合能力, 本研究从 PDB 数据库中获取了排名前五的核心靶点 (HIF1A、STAT3、BCL-2、Caspase-3、PTEN) 的蛋白结构, 并分别与 ICA 配体进行分子对接分析 (见表 1)。ICA 与这些潜在作用靶点的对接结合能均 ≤ -5.0 kcal/mol, 表明 ICA 与这些靶点具有较强的结合亲和力。利用 PyMOL 2.3.4 软件进

行可视化处理 (见图 5)。

表 1 ICA 与核心靶点的结合能

Table 1 Binding energy of ICA with the core targets

靶点 Target	结合能 Binding energy (kcal/mol)
BCL-2	-7.9
Caspase-3	-8.7
HIF1A	-8.7
PTEN	-8.3
STAT3	-7.0

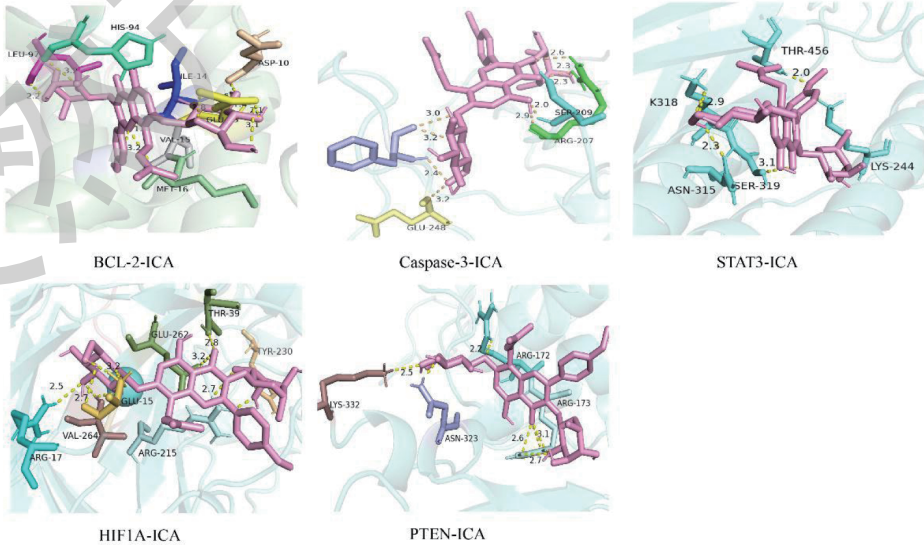


图 5 ICA 与核心靶点的分子对接

Fig. 5 Molecular docking mode of ICA with core targets

2.2 细胞实验

2.2.1 不同剂量 UVB 对 HaCaT 细胞衰老及凋亡率的影响

MTT 实验结果显示,各剂量 UVB 均显著降低了细胞活力($P < 0.01$, $P < 0.001$)。其中,30、60、120 mJ/cm^2 的 UVB 照射剂量下,细胞活力在 70% 以上,初步筛选为候选剂量(见图 6)。进一步通过 β -半乳糖苷酶染色和流式细胞术检测 HaCaT 细胞衰老和

凋亡情况,发现随着剂量增加,阳性细胞数和凋亡率均上升(见图 7、图 8)。综合评估后,最终确定 120 mJ/cm^2 为后续细胞实验的 UVB 辐射剂量。随后,分别在 24、48、72 h 三个时间点检测了细胞衰老和活性氧水平。结果表明,随着时间的延长,活性氧水平和阳性细胞数量均呈上升趋势(见图 9、图 10)。经过综合分析,最终确定 24 h 为最佳检测时间点。

