



分类号:         R75          
密 级:         公开          
U D C:         610          
编 号:         202118105106423        

# 青海大学

2018 级攻读硕士学位研究生毕业论文

柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射体外培养人皮肤成纤维细胞的衰老及 p53、p21 影响的研究

**Effects of Chaidamu black fruit Lycium barbarum anthocyanin on senescence, p53 and p21 of human skin fibroblasts cultured by UVB radiation in vitro**

指 导 教 师:         燕华玲教授          
学 生 姓 名:         魏丽          
学科专业名称:         皮肤病与性病学          
研 究 方 向:         临床技能训练与研究          
学院(系、部):         临床医学院        

论文起止时间: 2019.10-2021.05

**QingHaiUniversity**

**Master Dissertation**

**Effects of Chaidamu black fruit Lycium barbarum  
anthocyanin on senescence, p53 and p21 of human skin  
fibroblasts cultured by UVB radiation in vitro**

**Supervisor: Yan Hualing**

**Candidate: Wei Li**

**Academic Major Applied for: Dermatology and venereology**

**Specific Major: Clinical Skills Training And Research**

**College (Department): Medical college**

**Starting and ending time: 2019.10-2021.05**





# 柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射体外培养人皮肤成纤维细胞的衰老及 p53、p21 影响的研究

## 中文摘要

目的：1. 建立 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞的早衰模型；2. 研究柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射损伤体外人 HSFs 的早衰进程有无干预作用，同时探讨其发挥干预早衰进程的作用机制。

方法：取处于对数生长期的第 3 代至第 5 代的人皮肤成纤维细胞，分为空白对照组、UVB 照射组、黑枸杞花青素 100ug/ml+UVB 照射组、黑枸杞花青素 500ug/ml+UVB 照射组、黑枸杞花青素 1000ug/ml+UVB 照射组。除对照外，其余各组按照以上进行照光和（或）药物处理，在花青素干预 24 小时后连续 3 天进行照光处理，照光完成后继续培养细胞 72 小时。（1）使用 SA- $\beta$ -Gal 染色剂对老化细胞染色，借助光学显微镜确认染色情况并计算染色阳性的老化细胞数；（2）用实时荧光定量 PCR（Real-Time PCR）计算各组衰老关联基因 p53、p21 表达量。

结果：1. 成功建立 UVB 辐射诱导 HSFs 的早衰模型；2. 柴达木黑果枸杞花青素可以减轻 UVB 辐射诱导 HSFs 的早衰。同空白组比较，UVB 照射组 HSFs 衰老细胞数大幅度增加，SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率显著升高（ $P < 0.01$ ）。与 UVB 照射组比较，经柴达木黑果枸杞花青素干预的各实验组 SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率降低（ $P < 0.05$ ），且随着药物浓度的增加其阳性率降低越明显。3. 柴达木黑果枸杞花青素可以下调 UVB 辐射 HSFs 后衰老相关基因 p53、p21 的表达，与 UVB 照射组比较，经不同浓度柴达木黑果枸杞花青素干预的各实验组衰老基因 p53、p21 表达随药物浓度的升高而降低（ $P < 0.05$ ）。

结论：柴达木黑果枸杞花青素可抑制 UVB 辐射诱导 HSFs 的早衰进程，具有光保护作用，其分子机制可能是通过下调 p53、p21 的表达水平减轻 HSFs 的紫外线损伤。

关键词：黑果枸杞花青素，UVB，p53，p21

**EFFECTS OF CHAIDAMU BLACK FRUIT  
LCCIUM BARBARUM ANTHOCYANIN ON  
SENESCENCE, p53 AND p21 OF HUMAN SKIN  
FIBROBLASTS CULTURED BY UVB  
RADIATION IN VITRO**

**Abstract**

Objective 1. To establish UVB radiation-induced premature senescence model of HSFs cells; 2. To study the effect of anthocyanins on the premature aging process of UVB radiation damaged HSFs, and to explore the mechanism of inhibiting the premature aging process.

Methods Human skin fibroblasts from the third to the fifth generations in the logarithmic growth phase were divided into control group, UVB irradiation group, LBP anthocyanin 100ug/ml+ UVB irradiation group, LBP anthocyanin 500ug/ml+ UVB irradiation group, LBP anthocyanin 1000ug/ml+ UVB irradiation group. Except for the control group, the other groups were treated with light and/or drugs as described above. After 24 hours of anthocyanin intervention, the cells were treated with light for 3 consecutive days. After the completion of light treatment, the cells were cultured for 72 hours. (1) Aged cells were stained with SA- $\beta$ -Gal, and the staining was confirmed by optical microscope and the number of positive Aged cells was calculated. (2) Real-time PCR was used to calculate the expression levels of age-related genes p53 and p21 in each group.

Results 1. The UVB radiation-induced premature aging model of HSFS was successfully established; 2. Anthocyanins of Lycumbar barum can reduce the premature senescence of HSFS induced by UVB radiation. Compared with the blank group, the number of senescent HSF cells and the positive rate of SA- $\beta$ -gal staining were significantly increased in the UVB radiation group ( $P < 0.01$ ). Compared with the UVB irradiation group, the positive rate of SA- $\beta$ -gal staining in the experimental

groups treated with anthocyanin decreased ( $P < 0.05$ ), and the positive rate decreased more obviously with the increase of drug concentration.<sup>3</sup> Anthocyanin can down-regulate the expression of aging related genes p53 and p21 after UVB irradiation of HSFS. Compared with the UVB irradiation group, the expression of aging genes p53 and p21 in different concentrations of anthocyanin in the treatment groups decreased with the increase of drug concentration ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Anthocyanins can inhibit the premature aging process of HSFS induced by UVB radiation and have a photoprotective effect. The molecular mechanism may be reduce the UV damage of HSFS by downregulating the expression levels of p53 and p21.

**Keywords** Lycium barbarum anthocyanin, UVB, p53, p21

## 目 录

中文摘要.....	I
Abstract.....	II
目 录.....	IV
主要符号对照表.....	VI
第 1 章 引言.....	1
第 2 章 材料与amp;方法 .....	5
2.1 材料.....	5
2.1.1 细胞株.....	5
2.1.2 花青素.....	5
2.1.3 细胞实验相关耗材及试剂.....	5
2.1.4 分子学实验耗材和试剂.....	5
2.1.5 主要仪器及设备表.....	6
2.2 方法.....	7
2.2.1 黑果枸杞花青素制备.....	7
2.2.2 细胞培养及传代.....	7
2.2.3 实验分组.....	8
2.2.4 药物干预.....	8
2.2.5 UVB 照射设定及方法.....	8
2.2.6 细胞衰老相关 $\beta$ 半乳糖苷酶 (SA- $\beta$ -Gal) 染色.....	9
2.2.7 RNA 提取、逆转录及 qRT-PCR 反应.....	9
2.3 统计分析.....	11

第 3 章 结果.....	12
3.1 建立 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞早衰模型 .....	12
3.1.1 SA- $\beta$ -Gal 染色检测 UVB 辐射导致 HSF 衰老程度 .....	12
3.1.2 RT-PCR 检测 UVB 辐射 HSFs 提前衰老模型 p53、p21 表达量.....	13
3.2 柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 照射 HSFs 早衰的影响 .....	14
3.2.1 花青素对 UVB 照射 HSFs 衰老 SA- $\beta$ -GAL 染色情况 .....	14
3.2.2 RT-PCR 检测柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射 HSFs 细胞衰老 p53 表达的影响.....	16
3.2.3 RT-PCR 检测柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 照射 HSFs 衰老基因 p21 表达.....	17
第 4 章 讨论.....	19
4.1 紫外线辐射导致 HSF 早衰模型 .....	19
4.2 柴达木黑果枸杞花青素光保护功能.....	21
第 5 章 结论.....	23
参考文献.....	24
作者在读期间科研成果简介 .....	28
致 谢.....	29
附录 A 综述.....	30

## 主要符号对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
HSF	Human skin fibroblasts	人皮肤成纤维细胞
UVA	ultraviolet A	长波紫外线
UVB	ultraviolet B	中波紫外线
UVC	ultraviolet C	短波紫外线
SA- $\beta$ -Gal	Senescence-associated $\beta$ - galactosidase	衰老相关 $\beta$ 半乳糖苷酶
RT-PCR	Real-time Quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	细胞培养基
PBS	phosphate buffer saline	磷酸缓冲盐溶液
h	Hour	小时
Min	Minute	分
Sec	Second	秒

## 第 1 章 引言

众所周知,皮肤被覆于人体表面,也是人体与外界环境之间的第一道屏障,对机体有着重要的保护作用。一方面有着可以保护内脏不被外部有害因素损伤的作用,对机械性损伤、化学性刺激以及生物性损伤有很好的保护功能;另一方面能够防止体内营养物质、电解质、水分的丧失。当皮肤完整性、生理功能出现问题时候,对机体保护作用也会相应的减弱,因此皮肤完整性对维护人体内外环境稳定上起着重要作用。衰老是每个生物都要经历的过程,细胞是组成人体的基本单位,细胞衰老也是在机体组织、器官衰老中最先开始的。细胞老化是指它复制传代能力、正常生理功能慢慢减低过程。在细胞水平上,衰老首先是由 Hayflick 和 Moorhead 描述的,他们发现体外培养的成纤维细胞在培养过程中寿命有限,最终会进入一种被称为复制衰老的永久性细胞周期停滞状态<sup>[1]</sup>,细胞衰老在机体衰老中是最先开始出现的<sup>[2]</sup>。皮肤位于人类身体表面,和自然环境中各种刺激接触。皮肤和人体其他器官一样,皮肤也会按照时间顺序衰老。皮肤老化是一个多因素作用的过程,它是由内在因素(如时间、遗传因素、激素)和外在外因素(如紫外线照射、环境污染)共同作用引起的结果<sup>[3]</sup>。皮肤是最先受到光辐射的,光辐射的来源主要有日光中的紫外线,长期接受紫外线照射可产生一系列的反应,如日晒伤、光老化、光毒性反应等,甚至可诱发皮肤癌<sup>[4]</sup>。造成皮肤光老化环境因素中最重要作用因素是紫外线,由紫外线所造成皮肤衰老称作为皮肤光老化。随着紫外线对机体产生的不良影响关注日益重视,因此,研究怎样预防或改变皮肤光老化是皮肤科研究领域的重要课题,抗光老化植物的发现及其潜在分子机制的研究是解决光老化的重点之一。

