

基于网络药理学及体外实验探究中草药组方 协同调节皮肤老化的作用机制

冯春波

(上海家化联合股份有限公司研发中心, 上海, 200082)

摘要

人体皮肤结构和稳态平衡被破坏的主要原因有真皮层细胞外基质蛋白降解、DNA损伤和氧化应激等因素。本文采用有皮肤抗衰老性能报道的中草药(Traditional Chinese Medicine, TCM),探索其不同组合的组方,包括人参、黄精、桂花、昙花和莲,基于网络药理学预测不同TCM组方的潜在功效靶点和抗衰老机制,比较了不同组方在皮肤中的生物活性组间区别,探究了不同组方中草药的抗衰老效果。通过体外实验多维度验证不同组方在相同浓度下的协同作用。结果显示,五味中草药组方比人参、黄精、昙花三味组方以及单味人参,具有在胶原蛋白促生、SA-β-半乳糖苷酶降低、γH2AX诱导的DNA损伤降低等方面更强的抗皮肤衰老效果。

关键词: 中草药组分; 中草药提取物组方; 网络药理学; 皮肤衰老

作者简介: 冯春波, 博士, 上海家化联合股份有限公司产品总监, 长期从事美妆&婴童产品开发和功效研究。E-mail: fengchunbo@jahwa.com.cn。



皮肤衰老是皮肤完整性降低和生理功能退化的结果, 其由内外因素共同作用导致^[1]。皮肤每天暴露于导致衰老的外在因素中, 如紫外线照射、污染、机械和细菌压力等, 与此同时, 遗传、种族差异、氧化应激和激素变化等也导致内源性衰老和内部机制功能下降^[2]。Lopez等描述了衰老的九个标志, 即基因组不稳定性、端粒损耗、表观遗传改变、蛋白质稳态丧失、营养感应失调、线粒体功能障碍、细胞衰老、干细胞耗竭、细胞间通讯改变等, 并由Schmauck等补充了其他衰老标志, 如自噬功能受损、微生物组干扰、机械特性改变、剪接失调和炎症^[2-3]。以上标志物表征了皮肤衰老表型, 并且可以利用特定标志物进行老化研究, 如β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)是研究细胞进入衰老的“开关”机制的主要标志物^[4], γH2AX标志物是DNA双链断裂损伤的“传感器”^[5], 这些都可以用来跟踪基因组不稳定性。此外, 随着皮肤老化, 衰老细胞胞外基质标志物如胶原蛋白I型和胶原蛋白III型的蛋白质合成降低、mRNA表达减少^[6-7]等等。

中医中草药是中国古代最大的原始创新之一, 具有2000多年历史和浩如烟海的经典古籍记载, 其治疗疾病的形式, 如针灸、按摩、食疗和中草药组方内服或外敷等。中草药组方是个大宝藏, 在现代应用中逐渐衍生至化妆品, 其护肤功效不仅经过历史长河的验证, 而且具有标本兼治、内外兼养、根源起效的特点, 在改善人体皮肤外观和老化中起着关键作用。

人参是知名度较高的中草药之一, 它具有改善脂质和

葡萄糖代谢、抗氧化、抑制细胞凋亡、保护肌肤免受光损伤等有益作用^[8]。人参中的主要生物活性成分为人参皂苷, 其中Rb1、Rb2、Rc、Re和Rg1最具代表性^[9-11]。

黄精是一味重要的中草药, 其通过抗炎、抗氧化来对抗老化相关的问题^[12]。

昙花, 也被称为“夜间女王”, 是一种鲜为人知的传统药材, 通过改善伤口愈合、抗氧化、抗菌等发挥作用^[13-14]。

莲是中医学中一种重要而有效的药材, 在亚洲也是神圣的象征。最近的分子学研究表明, 莲可能是1.38亿年前就已经存在的“活化石”, 在一定环境下, 莲子可能会存活数百年^[15]。这种生存潜力赋予莲强大的生命力, 通过其次级代谢物可对抗衰老过程。莲也与健康和愈合相关, 它与皮肤衰老相关的靶向标志物, 包括皮肤水合作用、屏障功能、皱纹、脂肪分解和皮肤色素沉着等关系密切^[16]。

桂花作为民间医药更是有数千年的历史。据报道, 桂花花提取物具有清除自由基、抗炎等多种生物活性^[17], 其皮肤美白特性也常用于化妆品中^[18]。

文献中很少描述与不同中草药组方协同作用相关的研究。在这项研究中, 文章沿袭经典五行焕肌之古方灵感, 将“太玄草五行丹”进行现代演绎, 评估了中草药提取物的不同组方(人参根提取物, 多花黄精根茎/根提取物, 昙花花提取物, 莲提取物和桂花花提取物)。首先, 使用每种提取物中的主要组分和已验证的功效靶点进行网络药理学分析, 以预测潜在的、协同功效活性靶点和作用机制。其