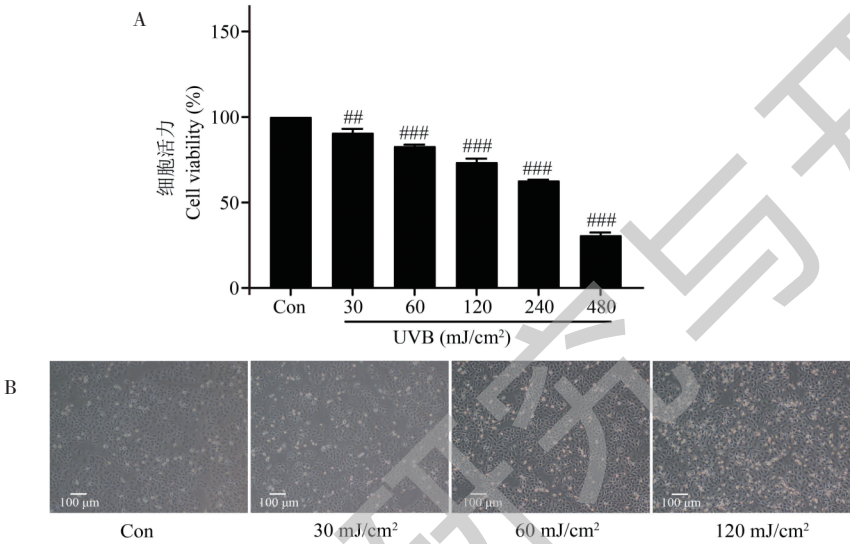


图 6 不同剂量 UVB 对 HaCaT 细胞活性 (A) 和显微镜下细胞状态 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 6 Effects of different UVB doses on HaCaT cell viability (A) and cellular morphology under microscopy (B) ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注:与 Con 组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$, 下同。Note: Compared with Con group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$, the same below.

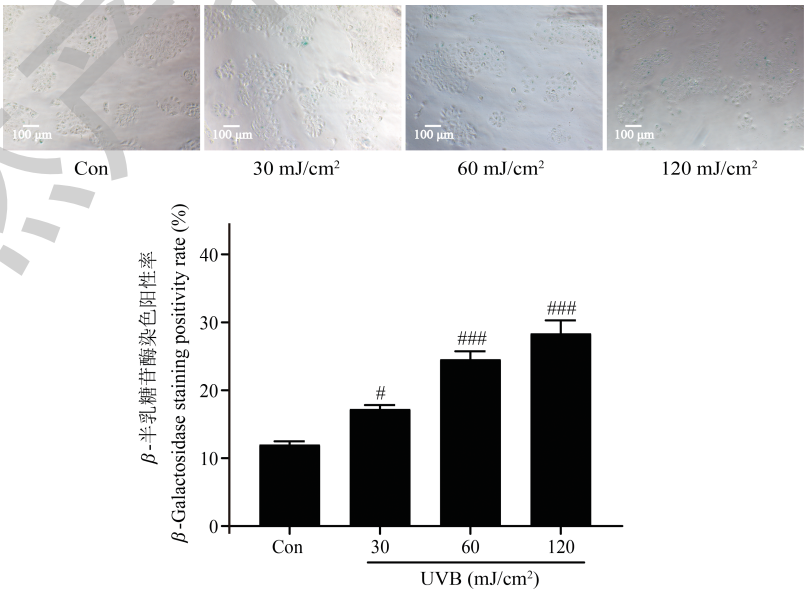


图 7 不同剂量 UVB 对 HaCaT 细胞 β -半乳糖苷酶染色阳性率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 7 Effect of different UVB doses on the β -galactosidase staining positivity rate in HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