日光辐射部位皮肤会变得不细腻、不紧致、毛细血管扩张、色素沉着等<sup>[5]</sup>。皮肤光老化在组织学上最明显的变化是在真皮细胞外基质,最显著的是日光性弹性纤维病变,其弹力蛋白等弹性纤维成为不像正常弹性纤维那样有序,同时伴有胶原纤维数量和结构的变化。太阳光中长波紫外线(ultraviolet A, UVA)可穿透真皮上部,作用于血管和其他组织;中波紫外线(ultraviolet B, UVB)主要作用于表皮角质形成细胞和黑素细胞,不仅损伤 DNA,而且产生可溶性因子进一步作用于真皮;短波紫外线(ultraviolet C, UVC)在地球平流层的臭氧层被完全过滤掉了,不到达地面。到达地面的 UV 中 UVB 占总量的 5%,UVA 占 95%,同样照射条件下 UVA 辐射对皮肤危害不及 UVB 千分之一,不仅如此 UVB 对生殖细胞还有危害<sup>[6]</sup>。

紫外线辐射诱导皮肤老化的原因目前尚未完全明确,可能通过以下途径:1)端粒环形结构不能维持:其为存在染色体尾部环形成分,是由TTAGGG六个碱基串联组成的<sup>[7]</sup>。环形端粒在染色体完整性和基因组固有性上起着至关重要的作用。当细胞暴露在氧化应激等损伤时会导致端粒缩短加速,导致细胞复制能力下降,出现细胞衰老<sup>[8]</sup>。2)线粒体DNA突变:线粒体DNA不与组蛋白结合,位于细胞质中的DNA分子。反复暴露于亚致死剂量的紫外线辐射下导致线粒体DNA片段缺失,并伴有线粒体功能下降、胶原降解酶活性升高及氧化应激,表明紫外线诱导的光老化和线粒体DNA突变有直接关系<sup>[9]</sup>。3)基质金属蛋白酶(MMP)计量升高:紫外线辐射可提高细胞中MMP的计量,MMP造成细胞成分损失,皮肤出现弹性降低,发生衰老<sup>[10]</sup>。4)紫外线辐射使皮肤中活性氧浓度升高,活性氧浓度升高可与皮肤产生不同的生物效应<sup>[11]</sup>。综上所述,紫外线辐射通过引起端粒环形结构破坏、DNA损伤、基因突变、氧化应激都可导致皮肤出现衰老。

皮肤是由表皮、真皮和皮下组织构成,紫外线对皮肤造成的损伤主要是表皮和真皮的改变。UVB能穿透皮肤外层,诱导人类真皮成分、结构损伤,是皮肤光老化重要因素之一<sup>[12]</sup>。真皮结构通过产生细胞外成分来维持皮肤厚度及弹性,然而UVB辐射导致细胞外基质减少、纤维降解,同时使皮肤中活性氧浓度升高,导致真皮成纤维细胞损伤<sup>[13]</sup>。成纤维细胞和胶原纤维是真皮中主要结构成分,真皮衰老在微观水平反应即主要表现为成纤维细胞衰老<sup>[14]</sup>。

衰老是生命的默认命运,生物的基本组成成分DNA、RNA和蛋白质不断受到化学刺激的影响,这些刺激损伤了其相应的功能。衰老可以有多种刺激诱导,其中DNA损伤所产生的影响要大得多,DNA包含了细胞RNA和蛋白质的信息。DNA损伤通过多种途径参与了细胞衰老的诱导和维持,DNA损伤主要有两种不同的结果,错误的修复可能导致基因突变和染色体异常,DNA不断受到伤害,转录和复制会被终止,细胞功能不能正常维持,细胞衰老程序就会启动<sup>[15]</sup>。在紫外线诱导DNA突变的同时,氧耗量降低,三磷酸腺苷、基质金属蛋白酶mmp-1增加,提示了DNA突变与光老化有关。p53是一种转录因子,也是基因组完整性的守护者,参与细胞周期调控、DNA修复、细胞凋亡和细胞应激反应,p53的激活除了诱导细胞生长停滞和凋亡外,还调节细胞衰老和组织衰老。研究表明衰老的启动和维持都依赖于p53<sup>[16]</sup>。p21是最早发现的p53下游靶点之一,起着参与细胞周期阻滞的作用,由于被p53激活,p21导致细胞周期停留于G1阶段<sup>[17,18]</sup>。p53对p21诱导细胞周期阻滞的明显依赖性,以及p21作为增殖抑制因子的确定作用,表明该基因在p53依赖性衰老的诱导中起着至关重要的作用<sup>[19]</sup>。

衰老细胞在形态上表现出非常独特的变化,表现为细胞体积增大和形状扁平。研究发现处于 pH6.0 时,老化细胞可计量到  $\beta$ -半乳糖苷酶活性(SA- $\beta$ -Gal), SA- $\beta$  半乳糖活性与衰老细胞密切相关,它在静止期细胞或终末分化细胞中检测不到,检测 SA- $\beta$ -GAL 染色阳性数目,是鉴定样本中老化细胞金标准<sup>[20]</sup>。SA- $\beta$  半乳糖对于检测不同条件或化合物是否能诱导或抑制衰老细胞的出现是非常有用的,包括确定正常细胞群体在培养中的复制潜力,以及确定药物干预在培养体外细胞中诱导衰老反应的能力<sup>[21]</sup>。

随着大众自我保健意识的提升,对抗皮肤衰老的研究更加关注。为了减轻紫外线对机体的损伤,寻找天然的保护剂有着重要的意义,目前大自然中很多植物被发现具有光保护作用。胡燕燕<sup>[22]</sup>等人在 UVB 诱导皮肤成纤维细胞的提前老化实验中,发现芒果苷可以使 UVB 辐射后细胞增殖活性提高、减弱 SA- $\beta$ -GAL 活性和下调 MMP 表达,表明芒果苷在 UVB 辐射造成细胞提前老化进程中有抑制作用。刘朝圣<sup>[23]</sup>等人 UVB 辐射诱导人角质形成细胞的早衰实验中,发现红景天可以通过抑制 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达起到光保护作用。石玉兰<sup>[24]</sup>研究发现茶黄素在 UVB 诱导角质形成细胞早衰实验中可以通过降低自由基、细胞结构及抑制促凋亡因子的表达,起到光保护作用。郅琦<sup>[25]</sup>在 UVB 辐射诱导小鼠皮肤早衰实验中发现,紫薯花青素可以清除 UVB 照射诱导产生的 ROS,抑制 p38 蛋白磷酸化起到光保护作用。翁腾玉<sup>[26]</sup>等人在 UVB 诱导人角质形成细胞早衰实验中,发现水母雪莲通过降低氧化因子具有光保护作用。

青藏高原海拔一般在 2000 米以上,到达地面的紫外线比沿海城市强<sup>[27]</sup>。紫外线辐射会给机体产生多种不良影响,高原地区的人民受到紫外线辐射强度更强,对机体产生不良影响也更加严重。黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murray) 是茄科枸杞属植物,是一种高营养的经济作物,主要分布在我国西北地区如青海、西藏等地,成熟的果实呈紫黑色,味甜。它不仅是一种营养丰富的食品,长期以来还一直被用于民间传统医药中,黑果枸杞中所含有的多糖、多酚、花青素等有较好的药理作用,对机体有广泛的保护作用,如抗癌、抗氧化、提高免疫活性、抗心血管疾病等<sup>[28, 29]</sup>;同时因其具有良好的食品安全性,是一种天然的可食用植物色素。本实验中采用的是柴达木黑果枸杞,柴达木全年气候干燥,雨少,全年接受紫外线辐射时间长,因其不一样的天气、温度等自然条件及地理位置,以致柴达木黑果枸杞的药用价值较高。

花青素是从果实中提取出来的一种水溶性色素,一种特殊的黄酮类化合物,通常作为色素存在于许多蔬菜、水果、花卉和植物中,它与许多水果、花和叶子的蓝色、紫色和红色有关。花青素通常被认为是植物中最大、最重要的一类水溶性色素,它们作为蔬菜、水果和红酒的天然化合物被人类广泛食用。有证