次，通过多维度体外研究评估网络药理学预测的结果。证明了中草药提取物组方的抗衰老潜力集中在不同的高功效靶点上，且这些靶点作用在维持皮肤结构和年轻方面具有重要作用。

1. 材料和方法

1.1 中草药提取物

人参根提取物、多花黄精根茎/根提取物和昙花花提取物由上海家化联合股份有限公司制备，按照文献^[19]中报告的制备程序进行浸提。莲提取物是采用文献^[20]中描述工艺获得。桂花花提取物采用如文献^[21]描述的方法进行开发获得。

1.2 中草药提取物组分鉴定

采用紫外分光光度计、高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)和核磁共振(NMR)鉴定昙花花提取物的主要组分。采用高效液相色谱结合紫外分光光度计和荧光检测器鉴定人参根提取物组分。采用紫外光谱仪、红外光谱仪、质谱仪和核磁共振谱仪鉴定多花黄精根茎/根提取物中的主要化合物组分。采用高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-MS)鉴定桂花花提取物组分。根据各提取物中鉴定组分，使用Pubchem数据库(PubChem(nih.gov))检索每种提取物中组分的分子信息输入系统(SMILES)文件。

1.3 中草药提取物组方

将这些提取物的不同组方用于网络药理学和体外分析：(i) 仅0.5%人参根提取物(1 TCM)，(ii) 3 TCM中草药提取物的组方：0.167%人参根提取物、0.166%多花黄精根茎/根提取物和0.167%昙花花提取物(3 TCM)，(iii) 5 TCM中草药提取物的组方：0.1%人参根提取物、0.1%多花黄精根茎/根提取物、0.1%昙花花提取物、0.1%桂花花提取物和0.1%莲提取物(5 TCM)(表1)。

表1 TCM组方的组成

| TCM 中草药提取物 | 1 TCM | 3 TCM | 5 TCM |
|----------------|-------|-------|-------|
| 人参根提取物 /% | 0.5 | 0.167 | 0.1 |
| 多花黄精根茎/根提取物 /% | / | 0.166 | 0.1 |
| 昙花花提取物 /% | / | 0.167 | 0.1 |
| 桂花花提取物 /% | / | / | 0.1 |
| 莲提取物 /% | / | / | 0.1 |
| 总计 /% | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

1.4 验证靶点

一些TCM中草药提取物已在先前的体外生物学分析中

单独进行了测试。昙花花提取物具有7个有效靶点。多花黄精根茎/根提取物有6个有效靶点。桂花花提取物和莲提取物分别调节2个和15个靶点^[16, 22]，如下表2所示。

表2 中草药提取物的体外验证靶点

| TCM 中草药提取物 | Uniprot ID |
|------------|--|
| 昙花 | P02452, P02461, P02462, Q02388, P15502, P07585, P13611 |
| 黄精 | P05231, P10145, P13500, P03956, P16104, P38936 |
| 莲 | P08246, Q92839, Q92819, O00219, P20930, Q92482, P02452, P35354, P10145, P08254, P14679, P17643, P40126, Q05469, Q99685 |
| 桂花 | P20930, P14679 |

1.5 靶点预测

通过在已发布的数据库SwissTargetPrediction上输入每种提取物组分的SMILES文件进行靶点预测^[23]，并基于靶点/配体相似性原理进行分子对接处理。然后，通过Uniprot ID列出与每种TCM中草药提取物对应的预测靶点，合并同时删除重复的靶点。

1.6 基因富集分析

利用DAVID生物信息数据库(the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery)(david.abcc.ncifcrf.gov)进行靶点富集^[24-25]。基因富集分3部分进行：(i) 1 TCM的预测靶基因，(ii) 3 TCM的预测靶基因和已验证的体外靶点，(iii) 5 TCM的预测靶基因和已验证的体外靶点。DAVID应用程序提供了功能注释，即基于修订的Fisher精确检验(EASE评分)来理解上述靶基因的生物学意义^[25]。用于选择功能性注释的p值的水平阈值设置为0.05。DAVID数据库提供了丰富的生物学信息，尤其是基因本体论(GO)通路，与KEGG途径相关的通路，以及WikiPathways和Reactome数据源。对1 TCM、3 TCM和5 TCM组方的结果进行注释通路的横向比较。