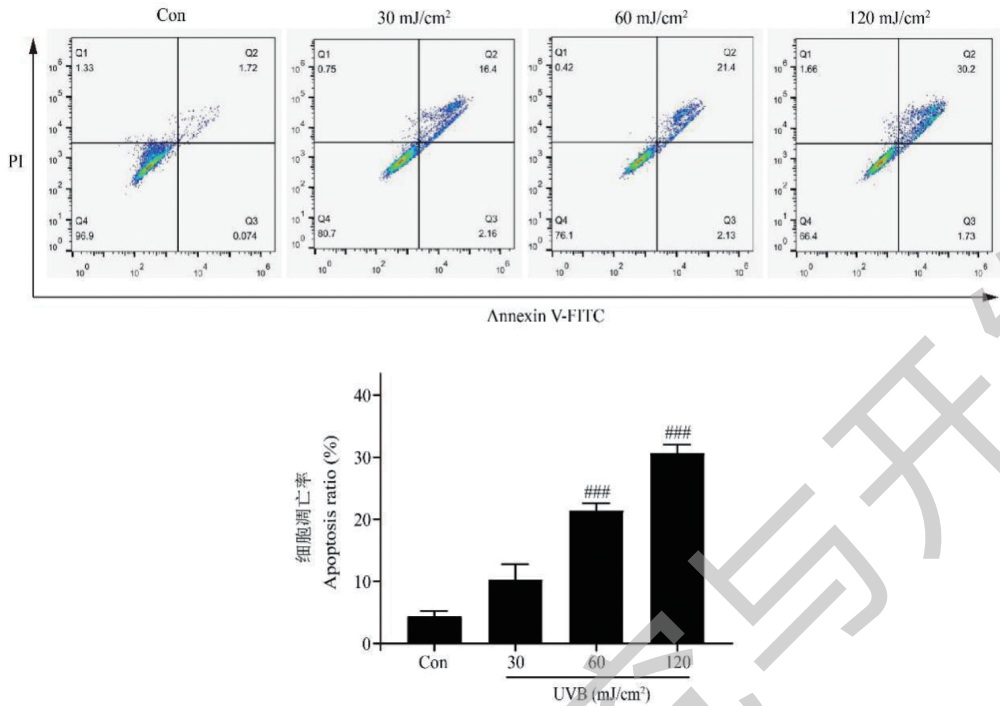


图 8 不同剂量 UVB 对 HaCaT 细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of different UVB doses on the apoptosis rate of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

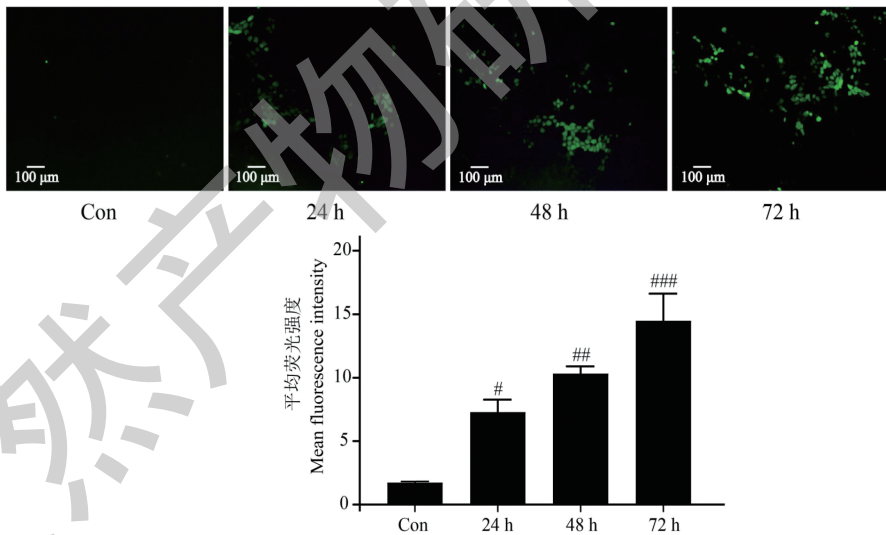


图 9 UVB 对不同孵育时间 HaCaT 细胞内 ROS 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Impact of UVB on the ROS levels in HaCaT cells under different incubation time conditions ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.2.2 ICA 毒性和剂量的筛选

MTT 实验结果显示,当 ICA 浓度低于 16 μmol/L 时,对 HaCaT 细胞无明显毒性($P < 0.001$),细胞活力维持在较高水平,表明低浓度 ICA 对细胞生长无显著抑制作用。基于上述结果,进一步筛选 ICA

在光老化模型中的有效药物浓度。结果显示,3.2 和 6.4 μmol/L 的 ICA 对 HaCaT 细胞无毒,并且能够显著提高 UVB 照射后 HaCaT 细胞的存活率($P < 0.05, P < 0.01$),表明这两个浓度的 ICA 对 UVB 诱导的细胞损伤具有显著的保护作用(见图 11)。