据表明花青素对人体健康有益<sup>[30]</sup>，这使得它们越来越多地作为食品补充剂和营养药品使用，花青素作为一种潜在的预防慢性疾病的药物受到了广泛的关注。花青素的许多健康特性与其抗氧化能力有关，它们的生物活性，特别是抗氧化和抗炎活性已被广泛报道。段亚彬<sup>[31]</sup>等人通过小鼠抗辐射损伤实验，发现黑果枸杞能够通过降低抗氧化酶的活性及 p53、caspase-3、caspase-6 含量降低细胞的凋亡，从而保护 DNA，增强抗辐射能力；同时照射后会产生自由基，这些自由基能攻击 DNA，诱导细胞凋亡，他们发现黑果枸杞能减少辐射后细胞凋亡，是通过清除辐射引起的自由基而起效果。于家鹏<sup>[32]</sup>等人研究表明长期摄入黑果枸杞通过改善抗氧化和抗炎状态、肠道完整性和肠道微生物菌群来促进机体健康，揭示了黑果枸杞作为功能性食品补充剂具有重要意义，对机体健康的潜在价值。杨琛擘<sup>[33]</sup>等人在诱导小鼠早衰中发现花青素通过能减少动物体内 MDA（丙二醛）浓度及增加 SOD（超氧化物歧化酶）浓度，对动物衰老有抑制作用。陶大勇<sup>[34]</sup>等人在 D 半乳糖诱导小鼠衰老实验中发现，黑果枸杞花青素可提高小鼠体内 SOD 活性，增强抗氧化能力，同时通过降低 MDA 含量来起到延缓老化。

在应用于衰老过程的临床前沿医学研究的细胞模型中，人角质形成细胞和成纤维细胞是最常用的细胞模型。到目前为止，大多学者都采用紫外线辐射诱导细胞提前衰老模型。由于 UVB 辐射诱导细胞早衰模型符合日光照射引起细胞衰老的特点，已被广泛应用于抗衰老药物的筛选和潜在药理机制的研究。

本课题组前期研究发现<sup>[35-37]</sup>，在 UVB 诱导体外人角质形成细胞早衰实验中，以黑果、红果枸杞做为干预因素，采用细胞学和分子生物学实验方法，探讨了黑果、红果枸杞多糖及黑果枸杞水提物对抗中波紫外线所引起角质形成细胞的光老化作用，证实黑果枸杞多糖及黑果水提物具有光保护作用。花青素是黑果枸杞中提取出来的一种色素，到目前为止，还没有对黑果枸杞花青素在紫外线辐射诱导 HSF 细胞早衰的过程是否有干预作用进行全面的的研究。为了阐明柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射诱导细胞衰老的预防作用及其可能的分子机制，我们建立了与人体生理衰老相似的 UVB 诱导衰老细胞模型。拟用 UVB 辐射 HSF 以建立 UVB 所致 HSF 提前衰老模型，以柴达木黑果枸杞花青素作为干预因素，在柴达木黑果枸杞花青素干预 UVB 诱导 HSF 细胞衰老过程，检测细胞老化指标衰老相关  $\beta$  半乳糖苷酶染色阳性率的变化，观察柴达木黑枸杞对 UVB 辐射诱导细胞衰老的进程有无干预作用；同时检测衰老相关基因 p53、p21 的表达，探讨柴达木黑果枸杞花青素在干预紫外线辐射诱导成纤维细胞衰老过程中的分子机制。

## 第 2 章 材料与方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 细胞株

人皮肤成纤维细胞（HSF）购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

#### 2.1.2 花青素

柴达木黑果枸杞花青素购自西安通泽生物科技公司。

#### 2.1.3 细胞实验相关耗材及试剂

表 2-1 细胞培养耗材

耗材	厂家
培养皿、离心管、六孔板	重庆光电仪器有限公司
枪头、过滤器、一次性移液管	爱思进生物技术（杭州）有限公司

表 2-2 细胞培养试剂

试剂	厂家
DMEM 高糖培养基、胎牛血清	上海 life 公司
0.25%胰蛋白酶	北京 Solarbio 公司
PBS 液	上海碧云天生物技术有限公司

#### 2.1.4 分子学实验耗材和试剂

表 2-3 主要耗材

耗材	厂家
RNase free 的 EP 管	无锡耐思生物科技有限公司
Lightcycler	Roche Diagnostice Gmbh
RNase free 的枪头	爱思进生物技术（杭州）有限公司

表 2-4 主要试剂

试剂	厂家
氯仿、无水乙醇	南京化学试剂有限公司
RNA 提取试剂盒	天根生化科技有限公司
RNA 转 cDNA 试剂盒	北京全式金生物技术有限公司
细胞 SA- $\beta$ -Gal 染色试剂盒 C0602	碧云天生物技术公司
TPGreen	宝日医生物技术有限公司

表 2-5 PCR 引物序列人相关基因引物

Gene	Forward Primer(5'-3')	Reverse Primer(5'-3')
GAPDH	GAAGATCAAGATCATTGCTCCT	TACTCCTGCTTGCTGATCCA
P53	CCTCAGCATCTTATCCGAGTGG	TGGATGGTGGTACAGTCAGAGC
P21	AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG	TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG

### 2.1.5 主要仪器及设备表

表 2-6 主要仪器及厂家

仪器型号	厂家
CO2恒温培养箱 Forma 311	美国Therom Scientific公司
恒温水浴箱DKB-501A	上海森信实验仪器有限公司
恒温鼓风干燥箱	上海琅轩实验设备有限公司
超低温冰箱EXF60086V	美国Therom Scientific公司
超纯水仪CLXXUVFM2	ELGA
离心机Heracus X3R	美国Therom Scientific公司
电子天平AL104	瑞士梅特勒-托利多公司
生物安全柜LA2-5AI	新加坡ESCO
荧光实时定量PCR仪ROCHE Light Cycler480II	瑞士RQOCHE公司
PCR仪 9700	Life Technologies Holding Pte Ltd
倒置荧光显微镜RVL-100	美国ECHO
恒温培养箱BH7-9271	上海一恒科学仪器有限公司
SIGMA-UVB	上海希格玛公司
大型高压灭菌器GR60DR	致微(厦门)仪器有限公司
冰箱BCD-140SDPW	海尔公司
高速台式冷冻离心机3-30K	德国SIGMA公司

## 2.2 方法

### 2.2.1 黑果枸杞花青素制备

课题组研究人员按照实验设计的要求，在西安通泽生物科技有限公司购买提纯度为 25% 的柴达木黑果枸杞花青素。

### 2.2.2 细胞培养及传代

在细胞间超净工作台进行细胞复苏、换液、传代及冻存等操作，实验人员在操作前用紫外线对实验器材和工作台进行照射消毒 30 分钟，实验操作中需要用到的试剂在 37 摄氏度环境中事先预热。培养基的配制：由 10% 胎牛血清和 100U/ml（青霉素、链霉素）及高糖混匀组成后续使用的细胞培养基。在含 HSF 细胞的培养皿中加入 10ml 配制好的培养基，放置在培养箱中进行湿化培养，设置培养箱中二氧化碳浓度为 5%、温度 37℃。在培养达到时间后，若培养皿中有较多死亡细胞及未贴壁的细胞，进行细胞换液，从培养箱中取出培养皿置于操作台上，用负压吸引器连接一次性无菌枪头，吸尽培养皿中原有液体，用移液枪增添 4ml 事先调至合适温度 PBS 溶液冲洗培养皿，然后用负压吸引器吸除缓冲液，按前述方法重复冲洗一次，冲洗完毕后，向培养皿中加入配置好的新鲜培养基，继续培养。2-3 天左右当细胞增殖到 80% 相互融合时进行传代培养。

细胞传代：吸除培养皿中之前的营养液，随即添加 PBS 液 4ml 对培养皿底部进行合适力度冲洗 3 次，目的是为了除去培养皿中未贴壁的悬浮细胞及已经死亡细胞。待悬浮细胞及死亡细胞被清洗干净后，再用移液枪吸取 2ml 浓度为 0.25% 胰蛋白酶加入培养皿中，按十字方向轻轻摇动培养皿使胰酶能够均匀覆盖培养皿的底部，为了能够让胰酶充分消化培养皿中的成纤维细胞，将该培养皿放入培养箱中达到最佳消化条件，根据消化情况一般 2 分钟后取出。实验人员于显微镜下察看人皮肤成纤维细胞是否完全被胰蛋白酶消化下来，当形态变圆、间隔增宽时表示已消化充分，可继续用移液枪增添 4ml 培养基终止作用过程。随后实验人员用取样枪将培养皿中的成纤维细胞吸打到分布平均，以 1:2 比例分装到无菌培养容器中开始传代培养。

细胞接种：将所有培养皿的细胞在相同条件下孵育，取处于对数生长期的第 3 代至第 5 代的人皮肤成纤维细胞，当单层培养人皮肤成纤维细胞达到刚融合时，用无菌枪头吸除培养皿中原有培养基，增添 2ml 浓度为 0.25% 胰蛋白酶，轻轻摇动培养皿，让胰酶覆盖培养皿底部后放在培养箱中 2 分钟，在显微镜下察看细胞消化情况，若细胞充分消化则加入 4ml 培养基终止过程。用枪头吹打细胞多次使细胞混合液分布均匀，取 10ul 细胞混合液添加至细胞计数板里于显

显微镜下数其细胞数，计算细胞浓度并以  $1 \times 10^5$  个/ml 接种在 6 孔培养板中持续培养。

### 2.2.3 实验分组

实验开始后将 6 孔板中 5 孔细胞进行随机分为 5 组，做好标记。除空白对照外，其余各组给予以下紫外线和（或）花青素进行如下处理。

表 2-7 实验分组及处理情况

组别	处理情况
空白对照组	不做任何处理
UVB 照射组	剂量为 $30\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB 照射
UVB+黑果枸杞花青素低剂量组	花青素 $100\text{ug}/\text{ml} + 30\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB
UVB+黑果枸杞花青素中剂量组	花青素 $500\text{ug}/\text{ml} + 30\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB
UVB+黑果枸杞花青素高剂量组	花青素 $1000\text{ug}/\text{ml} + 30\text{mJ}/\text{cm}^2$ UVB