1.7 细胞培养

对于I型和III型胶原蛋白检测，使用正常人真皮成纤维细胞(NHDF)(广东博溪生物技术有限公司，Lot#Fb19052002)在低糖DMEM培养基(Gibco)中以 2×10^5 个细胞接种于6孔板中，在37°C、含有5%CO₂的培养箱中培养过夜。在40%~60%密度时，采用100 ng/ml TGFβ1作为阳性对照，并用不同的TCM组方(表1)处理细胞24小时。24小时后，将每个孔用PBS 1X洗涤2次。该实验独立重复3次。

评价SA-β-半乳糖苷酶活性和γH2AX检测实验

中，将 NHDF 以 1×10^5 个细胞接种在低糖 DMEM 培养基中（6 孔板），并在含有 5% CO₂ 的培养箱中 37°C 孵育过夜。细胞采用 H₂O₂ 应激诱导 DNA 损伤和衰老^[4-5]。将细胞用 400 μM H₂O₂ 在无血清培养基中处理 2 小时，并用 PBS 1X 洗涤 3 次。用不同的 TCM 组方（表 1）和 100 ng/ml TGF β 1 处理细胞 24 小时。24 小时后，再次用 PBS 1X 洗涤细胞 3 次。以上 2 个步骤重复 3 次。最后一次用 TCM 组方和 TGF β 1 处理后，将细胞传代培养 5 代。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测胶原 I 和 胶原 III mRNA

通过使用 RNA iso Plus (Takara) 提取总 RNA。使用逆转录试剂盒 (Takara) 从提取的 RNA 合成 cDNA。使用 COL1A1 和 COL3A1 特异性引物 (SYBR Green) 进行 PCR 定量。通过使用比较 Ct 方法确定靶点表达的相对含量。在比较 Ct 方法中，将从两个不同样本中获得的 Ct 值直接标准化为管家基因（肌动蛋白），然后进行比较。最后，结果表示为 3 个独立实验的平均标准偏差 (SD)。

1.9 SA-β-半乳糖苷酶活性的检测

为检测 SA-β-半乳糖苷酶活性，将预先获得的 H₂O₂ 应激的衰老细胞在 80 ~ 90% 密度时接种于 6 孔板中，并在 37°C、含 5% CO₂ 的培养箱中孵育 24h。将细胞用 PBS 1X 洗涤 1 次，并使用如供应商方法中所述的“SA-β-半乳糖苷酶染色”试剂盒（碧云天）检测 SA-β-半乳糖苷酶活性。用光学显微镜 (Olympus CKX 41) 获取图片，并在十个视野中对蓝色染色的细胞进行计数。结果表示为阳性细胞的百分比。

1.10 蛋白质印迹检测 γH2AX

蛋白质印迹分析衰老相关蛋白 γH2AX 的表达。将细胞在 RIPA 裂解缓冲液中裂解，并使用 SDS-12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离蛋白质，并印迹到 Immobilon P 膜 (Millipore) 上。然后，分别以 1: 200 和 1: 10000 稀释度使用 γH2AX (Abcam) 和 β-肌动蛋白抗体，并以 1: 2000 和 1: 10000 稀释度使用二级山羊抗体 IgG HRP (Bio-Rad)。采用 Tanon 5200 多功能化学发光图像分析系统进行检测。通过 Band-Scan 软件 (PROZYME, San Leandro, California) 进行蛋白质条带的定量。

1.11 统计

使用 GraphPad Prism (GraphPad 软件) 对数据作图，表示为平均值 ± SD。学生 t 检验统计分析用于组间比较，并且统计分析是双尾的 Dunnett 检验。认为 $p \leq 0.05$ 具有

显著性， $p \leq 0.01$ 具有非常显著性， $p \leq 0.005$ 具有高度显著性。

2. 结果

2.1 TCM 提取物中主要成分

对 4 种 TCM 提取物的分析研究中鉴定出组分化合物 (表 3)。昙花花提取物的主要植物组分是槲皮素 3-O-β-D-半乳糖苷和异鼠李素。人参根提取物中含有人参皂苷 Rg1、Rb1 和 Re。多花黄精根茎/根提取物中的主要组分是山奈酚、鹅掌楸素和杨梅素。桂花花提取物含有咖啡酸、对香豆酸和丁香酸。

表 3 中草药提取物中主要的组分化合物

| 中草药提取物 | 主要组分 |
|-------------|----------------------|
| 昙花花提取物 | 槲皮 3-O-β-D-半乳糖苷、异鼠李素 |
| 人参根提取物 | 人参皂苷 Rg1、Rb1 和 Re |
| 多花黄精根茎/根提取物 | 山奈酚、鹅掌楸素和杨梅素 |
| 桂花花提取物 | 咖啡酸、对香豆酸和丁香酸 |