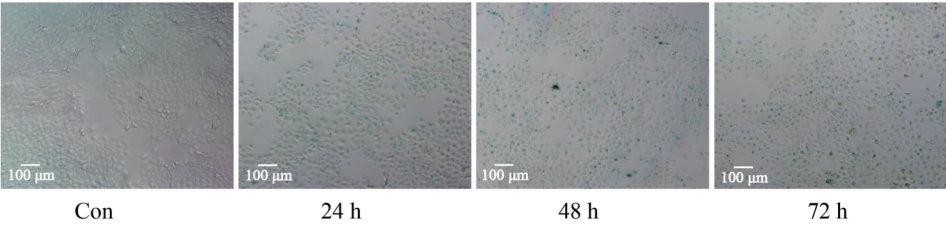


图 10 UVB 对不同孵育时间 HaCaT 细胞 β -半乳糖苷酶染色情况的影响

Fig. 10 Effect of UVB on β -galactosidase staining in HaCaT cells under different incubation time conditions

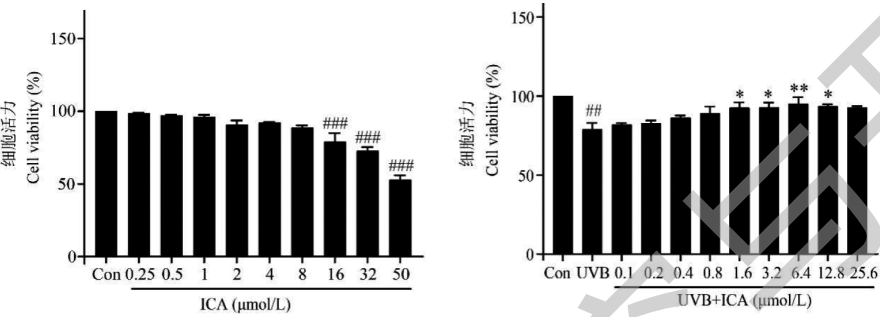


图 11 不同剂量 ICA 和 UVB 照射对 HaCaT 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 11 Effects of different doses of ICA and UVB irradiation on the viability of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

注:与 UVB 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。Note: Compared with UVB group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.2.3 ICA 对 HaCaT 细胞凋亡率的影响

流式结果显示,与 Con 组相比,UVB 组 HaCaT 细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$)。与 UVB 组相比,

ICA-L 和 ICA-H 组 HaCaT 细胞凋亡率均显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$),表明 ICA 能够有效抑制 UVB 诱导的细胞凋亡,且高剂量组的抑制效果更好(见图 12)。

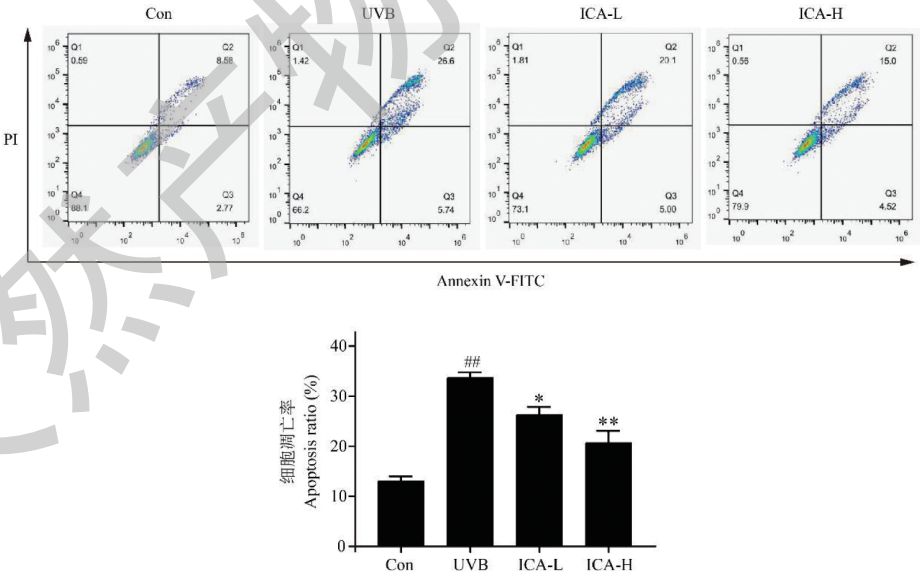


图 12 ICA 对 HaCaT 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of ICA on the apoptosis rate of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2.4 ICA 对 HaCaT 细胞形态和荧光强度的影响