### 2.2.4 药物干预

实验人员用电子天平称取一定总量的花青素，用培养基将花青素稀释配成溶液。取出在培养箱里的培养板，吸除培养孔里原有培养基，按照前述方法予以 2ml PBS 冲洗培养孔一次，冲洗结束每孔增添 2ml 全新培养液。再用移液枪向前面已经标记好分组中需要花青素干预的 3 孔中用无菌过滤器向各孔中加入配置好含花青素的培养基，使其花青素浓度分别为  $100\text{ug}/\text{ml}$ 、 $500\text{ug}/\text{ml}$ 、 $1000\text{ug}/\text{ml}$ 。随后把培养板置于  $\text{CO}_2$  浓度为 5%、温度为  $37^\circ\text{C}$  培养箱中持续培养 24 小时。

### 2.2.5 UVB 照射设定及方法

选取中国上海希格玛高技术有限公司生产 UVB 照射仪，照射强度显示器设置 UVB 光源的照射度。依据实验设计予以辐射剂量为  $30\text{mJ}/\text{cm}^2$  的 UVB 分 3 天进行辐射，辐射剂量每天为  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$ ，辐射光源在细胞正上方距离细胞 20cm 处，每天一次。每次 UVB 照射前实验人员从培养箱中取出培养板，用负压吸引器吸净原有细胞培养液，依照前述方法用 PBS 冲洗一次，清洗完毕后每孔加入 2ml PBS 液是液体完全覆盖细胞，空白组予以锡箔纸包裹避免紫外线照射，将前面笔记好需要照射的 4 孔放置在灯管下方进行 UVB 照射。每次照射完成后拿负压吸引器抽除培养板中 PBS，用取样枪向每个培养孔中添加 2ml 培养液，然后将培养板搁置在培养箱内继续培养。

### 2.2.6 细胞衰老相关 $\beta$ 半乳糖苷酶 (SA- $\beta$ -Gal) 染色

对上述已经完成 UVB 照射和 (或) 柴达木黑果枸杞花青素药物干预和处理的人皮肤成纤维细胞, 按以下步骤进行操作。

(1) 实验人员从培养箱中取出含正在培养的人皮肤成纤维细胞 6 孔板, 用负压吸引器抽掉培养孔中原细胞培养液, 按照前面的方法用 PBS 对每个培养孔冲洗一次, 冲洗完毕后, 每个培养孔中各加入 1ml 的  $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液, 并在常温中搁置 15 分钟。

(2) 实验人员用负压吸引器吸除每个孔里原有液体, 用 PBS 按实验要求次数及时间冲洗。

(3) 实验人员用一次性枪头吸除每个孔里的 PBS 液, 加入按下表中各染色液的比例事先配置好的染色液, 每孔中加入 1ml 混合好的染色工作液。

表 2-8 1ml SA- $\beta$ -Gal 染色工作液配置比例

成分	溶液体积
SA- $\beta$ -Gal 染色液 A	10 $\mu$ l
SA- $\beta$ -Gal 染色液 B	10 $\mu$ l
SA- $\beta$ -Gal 染色液 C	930 $\mu$ l
X-Gal 溶液	50 $\mu$ l

(4) 将已经加好的染色液的培养板放置在温度 37 $^{\circ}$ C、无 CO<sub>2</sub> 含量的恒温培养箱中孵育过夜, 并做好防止染色液蒸发的措施。

(5) 于温度 37 $^{\circ}$ C、无 CO<sub>2</sub> 含量恒温培育箱培育一天, 次日取出培养板, 于普通光学显微镜下察看染色状况。衰老细胞会被染色为蓝色。

### 2.2.7 RNA 提取、逆转录及 qRT-PCR 反应

(1) 总 RNA 提取, 根据天根公司提供 RNA 试剂盒说明在生物安全柜中进行操作, 全程需在冰上进行。

1.对已经完成紫外线照射和 (或) 花青素处理的人皮肤成纤维细胞, 吸除培养板中原培养液。用移液枪向每个孔里面加入 1 毫升 RZ 裂解液, 使 RZ 裂解液充分裂解培养板中的细胞, 用取样器多次吹打裂解液, 将吹打好含有 RZ 细胞混合液转到新离心管里。

2.对收集好含 RZ 的细胞混合液匀浆样品于 20 $^{\circ}$ C 放置 5min。

3.将含细胞的匀浆样品放在温度 4 $^{\circ}$ C、12000rpm 的离心机中离心 5 分钟。弃沉淀, 将上清液移至到一个新的 1.5ml 无 RNase 离心管中。

4.向每个离心管中加入 200ml 氯仿，合上盖子，用手晃动 15s，置于室内搁置等待 3min。

5.在温度 4 摄氏度、转速 12000 每分钟离心机中旋转 10 分钟，离心完成后由下到上依次为黄色层、中间层、无色层。将含 RNA 的无色层液体转到全新无菌无酶离心管中。

6.向含 RNA 的 EP 管新添 250ml 无水乙醇，摇动均匀。将所有溶液转到 CR3 吸附柱中，CR3 置于新的 EP 管里，在温度 4 摄氏度、转速 12000 转每分钟的离心机里旋转 30 秒，弃 EP 管里液体。

7.于吸附柱 CR3 里添加 500ul 去蛋白液 RD，在温度 4℃、12000rpm 的离心机中旋转 30 秒，倒掉 EP 里得到的液体。

8.向 CR3 管里添加 500ul 去蛋白液 RW，常温放置 2 分钟，于温度 4℃、12000rpm 的离心机里旋转 30 秒，将 EP 管里液体弃除。

9.重复操作步骤 8 一次。

10.将 CR3 管放在 2mlEP 管里面，在温度 4℃、12000rpm 的离心机中旋转 2min，作用为了将 CR3 管里所有液体清除干净。

11.CR3 管置于一个全新无菌 RNase EP 管里，向吸附柱中加入 40ul 的 RNase-Freedom H<sub>2</sub>O，常温搁置 2min 左右在温度 4℃、12000rpm 的离心机中旋转离心 2min。最后得到溶液为 RNA，-70℃ 保存。

## (2) RNA 浓度及质量测定

将收集到的 RNA 溶液，用以无菌无酶的 ddH<sub>2</sub>O 作为参照，分别测空白对照组、UVB 照射组、不同浓度黑果枸杞花青素干预组中 RNA 的浓度。同时测各组中在 260nm 下吸光度及 280nm 下吸光度，若 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的比值在 1.8-2.0 之间可用于接下来的操作。

## (3) 第一链 cDNA 的合成 (20ul 体系)

1.使用前各组分点甩离心

2.加样

Total RNA	2ul
Random Primer	1uL
2×TS Reaction Mix	10uL
TransScript RT	1ul
gDNA Remover	1ul
RNase-free Water	5uL
Total volume	20ul

3.按照上述加样剂量将试剂加入 1.5ml 的 EP 中，轻轻混匀并离心。

4.将 EP 管放置于 PCR 仪里，程序设置为 25℃ 孵育 10 分钟，42℃ 孵育 15 分钟，85℃ 加热 5 秒。将得到的 cDNA-20℃ 保存。

(4) RT-PCR 反应体系与条件

1.反应体系

cDNA	2ul
Forward Primer	1ul
Reverse Primer	1ul
Tip Green qPCR Super Mix	10ul
Nuclease-free Water	6ul

2.上样：每孔按照上述试剂剂量进行加样，每个基因做 3 个复孔。

3.反应程序条件

a 预变性：94℃	30sec
b 变性：94℃	5sec
c 退火：50-60℃	15sec
d 延伸：72℃	10sec（步骤 b-d 40 cycles）

4.反应结束后，对数据进行统计。

## 2.3 统计分析

用 SPSS22.0 统计软件分析，计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示。两组比较用 t 检验，多组比较用单因素方差分析。P<0.05 差异有统计学意义。

## 第 3 章 结果

### 3.1 建立 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞早衰模型

#### 3.1.1 SA- $\beta$ -Gal 染色检测 UVB 辐射导致 HSF 衰老程度

SA- $\beta$ -Gal 染色是目前细胞衰老研究中最常见使用的生物标志物。如图 3-1 所示, 衰老的细胞会被染成绿色, 空白对照组 HSFs 细胞大部分未被染色为阴性,  $\beta$ -半乳糖酶染色阳性率为  $15.17\% \pm 1.26\%$ ; UVB 照射组中 HSFs 多数被染成绿色了, 阳性率为  $81.83\% \pm 2.08\%$ , 和空白对照组比较具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 说明有差异。从图 3-1 中我们还可以发现 UVB 照射组相对空白对照组比较人皮肤成纤维细胞的体积增大、形态变得扁平, 这也是细胞发生衰老的特征。结果显示, 与空白对照组比较 SA- $\beta$ -Gal 蓝色细胞的比例明显上升, 表明  $30\text{mJ}/\text{cm}^2$  的 UVB 辐射能够造成 HSF 提前进入衰老进程。