2.2 靶点预测

通过 Wang 文章^[26] 中优化的工作流程进行网络药理学分析 (图 1)。基于中草药提取物中主要组分的 SwissTarget 预测识别出昙花花提取物的 120 个潜在靶点、人参根提取物的 33 个靶点、多花黄精根茎/根提取物的 120 个靶点和桂花花提取物的 72 个靶点。对每种 TCM 植物组方的预测靶点和其他 (莲提取物) 已验证的体外验证靶点 (表 2) 进行汇编，可以获得 5 TCM 的 225 个潜在靶点、3 种 TCM 的 173 个潜在靶点和 1 种 TCM 的 33 个潜在靶点 (见附加材料 2)。



图 1 网络药理学分析预测多种中草药提取物组方影响的靶点和生物活性。

2.3 基因富集

用 DAVID 生物信息数据库分析每个 TCM 组方鉴定的基因列表，以确定最相关的潜在生物活性通路和机制。本研究主要预测每种组方在抗衰老上的潜在生物活性方向，确定了以下主要通路：“细胞衰老”、“FOXO 信号传导通路”、“寿命调节通路”、“mTOR 信号传导通路”、自噬调节、线粒体稳态、蛋白水解、泛素化和蛋白酶体功能等，对于 5 TCM 具有更好的显著性 (p 值 5 TCM < p 值 3 TCM < p 值 1 TCM)。另外，抗糖基化潜力预测也被揭示为

AGE/ β -内酰胺酶通路的潜在调节影响皮肤老化^[27]。

此外，5 TCM 和 3 TCM 可能调节衰老相关分泌表型 (SASP)，涉及衰老过程中诱导某些蛋白质分泌，包括炎性细胞因子、生长因子和基质重塑因子^[28]。没有预测表明人参根提取物单独在这些过程中有作用。

该分析强调了 5 TCM 和 3 TCM 的其他潜在的与抗衰老相关的生物活性，如“端粒保护”、“蛋白质折叠完整性/稳态”、“染色体组织”和“DNA 损伤反应”，主要是“碱基切除修复”过程，5 TCM 具有更好的潜在生物活性。

仅在 5 TCM 组方中发现了对组蛋白修饰的潜在影响。有趣的是，通路“组蛋白去甲基化酶活性”可能对应于 SASP 表观遗传调控的 H3K9 和 H3K36 甲基化的调控^[29]。

也鉴定了所有组方的其他潜在生物活性，包括表皮稳态、细胞间粘附和连接等。皮肤屏障的修护和水转运是仅有 5 TCM 预测性通路特征。网络药理学分析显示每种组方对真皮再生、细胞外基质和透明质酸稳态的潜在影响，5 TCM 组方具有更好的显著性潜力 (p 值 5 TCM $< p$ 值 3 TCM $< p$ 值 1 TCM)。5 TCM 组方可能潜在地靶向全身皮肤糖胺聚糖（称为硫酸软骨素）的代谢过程^[30]。鉴定了其他潜在活性，并归因于所有中草药组方，例如调节细胞增殖和分化、免疫反应、抗炎和氧化应激反应。通过已知参与这种反应的芳烃受体途径的潜在调节，突出了对外源性物质或污染物的反应^[31]。

网络药理学分析可以预测 TCM 组方在抗衰老方面的强大能力，从而为以下有关真皮蛋白、衰老和 DNA 损伤的体外研究提供方向。也预测了皮肤生物学的其他领域，如脂肪细胞稳态、脂质代谢、维生素稳态和代谢、肤色调节、褪黑激素代谢、HSP 90 和大麻素途径，对于 5 TCM 组方研究也具有潜在的意义。

2.4 胶原 mRNA 表达

与对照组比较，用 1 TCM、3 TCM 和 5 TCM 组方处理的细胞中 COL1A1 mRNA 表达分别显著增加 29%、44%、92%（图 2），这表明 5 TCM 组方具有比 3 TCM 应用更好的功效，3 TCM 组方具有比 1 TCM 更好的功效。阳性对照 TGF β 1 诱导的 COL1A1 mRNA 表达增加相当于 5 TCM 条件 (+93%)。

与对照组比较，用 1 TCM、3 TCM 和 5 TCM 组方处理的细胞中 COL3A1 mRNA 表达分别显著增加 55%、72%、113%（图 3）。与 COL1A1 获得的结果趋势一致，在 COL3A1 表达上，5 TCM 具有比 3 TCM 更好的功效，3 TCM 具有比 1 TCM