为了进一步探讨 ICA 对 HaCaT 细胞形态和荧

光强度的影响,本研究采用 Hoechst 染色法进行实验验证(见图 13)。与 Con 组相比,UVB 组 HaCaT

细胞凋亡率显著升高($P < 0.001$),其凋亡细胞荧光强度明显增加,细胞核呈现出致密浓染和碎片化致密浓染的凋亡特征。与 UVB 组相比,ICA-H 组细胞

凋亡率显著降低($P < 0.01$),表明高剂量 ICA 对 UVB 诱导的细胞凋亡具有显著的抑制作用。ICA-L 组凋亡率虽有下降趋势,但未达到统计学显著性差异。

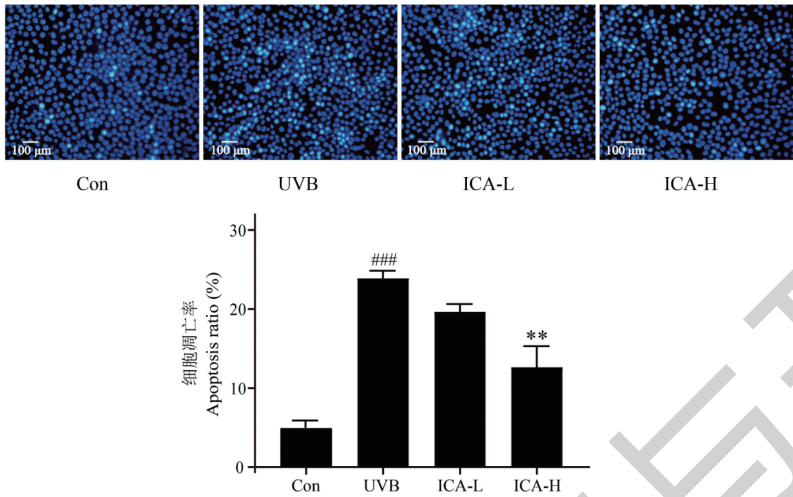


图 13 ICA 对 HaCaT 细胞形态和荧光强度的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effects of ICA on the morphology and fluorescence intensity of HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2.5 ICA 对 HaCaT 细胞衰老的影响

β -半乳糖苷酶染色结果显示,与 Con 组相比,UVB 组被蓝染成阳性细胞数目增多($P < 0.01$),表明 UVB 照射显著诱导了细胞的衰老。与 UVB 组相

比,ICA-L 和 ICA-H 组蓝色阳性细胞量显著减少,细胞衰老水平显著降低($P < 0.05, P < 0.01$),提示 ICA 能够有效抑制 UVB 诱导的细胞衰老(见图 14)。

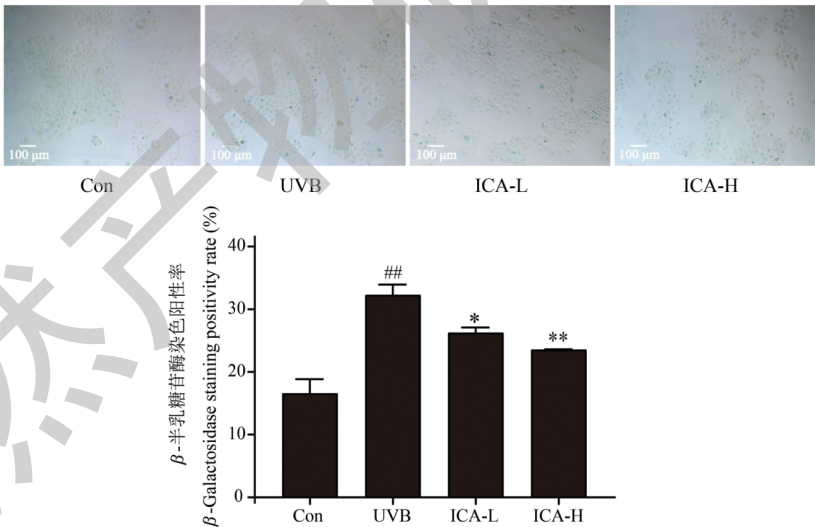


图 14 ICA 对 HaCaT 细胞 β -半乳糖苷酶染色阳性率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 14 Effect of ICA on the β -Galactosidase staining positivity rate in HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2.6 ICA 作用后 PI3K/AKT 信号通路和凋亡相关蛋白表达的变化