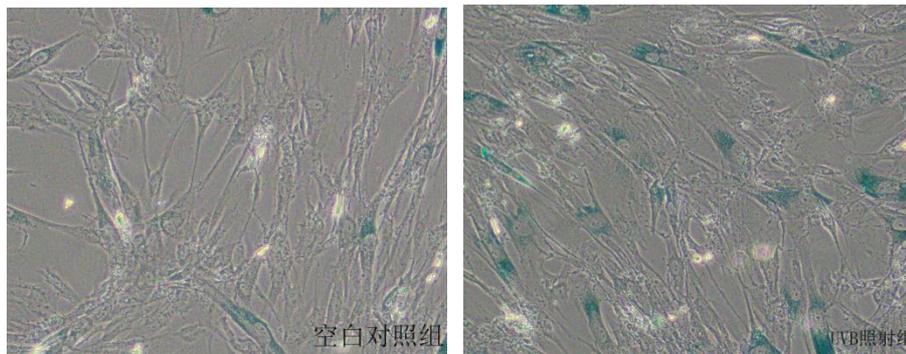


图 3-1 UVB 辐射 HSFs 后 SA- $\beta$ -Gal 染色

注: 图中绿色为 SA- $\beta$ -GAL 阳性细胞, 标尺:  $200\mu\text{m}$ 。

表 3-1 UVB 辐射对 SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

分组	$\beta$ -半乳糖苷酶阳性率 (%)
空白对照	$15.167 \pm 1.258$
UVB 照射	$81.833 \pm 2.082^a$
$t$	47.47
$P$	$< 0.05$

注: UVB 照射组 SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率较空白对照组上升 ( $^a P < 0.05$ )

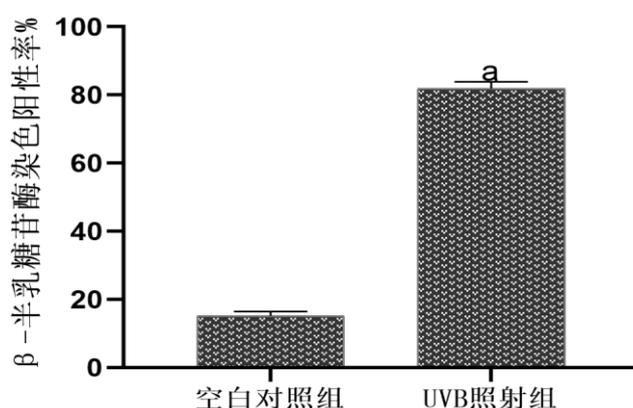


图 3-2 UVB 照射 HSFs 后 SA-β-Gal 染色阳性率

注：和空白组对比，UVB 照射组 SA-β-Gal 染色阳性率升高 (<sup>a</sup> $P < 0.05$ )

### 3.1.2 RT-PCR 检测 UVB 辐射 HSFs 提前衰老模型 p53、p21 表达量

p53-p21 信号通路是细胞衰老过程中的一条重要信号通路，在细胞衰老过程中会引起这条通路上相关分子的高表达。p53 是细胞应激后导致衰老和凋亡关键性因素，主要是控制下游 p21 的转录能力来完成。p53 是不同信号通路的中心整合点，在衰老细胞中表达上调。因此我们通过 RT-PCR 检测在 UVB 辐射诱导 HSF 细胞早衰模型中衰老相关基因 p53、p21 的表达量，结果显示，UVB 照射组衰老相关基因 p53 的相对表达量为  $2.070 \pm 0.053$ ，对照组衰老相关基因 p53 的相对表达量为  $1.000 \pm 0.102$ ；UVB 辐射组老化相关基因 p21 相对表达量为  $2.619 \pm 0.012$ ，对照组衰老相关基因 p21 的相对表达量为  $1.000 \pm 0.048$ 。和空白组比较 UVB 照射组衰老基因 p53、p21 的相对表达量都升高，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。从而证明 UVB 辐射 HSFs 提前进入衰老可能是启动 p53-p21 信号通路的缘故。

表 3-2 p53、p21 mRNA 的相对表达量 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

分组	p53	p21
空白对照组	$1.000 \pm 0.102$	$1.000 \pm 0.048$
UVB 照射组	$2.070 \pm 0.053^a$	$2.619 \pm 0.012^a$
t	16.104	56.117
p	<0.001	<0.001

注：UVB 辐射组 p53、p21mRNA 相对表达量较对照组上升 (<sup>a</sup> $P < 0.05$ )

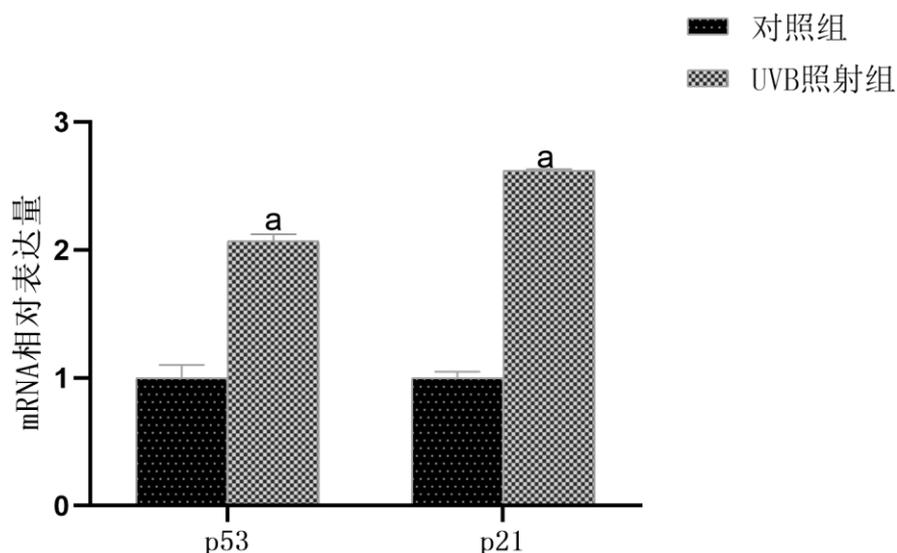


图 3-3 老化相关基因 p53、p21 表达量情况（与对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ）

## 3.2 柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 照射 HSFs 早衰的影响

### 3.2.1 花青素对 UVB 照射 HSFs 衰老 SA- $\beta$ -GAL 染色情况

为了探讨柴达木黑果枸杞花青素是否能够干预 UVB 辐射损伤人皮肤成纤维细胞。我们予以柴达木黑果枸杞花青素不同浓度（100ug/ml、500ug/ml、1000ug/ml）进行药物干预，同样应用 SA- $\beta$ -GAL 染色对各组细胞进行染色。如图 3-4 所示，绿色为衰老细胞。UVB 照射组 SA- $\beta$ -GAL 染色阳性率为 81.833%  $\pm$  2.082%，经花青素三种浓度 100ug/ml、500ug/ml、1000ug/ml 干预后 SA- $\beta$ -GAL 染色阳性率依次为 74.167%  $\pm$  1.893%、47.667%  $\pm$  0.763%、32.667%  $\pm$  0.764%，和 UVB 照射组比较，花青素能降低细胞 SA- $\beta$ -GAL 染色阳性率，差异有统计学意义（ $P < 0.05$ ）。提示花青素能抑制 UVB 辐射 HSFs 细胞的衰老。

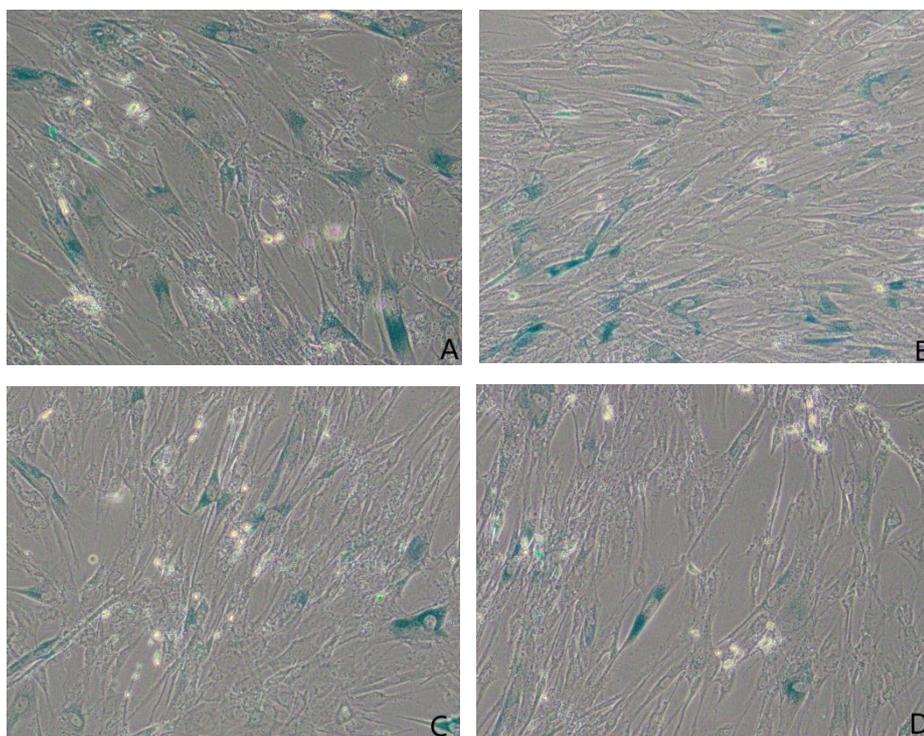


图 3-4 不同浓度花青素对 UVB 辐射 HSFs 细胞的 SA-β-半乳糖酶染色情况  
注：图 3-4 中 A、B、C、D 分别代表 UVB 照射组、UVB+花青素 100ug/ml 组、UVB+花青素 500ug/ml 组、UVB+花青素 1000ug/ml 组，绿色为染色阳性细胞。