更好的功效。阳性对照 TGF β 1 诱导 COL3A1 mRNA 表达增加，相当于 3 TCM 条件 (+87%)。

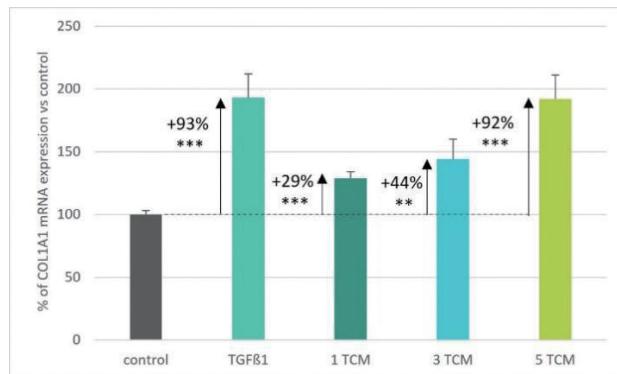


图 2：实时荧光定量 PCR 检测 TCM 组方作用 24h 成纤维细胞中 COL1A1 mRNA 表达。与对照组比较，采用学生 t 检验进行统计分析。(n=3, **: 非常显著, ***: 高度显著)

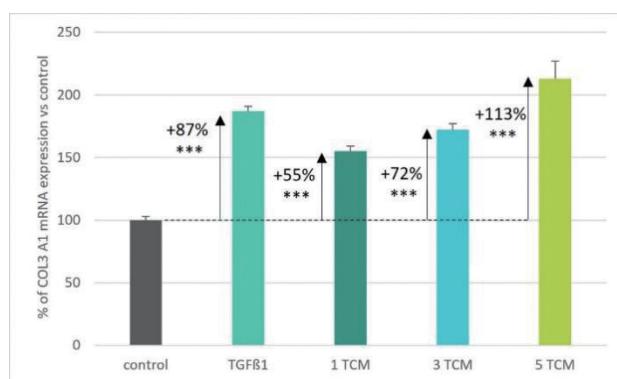


图 3：实时荧光定量 PCR 检测 TCM 组方作用处理 24h 成纤维细胞中 COL3A1 mRNA 表达。与对照组比较，采用学生 t 检验进行统计分析。(n=3, ***: 高度显著)

2.5 SA- β -半乳糖苷酶活性

结果显示，与对照组相比， H_2O_2 应激使阳性衰老细胞的数量增加了 262%，从对照组 5.97% 的 SA- β -gal 阳性细胞增加到 H_2O_2 应激条件下的 21.6%（图 4 (a) (b)）。与应激条件相比，1 TCM 的应用使 SA- β -gal 阳性细胞减少了 50%，而 3 TCM 的应用减少了 90%，5 TCM 的应用减少了 96%。因此，5 TCM 再次表现出比 3 TCM 更好的功效，3 TCM 表现出比 1 TCM 更好的功效。有趣的是，通过减少 SA- β -gal 阳性细胞 (~88%)，TGF β 1 条件具有与 3 TCM 相同的功效。

2.6 γ H2AX 蛋白传感器评价 DNA 损伤

为了进一步研究中草药提取物组方的抗衰老特性，在 H_2O_2 衰老细胞中进行 γ H2AX 检测。与对照组相比，在 H_2O_2 应激衰老细胞中观察到 γ H2AX 蛋白的高度显著增加（图 5 (a) (b)）。1 TCM、3 TCM 和 5 TCM 组方应用可使 H_2O_2 衰老细胞 γ H2AX 蛋白水平下降（分别为 -87%、-32%、-94%）。5 TCM 组方可使 γ H2AX 水平恢复到基础