Western blot 结果显示,与 Con 组相比,UVB 组和 ICA 组 PI3K、AKT 的蛋白表达无明显变化,UVB 组中 BAX、Cleaved Caspase-3 的蛋白表达增加,p-

PI3K、p-AKT、BCL-2 的蛋白表达减少($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$)。与 UVB 组比较,ICA 组 BAX、Cleaved Caspase-3 的蛋白表达减少,p-PI3K、p-AKT、BCL-2 的蛋白表达增加($P < 0.05, P < 0.01$),(见图 15)。

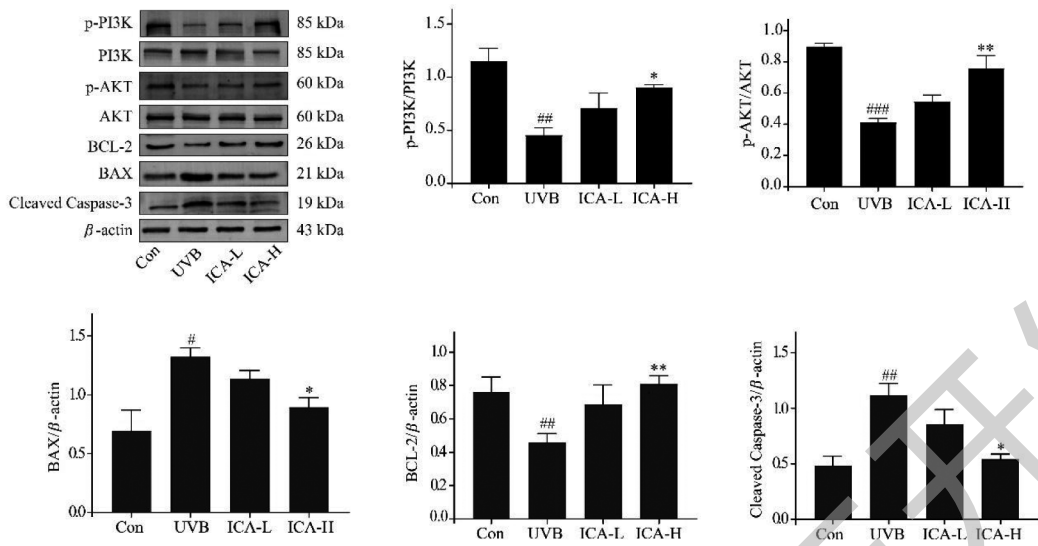


图 15 ICA 对 HaCaT 细胞 PI3K/AKT 通路和凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 15 Effect of ICA on the expression of PI3K/AKT pathway proteins and apoptosis-related proteins in HaCaT cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

皮肤老化受遗传、代谢和环境等多种因素影响，其中紫外照射是外源性老化的重要因素，尤其是中波紫外线 UVB，其波长短、能量高，主要损伤皮肤的表皮层，是光老化的重要原因^[12-14]。HaCaT 细胞是表皮的主要细胞，在光老化过程中是 UVB 的首要损伤目标^[15,16]。因此，本实验以 HaCaT 细胞作为研究对象，研究 ICA 对其的影响，这对于揭示延缓皮肤光老化的机制具有重要意义。

网络药理学结果：在 PPI 网络分析中，筛选出 10 个核心靶点，其中，HIF1A 与 STAT3 存在协同作用，紫外线照射激活 HIF1A，STAT3 进一步增强其转录活性，影响下游基因表达^[17]；HSP90AA1 作为分子伴侣，能稳定 MDM2 蛋白，影响 p53 的活性，参与 DNA 损伤响应和修复^[18]。BCL-2 通过抑制 Caspase-3 的活性来阻止细胞凋亡。紫外线刺激会抑制 BCL-2 功能，并激活 Caspase-3，引发皮肤细胞凋亡^[19]。同时，分子对接显示，ICA 与前五个核心靶点（HIF1A、STAT3、BCL-2、Caspase-3、PTEN）结合能均 ≤ -5 kcal/mol。其中 Caspase-3 和 BCL-2 与 ICA 结合亲和力较强。表明它们在皮肤光老化中占据重要地位，并可能成为 ICA 干预皮肤光老化的重要靶点。