表 3-3 不同浓度花青素对 UVB 辐射 HSFs 细胞的染色阳性率 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

组别	例数	β-半乳糖苷酶阳性率 (%)
UVB 照射组	3	81.833±2.082
UVB+花青素 100ug/ml 组	3	74.167±1.893 <sup>a</sup>
UVB+花青素 500ug/ml 组	3	47.667±0.763 <sup>ab</sup>
UVB+花青素 1000ug/ml 组	3	32.667±0.764 <sup>abc</sup>

注：和 UVB 照射组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，UVB+花青素 100ug/ml 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，与 UVB+花青素 500ug/ml 组，<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

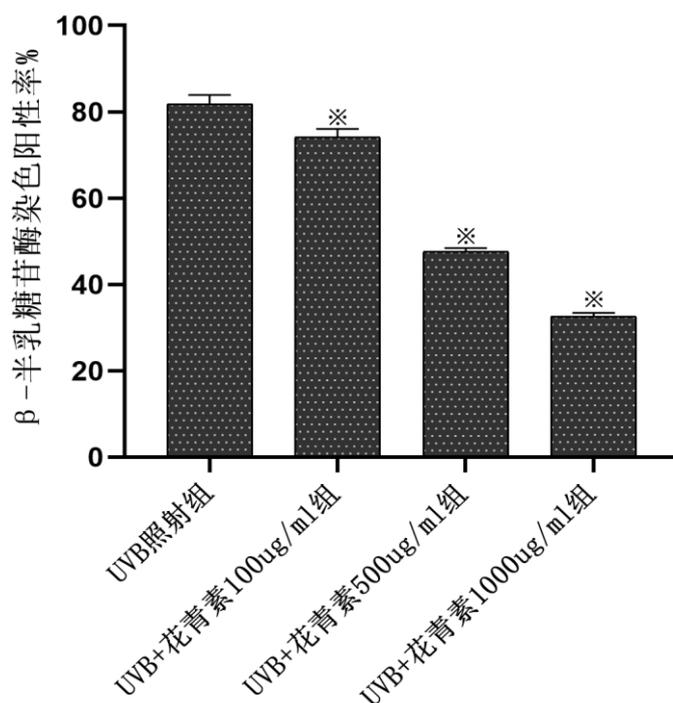


图 3-5 不同浓度花青素干预对 UVB 辐射 HSFs 细胞的衰老染色阳性率

注：不同浓度花青素干预 UVB 辐射 HSF 细胞的 SA-β-GAL 染色阳性率均低于 UVB 照射组 (\* $P<0.05$ )。

### 3.2.2 RT-PCR 检测柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射 HSFs 细胞衰老 p53 表达的影响

RT-PCR 结果显示，p53 相对表达量在 UVB 照射组为  $2.070 \pm 0.053$ ，在经花青素三种浓度 100ug/ml、500ug/ml、1000ug/ml 干预的各实验中 p53 的相对表达量分别为  $1.673 \pm 0.015$ 、 $1.430 \pm 0.030$ 、 $1.263 \pm 0.038$ 。和 UVB 照射组比较，经花青素干预的三组 p53 相对表达量降低，差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。随着药物浓度的增大，p53 的相对表达量下降越明显，且在一定浓度范围内呈剂量效应关系。

表 3-4 花青素对 UVB 辐射 HSFs 衰老基因 p53 表达影响 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

分组	例数	mRNA 的相对表达量
UVB 照射组	3	$2.070 \pm 0.053$
UVB+花青素 100ug/ml 组	3	$1.673 \pm 0.015^a$
UVB+花青素 500ug/ml 组	3	$1.430 \pm 0.030^{ab}$
UVB+花青素 1000ug/ml 组	3	$1.263 \pm 0.038^{abc}$

注：和 UVB 照射组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$ ，UVB+花青素 100ug/ml 组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ，与 UVB+花青素 500ug/ml 组，<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

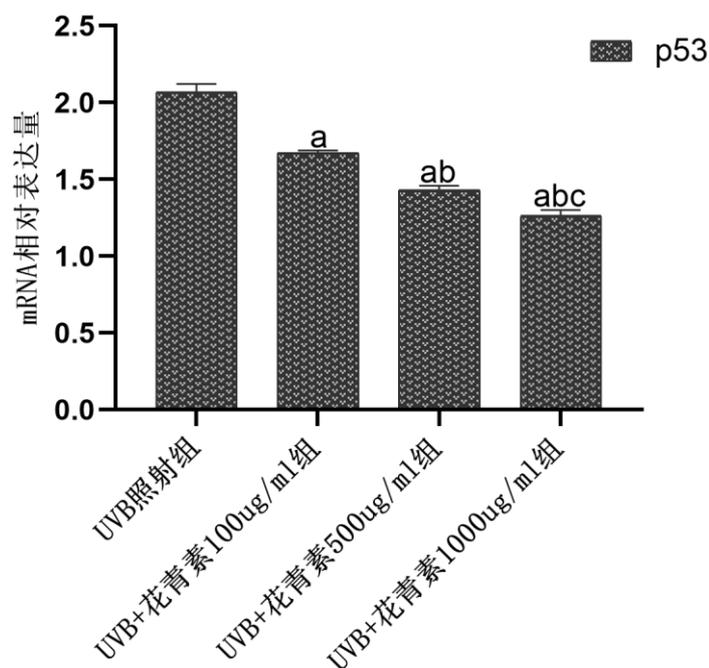


图 3-6 PT-PCR 检测花青素对 UVB 辐射 HSFs 衰老相关基因 P53 的表达  
注：和对照组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，和 UVB 照射组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，和 UVB+黑果枸杞花青素低剂量组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 3.2.3 RT-PCR 检测柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 照射 HSFs 衰老基因 p21 表达

RT-PCR 结果显示，p21 相对表达量在 UVB 照射组为  $2.619 \pm 0.012$ ，在经花青素三种浓度 100ug/ml、500ug/ml、1000ug/ml 干预的各实验中 p21 的相对表达量分别为  $2.485 \pm 0.007$ 、 $1.848 \pm 0.038$ 、 $1.471 \pm 0.010$ 。和 UVB 照射组比较，经花青素干预的三组 p21 相对表达量降低，差异具备统计学意义 ( $P < 0.05$ )。花青素浓度逐渐的升高，p21 相对表达量下降越明显，有一定的剂量依赖关系。

表 3-5 花青素对 UVB 辐射 HSFs 衰老基因 p21 表达 ( $\bar{x} \pm s$ , n=3)

分组	例数	mRNA 的相对表达量
UVB 照射组	3	$2.619 \pm 0.012$
UVB+花青素 100ug/ml 组	3	$2.485 \pm 0.007^a$
UVB+花青素 500ug/ml 组	3	$1.848 \pm 0.038^b$
UVB+花青素 1000ug/ml 组	3	$1.471 \pm 0.010^{bc}$

注：和 UVB 照射组相比，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，UVB+花青素 100ug/ml 组相比，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，和 UVB+花青素 500ug/ml 组相比，<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

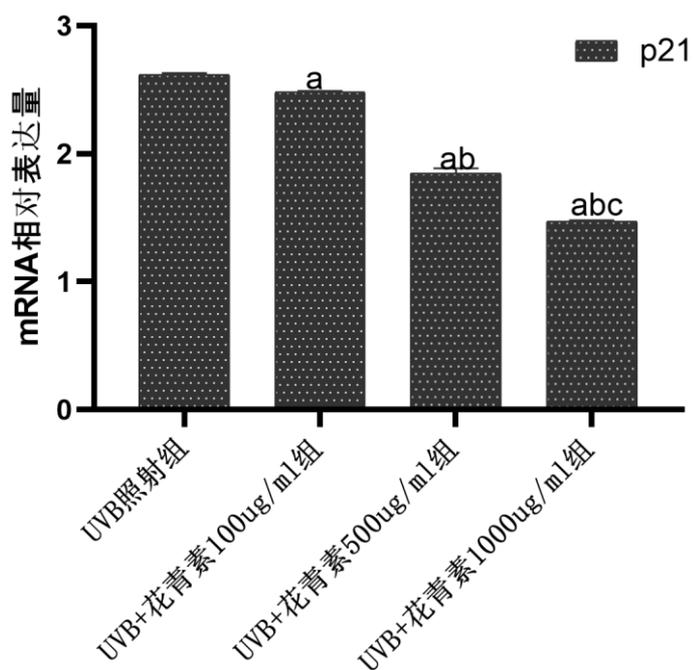


图 3-7 PT-PCR 检测花青素对 UVB 辐射 HSFs 衰老相关基因 p21 的表达

注：与对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ，与 UVB 照射组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ，与 UVB+黑果枸杞花青素低剂量组比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