水平。同样，TGF β 1的效果与3 TCM相当（-39%）。

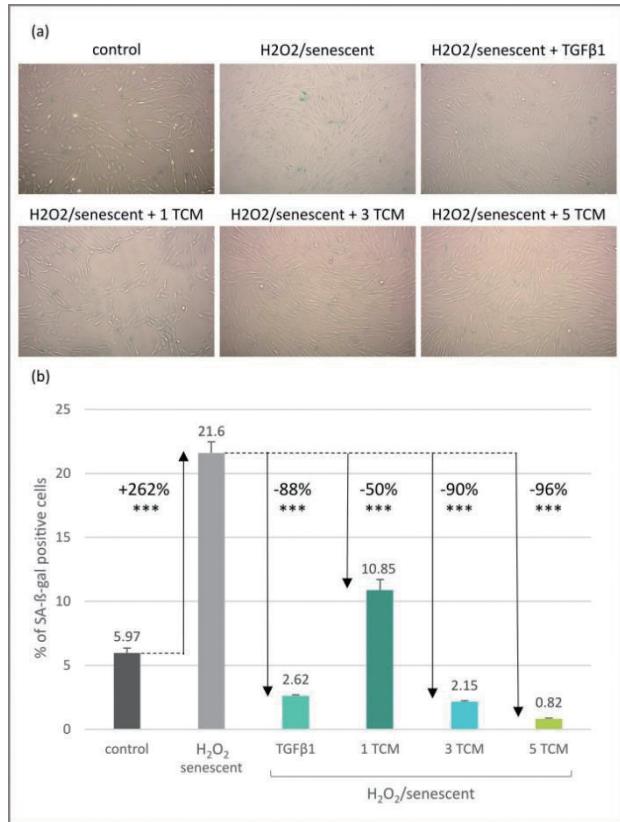


图4:(a)TCM组方或TGF β 1孵育24h后，H₂O₂应激的成纤维细胞中的SA- β -gal阳性细胞(x100)。(b)各条件下SA- β -gal阳性细胞的百分比。H₂O₂衰老组与对照组比较，其他组与H₂O₂/衰老组比较，采用学生t检验进行统计分析，(n=3, ***:高度显著)

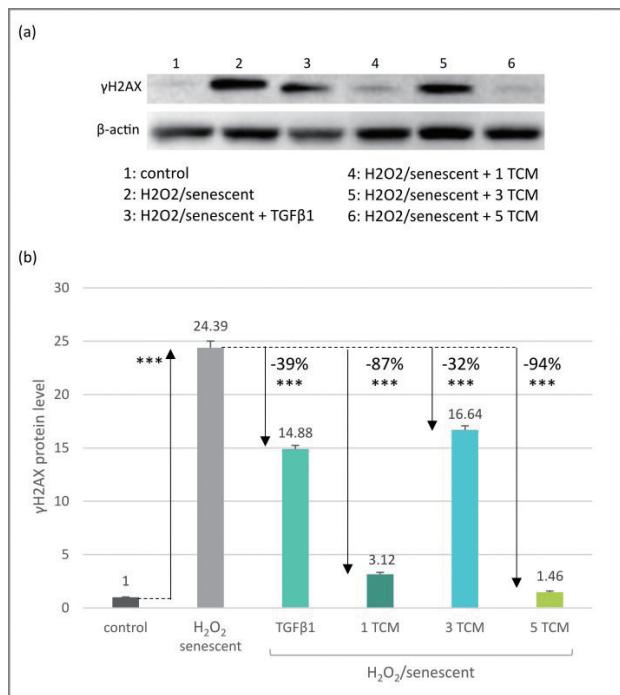


图5:(a)使用蛋白质印迹分析TCM组方处理的H₂O₂衰老细胞中的 γ H2AX表达。(b)TCM组方处理的H₂O₂衰老细胞中的 γ H2AX表达水平。H₂O₂/衰老组与对照组比较，其他组与H₂O₂/衰老组比较，采用学生t检验进行统计学分析，(n=3, ***:高度显著)

3.讨论与结论

TCM作为中医治疗手段已历经千年的实效验证，大量典籍记载中草药可帮助人体肌肤恢复到健康和谐的状态。在TCM研究和应用中，由于每种中草药的药性和特性不同，常常使用中草药组方来进行研究和实验。本研究中，以具有改善皮肤衰老功效的中草药组方，通过网络药理学研究来预测不同组方的强大抗衰老潜力，通过揭示真正的抗老通路和机制，发现主要聚焦在“细胞衰老”，“长寿基因调节途径”等方面，通路“氧化应激反应”也预测了所有中草药组方的抗氧化能力。5 TCM组方具有较好的预测效果。这些预测的通路和机制在体外评估1 TCM、3 TCM和5 TCM组方逆转H₂O₂诱导成纤维细胞中抗衰老能力和效果得到证实。1 TCM、3 TCM和5 TCM治疗H₂O₂/衰老细胞中SA- β -gal阳性细胞水平降低，且5 TCM治疗效果更好。对3 TCM和5 TCM组方在DNA保护活性上也进行了预测，其中5 TCM组方对DNA的保护作用更好。体外研究表明，5 TCM用药可降低 γ H2AX蛋白水平，减轻H₂O₂/衰老细胞的DNA损伤。这些结果证实了5 TCM和3 TCM组方在防止DNA损伤方面的预测性能。因此，关于抗衰老和基因组稳定性，3和5 TCM组方的预测性抗衰老效果是准确的。此外，生物信息学预测显示每种组方对真皮再生和细胞外基质稳定的潜在影响，5 TCM具有更好的作用。该预测通过成纤维细胞中胶原蛋白I和III的增加而得到证实，并且5 TCM的效果也更好。网络药理学的整体预测准确性使我们能够假设5 TCM组方是抵抗皮肤老化和改善皮肤稳态的最佳配方，最后，体外结果证实了这一预测。