GO 分析结果显示：在分子功能上，BCL-2 蛋白通过与促凋亡蛋白 BAX 结合形成复合物，抑制 BAX 激活，展现出显著的蛋白结合功能^[20]。在细胞组分上，BCL-2 主要定位于线粒体外膜，这是其发挥抗凋亡作用的关键场所^[21]。在生物过程上，BCL-2 通过

抑制 BAX 的激活，减少细胞色素 C 等促凋亡物质的释放，从而实现抗凋亡效果^[22,23]。实验结果进一步证实，ICA 能够上调 BCL-2 蛋白的表达，同时下调 BAX 蛋白的表达，进而抑制 HaCaT 细胞的凋亡，这表明 ICA 具有潜在的抗凋亡作用。

KEGG 富集分析显示，ICA 延缓皮肤光老化主要涉及 MAPK 信号通路、p53 信号通路和 PI3K/AKT 信号通路等。紫外线激活 MAPK 信号通路和诱导 DNA 损伤激活的 p53 信号通路^[24,25]，均与皮肤光老化密切相关。PI3K/AKT 信号通路中，PI3K 激活后招募并活化 AKT，AKT 活化后能增强抗凋亡蛋白 BCL-2 的转录，抑制促凋亡蛋白 BAX 的激活，并抑制半胱氨酸蛋白酶级联反应，从而发挥抗凋亡作用，延缓皮肤光老化^[26-28]。实验结果进一步验证了 ICA 通过激活 PI3K/AKT 信号通路，增强 BCL-2 转录并抑制 BAX 及半胱氨酸蛋白酶级联反应，发挥抗凋亡作用，进而延缓皮肤光老化。

综上所述，ICA 通过调节 PI3K-AKT 信号通路及其下游凋亡相关蛋白的表达，显著抑制 UVB 诱导的细胞凋亡，延缓皮肤光老化。ICA 具有抗炎、抗氧化等药理活性，能有效抑制紫外线诱导的细胞损伤和衰老标志物的表达，展现出延缓皮肤光老化的潜力。然而，目前研究多为体外和动物实验，其在人体皮肤中的安全性和疗效还需更多临床试验验证。随着研究的深入，有望进一步探索 ICA 在人体皮肤光老化中的作用机制，积累更多临床数据，为开发抗光老化产品提供有力支持，推动其在皮肤健康领域实现更广泛的应用。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00362>) 中访问获取。