## 第 4 章 讨论

暴露在紫外线照射的条件下对人体既会有利，也会有不利。人类维生素 D 主要来自于紫外线照射产生，维生素 D 在维持人类钙稳态和其他重要过程中起着关键性的作用<sup>[38]</sup>。与之相反，超过一定剂量的 UVB 暴露会导致人体皮肤发生光老化，甚至罹患皮肤癌<sup>[4]</sup>。皮肤的光老化是一个极其复杂的受到多种因素影响的过程，其中受到许多基因和生长因子的综合调控。紫外线有三种类型：分别是 UVA、UVB、UVC。紫外线由太阳辐射到达地球后，其中 UVC 完全被大气层中的臭氧吸收，UVA 和 UVB 可穿过大气层到达地面，虽然 UVA 的含量最多，但是 UVB 的能量更高，所以 UVB 是晒伤的主要原因，由于 UVB 波长较短，其中大部分被表皮吸收，只有小部分到达真皮层。与 UVA 相比，UVB 在诱导活性氧、DNA 损伤及衰老相关信号通路激活方面更为严重。UVB 和 UVA 照射在光老化过程中其主要作用。紫外线辐射对皮肤产生的损伤其实就是一个能量不断积累的过程，紫外线对皮肤的损伤受到辐射强度、辐射时间等诸多因素影响。青海省地处青藏高原，不仅紫外线辐射强度较平原地区高，而且日照时间更长，居住在高原地区的人们暴露在紫外线下时间较长，皮肤厚而粗糙，皱纹明显，可明显看见毛细血管的扩张和异常的色素沉着，光老化现象较内地同龄人严重。研究怎样预防或改变皮肤光老化仍是皮肤科研究的一个热点。以此为研究背景，以柴达木黑果枸杞花青素为研究对象，探讨柴达木黑果枸杞花青素对皮肤光老化的作用。本实验研究了柴达木黑果枸杞花青素对皮肤光老化的作用，在此实验的基础上进行讨论。

### 4.1 紫外线辐射导致 HSF 早衰模型

UVA 和 UVB 都可以诱导机体产生破坏性的活性氧(ROS)间接破坏 DNA，此外，UVB 可以诱致使机体产生环丁烷嘧啶二聚体(CPD)及 6-4 光产物(PPS)直接破坏 DNA<sup>[39, 40]</sup>。DNA 损伤是 DNA 修复的底物，但是未修复的 DNA 损伤的积累增加了突变的频率，增加致癌的风险。众所周知，基因组完整性和细胞周期基因中诱导异常会导致皮肤癌高发生率<sup>[41]</sup>。在人类的细胞中，不仅 DNA 损伤最初是由传递信号和启动修复机制的传感器蛋白识别造成的。而且未修复的 DNA 损伤，如 CPDS 和 64PPS 以及一些被氧化的碱基，可以在复制和转录过程中形成阻碍作用<sup>[42]</sup>。事实上，人类细胞中，DNA 破坏会引发各种细胞反应，

包括细胞周期停止(G1/S 和 S/G2)、DNA 修复及细胞凋亡<sup>[42, 43]</sup>。紫外线照射对机体不良影响,不仅可以导致细胞凋亡,而且还导致细胞坏死和细胞衰老<sup>[44]</sup>。光老化的损伤不仅发生在角质形成细胞、成纤维细胞和黑素细胞的基因组中,也发生在表皮和间充质干细胞的基因组中<sup>[45]</sup>。此外,紫外线产生的活性氧还会破坏其他重要的结构成分,如肌动蛋白和胶原蛋白<sup>[46]</sup>,这破坏会导致真皮和表皮的完整性丧失<sup>[47]</sup>。

多项研究证实,在体外,暴露于 UVB 的皮肤成纤维细胞表现出 DNA 损伤、细胞周期停滞、衰老生物标志物高表达,如 SA- $\beta$ -GAL 活性增加、p21、p53 激活<sup>[48-50]</sup>。p53 是一种转录因子,也是一种抑癌基因,它参与了凋亡、衰老和修复过程,以应对外环境不良因素,如遗传物质受损、氧缺乏及营养缺乏等,触发细胞衰老这种状态的特征是永久性的细胞周期停滞以及形态和基因表达的特异性变化。Rb(视网膜母细胞瘤蛋白)和 p53 基因都是衰老计划关键调节因子,在细胞衰老基因信号多种通路里,p53 通过控制下游效应因子 p21 来促进衰老<sup>[51]</sup>。p21 是 p53 下游的一个分子,因为它是 p53 依赖的生长抑制途径的主要介导者,并且它本身可以介导生长抑制。p21 抑制关键的 G1 期细胞周期蛋白 CDK 复合体的活性,阻止 pRB 磷酸化并产生 G1 期细胞周期阻滞,这种生长停滞是由 p53/p21 和 p16 通路建立和维持的<sup>[52]</sup>。

对皮肤光老化研究相对多为细胞模型,目前研究较多的细胞是人角质形成细胞和成纤维细胞<sup>[53]</sup>。应激造成老化的提前是指在各种应激因素(紫外线、过氧化物、乙醇等)刺激下细胞提前进入衰老状态<sup>[54]</sup>。在皮肤中,HSFs 构成真皮里重要的组成,并负责产生不同 ECM 成分,是研究衰老细胞经典细胞类型。国内外实验研究表明反复暴露于亚致死剂量 UVB 辐射成功建立了人真皮成纤维细胞提前老化模型<sup>[55, 56]</sup>。郭娴菲<sup>[56]</sup>等人连续 5 日每日应用 10mJ/cm<sup>2</sup> 的 UVB 剂量辐射一次人皮肤成纤维细胞成功建立了早衰模型。在此次实验中,团队采用总剂量为 30mJ/cm<sup>2</sup> 的 UVB 以每次 10mJ/cm<sup>2</sup> 辐射 HSF,进行连续 3 天的照射,以获得 UVB 照射导致 HSF 早衰模型。我们检测了 HSFs 在辐射结束后 72h 计量细胞老化生物标志物:细胞体积、SA- $\beta$ -Gal 活性、衰老相关基因表达。我们发现在 UVB 诱导细胞进入提前衰老状态后,细胞发生了变化:体积增大,形态扁平;SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率升高。空白组、UVB 辐射组  $\beta$  半乳糖苷酶染色阳性率分别为 15.17%、81.83%,提示在本次实验中成功建立了 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞进入早衰状态。实时荧光定量计量空白组和 UVB 辐射组衰老相关基因 p53、p21 的表达量,结果显示,UVB 辐射组衰老相关基因 p53、p21 的相对表达量较空白对照组比较明显上调,这也提示了在 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞早衰过程中其分子机制可能是激活 p53-p21 信号通路。这与文献<sup>[56, 57]</sup>UVB 辐射诱导 HSFs

早衰模型中 SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率、衰老相关基因 p53、p21 基本一致。

## 4.2 柴达木黑果枸杞花青素光保护功能

花青素是从浆果中提取出来的一种色素，极易溶于水，黑果枸杞果实中富含花青素类天然色素、多糖、氨基酸及无机元素等成分。实验显示，黑果枸杞的抗氧化、抗衰老、抗炎与其提取物花青素有关<sup>[58]</sup>。长期暴露在紫外线对机体健康会造成多种危害<sup>[59]</sup>。长期和反复暴露在阳光下会导致皮肤结构和功能的逐渐恶化。

在建立的 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞早衰模型基础上，我们给予不同浓度花青素进行药物干预，以柴达木黑果枸杞花青素 100ug/ml、500ug/ml、1000ug/ml 的浓度进行干预。在药物干预后进行 UVB 辐射，在照射完成后我们对人皮肤成纤维进行  $\beta$  半乳糖苷酶染色，柴达木黑果枸杞花青素浓度 100ug/ml、500ug/ml、1000ug/ml 干预的实验组  $\beta$  半乳糖苷酶染色阳性率分别为 74.17%、47.67%、32.67%，UVB 照射组 SA- $\beta$ -Gal 染色阳性率是 81.83%。与 UVB 照射组比较，柴达木黑果枸杞花青素能使 UVB 辐射后 HSF 细胞的  $\beta$  半乳糖苷酶染色阳性率降低。结果显示在花青素干预下，人皮肤成纤维细胞  $\beta$  半乳糖苷酶染色阳性率较 UVB 照射组比较降低，随着药物浓度越高降低越明显，这表明柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射诱导 HSFs 早衰进程有干预作用。本实验中用 RT-PCR 检测各组细胞中衰老相关基因 p53、p21 的表达量，结果显示，在经不同浓度柴达木黑果枸杞花青素处理的各实验组相关基因 p53、p21 的相对表达量与 UVB 照射组比较下调，提示柴达木黑果枸杞花青素在 UVB 诱导 HSFs 细胞早衰模型中减少 p53、p21 的表达，这种变化随着花青素浓度升高更加明显。

综上所述，柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射致使 HSFs 提前老化过程中 SA- $\beta$ -Gal 活性、衰老有关基因 p53、p21 的表达有明显影响。柴达木黑果枸杞花青素能降低 UVB 辐射 HSFs 的  $\beta$  半乳糖苷酶染色阳性率，能下调 p53、p21 的相对表达量。浓度为 100ug/ml-1000ug/ml 的柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射诱导 HSFs 早衰进程中对 HSFs 细胞有光保护作用。

本研究从细胞层面证实了柴达木黑果枸杞花青素对紫外线的光保护作用，对其机制作了初步探索。黑果枸杞在保护机体方面具有较好的临床应用和商业价值，本研究为黑果枸杞在抵抗皮肤光老化的应用提供一定的理论依据。紫外线诱导皮肤光老化是一个复杂的过程，我们证实了其可能是通过 p53-p21 通路起到光保护作用。但仍有不足之处，对其机制的探索不能局限于某一个分子或某一通路，是否还存在其他分子和通路对紫外线引起的光损伤起保护作用，这

需要我们进一步探讨。

## 第 5 章 结论

本次试验中多次运用紫外线辐射诱导人皮肤成纤维细胞建立细胞早衰模型，观察不同浓度柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞早衰进程中的光保护作用。结论如下：

1.应用总剂量  $30\text{mJ}/\text{cm}^2$  的 UVB 照射剂量每日每次  $10\text{mJ}/\text{cm}^2$  照射 HSFs，可致使 HSFs 提前老化，引起 SA- $\beta$ -Gal 色阳性率升高，成功构建了 UVB 辐射诱导 HSFs 早衰模型。