靶点预测是理解中草药提取物组分作用机制的关键工具。在本研究中，通过对TCM组方在皮肤抗衰老生物学效应方面预测和体外验证分析相结合，证明预测的准确性。此外，与实验筛选相比，靶点预测是一种计算成本低、效率高的预测方法，并且它仍在继续发展。

然而，网络药理学分析具有局限性，这取决于生物信息学工具中化学和生物学数据的可用性。在本研究中，我们将体外评价限制在通过网络药理学预测确定的几个生物过程中。需要进一步的实验来验证其他预测的效果。

总之，网络药理学分析是一种非常实用的工具，有助于筛选更好的中草药组方以最大化抗衰老活性，并能够提供有关靶向生物活性的大量数据，实现科学循证和对因护

肤。五种中草药提取物的体外研究证实了对抗皮肤衰老和改善皮肤稳态的巨大影响，其中5 TCM组方获得了最佳结果。

参考文献

- [1] Farage MA, Miller KW, Elsner P, Maibach HI, Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review. *Int J Cosmet Sci.* 30(2) (2008) 87–95.
- [2] López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, and Kroemer G, The Hallmarks of Aging. *Cell.*, 153(6) (2013) 1194–1217.
- [3] Schmauck-Medina T, Mollière A, Lautrup S, Zhang J, Chlopicki S, Borland Madsen H, Cao S, Soendenbroe C, Mansell E, Bitsch Vestergaard M, Li Z, Shiloh Y, Opresko PL, Egly JM, Kirkwood T, Verdin E, Bohr VA, Cox LS., Stevensner T, Rasmussen LJ, Fang EF, New hallmarks of ageing: a 2022 Copenhagen ageing meeting summary. *Aging (Albany NY)*. 31; 14(16) (2022) 6829–6839.
- [4] Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20) (1995) 9363–7.
- [5] Mah LJ, El-Osta A. & Karagiannis T. γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, 24 (2010) 679–686.
- [6] Levi N, Papismadov N, Solomonov I, Sagi I, Krizhanovsky V. The ECM path of senescence in aging: components and modifiers. *FEBS J*, 287(13) (2020) 2636–2646.
- [7] Lago JC, Puzzi MB. The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLoS One.*, 14 (7) (2019) e0219165.
- [8] Mancuso C and Santangelob R., Panax ginseng and Panax quinquefolius: From pharmacology to toxicology. *Food Chem Toxicol.* 107 (2017) 362–372.
- [9] Liu J, Jiang R, Zhou J, Xu X, Sun Z, Li J, Chen X, Li Z, Yan X, Zhao D, Zheng Z, Sun L, Salicylic acid in ginseng root alleviates skin hyperpigmentation disorders by inhibiting melanogenesis and melanosome transport. *Eur J Pharmacol* 910 (2021) 174458.
- [10] Li Z, Jiang R, Liu J, Xu X, Sun L, Zhao D, Panax ginseng C. A. Meyer Phenolic Acid Extract Alleviates Ultraviolet B-Irradiation-Induced Photoaging in a Hairless Mouse Skin Photodamage Model. *Evid Based Complement Alternat Med*, eCollection (2021).
- [11] Li Z, Jiang R, Jing C, Liu J, Xu X, Sun L, Zhao D, Protective effect of oligosaccharides isolated from Panax ginseng C. A. Meyer against UVB-induced skin barrier damage in BALB/c hairless mice and human keratinocytes. *J Ethnopharmacol.* 30(283) (2022) 114677.
- [12] Chen Z, Zhu B, Chen Z, Cao W, Wang J, Li S, Zhao J, Effects of steam on polysaccharides from Polygonatum cyrtonema based on saccharide mapping analysis and pharmacological activity assays. *Chin Med* 17(1) (2022) 97.
- [13] Prajitha P, Suresh A, Deepak VS, Faslu H, A review on Epiphyllum oxypetalum (DC) Haw. *Asian Journal of Research in Chemistry and Pharmaceutical Sciences.* 7(3) (2019) 824–830.
- [14] Mahmad A, Shaharun MS, Saad B, Dash GK, Epiphyllum oxypetalum haw.: a lesser-known medicinal plant. *IAJPS*, 4(10) (2017) 3670–3672.
- [15] Shen-Miller J, Mudgett MB, Schopf JW, Clarke S and Berger R, Exceptional seed longevity and robust growth: ancient Sacred Lotus from China. *American Journal of Botany* 82 (1995) 1367–1380.
- [16] Lebleu A, Bressier G, Gondran C, Imbert I, Cucumel K, Dueva-Koganov O, Zhang L, Duev A, Koganov M and Domloge N, 2017. Powerful comprehensive benefits of *Nelumbo nucifera* (lotus) extract targeting attributes of skin appearance associated with skin aging. Poster IFSCC 2017.
- [17] Lee HH., Lin CT., Yang LL, “Neuroprotection and free radical scavenging effects of *Osmanthus fragrans*.”, *Journal of Biomedical Science* 14(6) (2007) 819–827.
- [18] Le DD, Lee YE, Lee M, Triterpenoids from the leaves of *Osmanthus fragrans* var. *aurantiacus* with their anti-melanogenesis and anti-tyrosinase activities. *Nat Prod Res*, 36(24) (2022) 6414–6420.
- [19] Zhao YF, Zhu L, Yang L, Chen M, Sun P, Ma Y, Zhao Y, Jia HD. In vitro and in vivo anti-eczema effect of *Artemisia annua* aqueous extract and its component profiling. *Journal of Ethnopharmacology* 318 (2024) 117065.
- [20] Koganov M., U.S. Patent No. 7,442,391 B2, Bioactive Botanical Cosmetic Compositions and Processes for Their Production, Publication Date Oct 28 (2008).
- [21] Oger E, Mur L, Lebleu A, Bergeron L, Gondran C, Cucumel K. Plant Small RNAs: A New Technology for Skin Care. *J Cosmet Sci.* 70(3) (2019) 115–126.
- [22] Koganov M, Menon G, Chakraborty A, Dueva-Koganov O, Zhang L, Duev A, Targeting Key Enzymes of the Melanogenic Pathway with a Novel Lotus Ingredient. *IFSCC magazine* 3 (2016) 119–123.
- [23] Daina A., Michelin O and Zoete V, SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.* 47 (2019) W357–W364.
- [24] Sherman B.T., Hao M., Qiu J., Jiao X., Baseler M.W., Lane H.C., Imamichi T. and Chang W, DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1) (2022.) W216–W221.
- [25] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.*, 4(1) (2009) 44–57.
- [26] Wang ZZ, Jia Y, Srivastava KD, Huang W, Tiwari R, Nowak-Wegrzyn A, Geliebter J, Miao M, Li XM, Systems Pharmacology and In Silico Docking Analysis Uncover Association of CA2, PPARG, RXRA, and VDR with the Mechanisms Underlying the Shi Zhen Tea Formula Effect on Eczema. *Evid Based Complement Alternat Med*, (2021) 8406127.
- [27] Gkogkolou P, Böhm M, Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol*, 4(3) (2012) 259–70.
- [28] Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J,