参考文献

- Haykal D, Flament F, Mora P, et al. Unlocking longevity in aesthetic dermatology: epigenetics, aging, and personalized care[J]. Int J Dermatol, 2025. DOI:10.1111/ijd.17725.
- Csekes E, Račková L. Skin aging, cellular senescence and natural polyphenols[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22:12641.
- Zhong XJ, Deng Y, Yang HQ, et al. Role of autophagy in skin photoaging: a narrative review [J]. Medicine (Baltimore), 2024, 103:e37178.
- Rao MR, Zeng F, Zhong M, et al. The effects of proanthocyanidins on UVB-induced apoptosis and oxidative damage in human skin fibroblasts[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2022, 44:4044-4049.
- Eckhart L, Zeeuwen PLJM. The skin barrier: epidermis vs environment[J]. Exp Dermatol, 2018, 27:805-806.
- Gallegos-Alcalá P, Jiménez M, Cervantes-García D, et al. The keratinocyte as a crucial cell in the predisposition, onset, progression, therapy and study of the atopic dermatitis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22:10661.
- Wang YC, Peng HX, Xia ZL, et al. Research progress on the pharmacological actions and applications of icariin [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2023, 41:182-186.
- Wang XC, Wang J, Tian L. Icariin ameliorates TNF- α /IFN- γ -induced oxidative stress, inflammatory response and apoptosis of human immortalized epidermal cells through the WTAP/SERPINB4 axis[J]. Arch Dermatol Res, 2024, 316:557.
- He X, Wan F, Su WH, et al. Research progress on skin aging and active ingredients[J]. Molecules, 2023, 28:5556.
- Deng F, Hou L, Wang Y, et al. Icariin affects the expression of treg cells in naturally aged mice by regulating the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. J Hainan Med Univ(海南医科大学学报), 2025, 31:506-512.
- Yang SQ, Zhang CC, Ma QY, et al. Preliminary exploration of the protective effect of icariin on D-galactose-induced damaged TM4 sertoli cells by activating the Nrf2 signaling pathway[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2021, 33:577-584.
- Hussein RS, Dayel SB, Abahussein O, et al. Influences on skin and intrinsic aging: biological, environmental, and therapeutic insights[J]. J Cosmet Dermatol, 2025, 24:e16688.
- Bielach-Bazyluk A, Zbroch E, Mysliwiec H, et al. Sirtuin 1 and skin: implications in intrinsic and extrinsic aging-a systematic review[J]. Cells, 2021, 10:813.
- Yang JW, Fan GB, Tan F, et al. The role and safety of UVA and UVB in UV-induced skin erythema[J]. Front Med(Lausanne), 2023, 10:1163697.
- Jin M, Liu LP, Li YM. Advances in the culture of mouse keratinocytes[J]. J Jiangsu Univ: Med(江苏大学学报:医学版), 2021, 31:536-540.
- Tang XY, Yang TY, Yu DJ, et al. Current insights and future perspectives of ultraviolet radiation (UV) exposure: friends and foes to the skin and beyond the skin[J]. Environ Int, 2024, 185:108535.
- Dinarello A, Betto RM, Diamante L, et al. STAT3 and HIF1 α cooperatively mediate the transcriptional and physiological responses to hypoxia[J]. Cell Death Discov, 2023, 9:226.
- Geng RX, Kang SG, Huang KL, et al. Boosting the photoaged skin: the potential role of dietary components[J]. Nutrients, 2021, 13:1691.
- Ali D, Tripathi A, Ali HA, et al. ROS-dependent Bax/Bcl2 and caspase 3 pathway-mediated apoptosis induced by zineb in human keratinocyte cells[J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:489-497.
- Croce CM, Vaux D, Strasser A, et al. The BCL-2 protein family: from discovery to drug development[J]. Cell Death Differ, 2025. DOI:10.1038/s41418-025-01481-z.
- Wang ZL, Chen XW, Liu N, et al. A nuclear long non-coding RNA LINC00618 accelerates ferroptosis in a manner dependent upon apoptosis[J]. Mol Ther, 2021, 29:263-274.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275:1129-1132.
- King LE, Hohorst L, García-Sáez AJ. Expanding roles of bcl-2 proteins in apoptosis execution and beyond[J]. J Cell Sci, 2023, 136:jcs260790.
- Prasanth MI, Gayathri S, Bhaskar JP, et al. Understanding the role of p38 and JNK mediated MAPK pathway in response to UV-A induced photoaging in *Caenorhabditis elegans* [J]. J Photochem Photobiol B, 2020, 205:111844.
- Loureiro JB, Ribeiro R, Nazareth N, et al. Mutant p53 reactivator SLMP53-2 hinders ultraviolet B radiation-induced skin carcinogenesis[J]. Pharmacol Res, 2022, 175:106026.
- Cao YC, Wen HB, Leng CQ, et al. MiR-29a mediates the apoptotic effects of TNF- α on endothelial cells through inhibiting PI3K/AKT/BCL-2 axis [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2024, 38:e23598.
- Jaiswal N, Gavin M, Loro E, et al. AKT controls protein synthesis and oxidative metabolism via combined mTORC1 and FOXO1 signalling to govern muscle physiology[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2022, 13:495-514.
- Li JR, Sun MX, Tang M, et al. Mechanism of PI3K/Akt-mediated mitochondrial pathway in obesity-induced apoptosis (review)[J]. Biomed Rep, 2025, 22:40.