- Nelson PS, Desprez PY, Campisi J, Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell–nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology*, 6 (2008) 2853–2868.
- [29] Desbats MA, Sara Zumerle S and Alimonti A, Epiregulation of the SASP makes good neighbors. *Nature Aging*, 1 (2021) 420–421.
- [30] Dong Hun Lee, Jang-Hee Oh, Jin Ho Chung, Glycosaminoglycan and proteoglycan in skin aging. *Journal of Dermatological Science*, 83(3) (2016) 174–181.
- [31] Vogel CFA, Van Winkle LS, Esser C, Haarmann-Stemmann T, The aryl hydrocarbon receptor as a target of environmental stressors – Implications for pollution mediated stress and inflammatory responses. *Redox Biol*, 34 (2020) 101530.

Synergistic Effects of TCM formulas on Skin Aging Regulation. From *in Silico* Predictions to *in Vitro* Outcome

Feng Chun-bo

(R&D Center, Shanghai Jahwa United Co., Ltd. Shanghai, 200082)

Abstract : Intrinsic and extrinsic aging affect the health of human skin. Extracellular matrix protein degradation, DNA damage and oxidative stress are known to disturb skin architecture and skin homeostasis, which can lead to skin aging. By using many anti-aging cases of Chinese herbal medicines explored in Traditional Chinese Medicine (TCM) such as ginseng, polygonatum, osmanthus, etc., this article explores the effects of different combinations of Chinese herbal medicines in anti-aging formulas. Then, it predicts their biological activity in the skin through network pharmacology. Afterwards, the synergistic effects of different combinations were verified through *in vitro* experiments. The results showed that the compounding of five Chinese herbal medicines had stronger anti-aging effects on skin than the combination of ginseng, polygonatum, epiphyllum, or the ginseng alone.

Keywords : phytochemicals; TCM extract combination; *in silico* analysis; skin anti-aging