2.浓度为  $100\text{ug}/\text{ml}$ 、 $500\text{ug}/\text{ml}$ 、 $1000\text{ug}/\text{ml}$  的柴达木黑果枸杞花青素能使经 UVB 辐射后 HSFs 细胞的  $\beta$  半乳糖苷酶染活性降低。表明柴达木黑果枸杞花青素对 UVB 辐射诱导 HSFs 早衰进程有抑制作用，且随着柴达木黑果枸杞花青素浓度的升高这种抑制作用越明显。证明了柴达木黑果枸杞花青素光保护功能。

3. 浓度为  $100\text{ug}/\text{ml}$ 、 $500\text{ug}/\text{ml}$ 、 $1000\text{ug}/\text{ml}$  的柴达木黑果枸杞花青素能下调 UVB 辐射 HSFs 细胞衰老相关基因 p53、p21 的表达，这表明花青素可能通过下调 p53、p21 基因的表达发挥对 UVB 辐射诱导 HSFs 细胞早衰起到抑制作用。

## 参考文献

- [1] HAYFLICK L, MOORHEAD P S. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. *Experimental Cell Research*, 1961,25(3): 585-621.
- [2] FISHER G J, KANG S, VARANI J, et al. Mechanisms of Photoaging and Chronological Skin Aging[J]. *Archives of Dermatology*, 2002,138(11).
- [3] WANG A S, OLIVER D. Biomarkers of Cellular Senescence and Skin Aging[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018,9: 247.
- [4] NARAYANAN D L, SALADI R N, FOX J L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer[J]. *International Journal of Dermatology*, 2010,49(9): 978-986.
- [5] GILCHREST B A. Photoaging[J]. *Cutaneous Biology*, 2013.
- [6] RICARDO B, NEENA P, JORGE S, et al. Mechanisms of Photoaging and Cutaneous Photocarcinogenesis, and Photoprotective Strategies with Phytochemicals[J]. *Antioxidants*, 2015,4(2): 248-268.
- [7] DONATE L E, BLASCO M A. Telomeres in cancer and ageing[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2011,366(1561): 76-84.
- [8] VICTORELLI S, PASSOS J F. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not[J]. *EBioMedicine*, 2017,21: 14-20.
- [9] SREEDHAR A, AGUILERA-AGUIRRE L, SINGH K K. Mitochondria in skin health, aging, and disease[J]. *Cell Death & Disease*, 2020,11(6).
- [10] KIM J, KIM S Y, NOH E, et al. Reversine inhibits MMP-1 and MMP-3 expressions by suppressing of ROS/MAPK/AP-1 activation in UV-stimulated human keratinocytes and dermal fibroblasts[J]. *Experimental Dermatology*, 2018,27(3): 298-301.
- [11] MEERAN S M, PUNATHIL T, KATIYAR S K. IL-12 Deficiency Exacerbates Inflammatory Responses in UV-Irradiated Skin and Skin Tumors[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008,128(11): 2716-2727.
- [12] LEE Y R, NOH E M, JEONG E Y, et al. Cordycepin inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase expression by suppressing the NF-kappaB pathway in human dermal fibroblasts.[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2009,41(8): 548.
- [13] RABE J H, MAMELAK A J, MCELGUNN P J S, et al. Photoaging: Mechanisms and repair[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2006,55(1): 1-19.
- [14] 刘瑶, 洪琳, 李骏飞, 等. 皮肤抗衰老的实验研究进展[J]. *海峡药学*, 2010, 22(08): 10-12.
- [15] OU H, SCHUMACHER B. DNA damage responses and p53 in the aging process[J]. *Blood*, 2018,131(5): 488-495.
- [16] KUMAR M, LU Z, TAKWI A A, et al. Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs[J]. *Oncogene*, 2011,30(7): 843-853.
- [17] TSUKASA, ODA, TAKAYUKI, et al. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts.[J]. *Journal of cell science*, 2018.
- [18] BRUGAROLAS J, CHANDRASEKARAN C, GORDON J I, et al. Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency[J]. *Nature*, 1995,377(6549): 552-557.

- [19] RUFINI A, TUCCI P, CELARDO I, et al. Senescence and aging: the critical roles of p53[J]. *Oncogene*, 2013,32(43): 5129-5143.
- [20] DEBACQ-CHAINIAUX F, CAMPISI J, ERUSALIMSKY J D, et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- $\beta$ gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo[J]. *Nature protocols*, 2009,4(12): 1798-1806.
- [21] GP. D, BASILE G, ACOSTA M, et al. A BIOMARKER THAT IDENTIFIES SENESCENT HUMAN CELLS IN CULTURE AND IN AGING SKIN IN VIVO[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995,92(20): 9363-9367.
- [22] 胡燕燕, 赵宏伟, 周炳荣, 等. 芒果苷抑制中波紫外线诱导人成纤维细胞提前衰老的相关研究[J]. *中华皮肤科杂志*, 2014, 47(04): 237-242.
- [23] 刘朝圣, 申梦洁, 韩晓凤, 等. 红景天苷对 UVB 辐射 HaCat 细胞活性及 Caspase-3/9 蛋白表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(08): 952-956.
- [24] 石玉兰. 茶黄素对 UVB 诱导 HaCaT 细胞光老化的保护作用研究[D]. 湖南农业大学, 2019.
- [25] 鄧琦. 紫薯花青素抗 UVB 诱导的 BALB/c-nu 小鼠皮肤光老化作用研究[D]. 西南大学, 2019.
- [26] 翁腾玉, 郭砚. 水母雪莲黄酮对中波紫外线辐射人永生化角质细胞损伤的影响[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(01): 14-17.
- [27] 廖永丰, 王五一, 张莉, 等. 到达中国陆面的生物有效紫外线辐射强度分布[J]. *地理研究*, 2007, 26(4): 821-827, 版 4.
- [28] HU N, ZHENG J, LI W, et al. Isolation, Stability, and Antioxidant Activity of Anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray and *Nitraria Tangutorum* Bobr of Qinghai-Tibetan Plateau[J]. *Separation science and technology*, 2014,49(18): 2897-2906.
- [29] PENG Q, LIU H, LEI H, et al. Relationship between structure and immunological activity of an arabinogalactan from *Lycium ruthenicum*[J]. *Food Chemistry*, 2016,194: 595-600.
- [30] 艾则孜江·艾尔肯, 滕亮, 刘梦, 等. 黑果枸杞的花青素成分和药理作用研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2021, 36(01): 170-173.
- [31] DUAN Y, CHEN F, YAO X, et al. Protective Effect of *Lycium ruthenicum* Murr. Against Radiation Injury in Mice[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015,12(7): 8332-8347.
- [32] A Y P, B Y Y, A P W, et al. Effects of long-term intake of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murray on the organism health and gut microbiota in vivo - ScienceDirect[J]. *Food Research International*, 2019,130.
- [33] 杨琛擘, 连秀仪, 申培红, 等. 夏黑葡萄花青素在 D-半乳糖致衰老小鼠大脑、肾脏和脾脏组织中的抗衰老作用[J]. *河南医学研究*, 2019, 28(12): 2113-2117.
- [34] 陶大勇, 陈佳娟, 陈瑛, 等. 黑果枸杞色素对小鼠抗衰老作用的研究[J]. *中兽医医药杂志*, 2008, 27(001): 11-13.
- [35] 加杨娥, 任立余, 燕华玲. 柴达木枸杞多糖对 UVB 诱导人 HaCaT 细胞氧化损伤及凋亡相关蛋白的影响[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2017(08): 9-13.
- [36] 加杨娥, 任立余, 燕华玲. 黑枸杞水提物对中波紫外线辐射后人角质形成细胞增殖与凋亡及凋亡相关蛋白表达水平的影响研究[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(27): 3400-3404.
- [37] 张钦宁, 燕华玲, 任立余, 等. 黑果枸杞水提取物抑制 UVB 辐射后 HaCaT 细胞凋亡及

- p16、p53 蛋白表达[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2018, 34(11): 645-648.
- [38] MICHAEL F. HOLICK M D P D. Vitamin D Deficiency[J]. Medical Progress, 2007.
- [39] BESARATINIA A, KIM S, PFEIFER G P. Rapid repair of UVA - induced oxidized purines and persistence of UVB - induced dipyrimidine lesions determine the mutagenicity of sunlight in mouse cells[J]. The FASEB journal, 2008,22(7): 2379-2392.
- [40] SCHUCH A P, MORENO N C, SCHUCH N J, et al. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2017: S1246258334.
- [41] MENCK C F, MUNFORD V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging?[J]. Genetics & Molecular Biology, 2014,37(1): 220-233.
- [42] BATISTA L F Z, KAINA B, MENEGHINI R, et al. How DNA lesions are turned into powerful killing structures: Insights from UV-induced apoptosis[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2009,681(2-3): 197-208.
- [43] CORTAT B, GARCIA C C M, QUINET A, et al. The relative roles of DNA damage induced by UVA irradiation in human cells[J]. Photochemical & photobiological sciences, 2013,12(8): 1483-1495.
- [44] TRINGALI G, SAMPAOLESE B, CLEMENTI M E. Expression of early and late cellular damage markers by ARPE-19 cells following prolonged treatment with UV-A radiation[J]. Molecular medicine reports, 2016,14(4): 3485-3489.
- [45] PANICH U, SITTITHUMCHAREE G, RATHVIBOON N, et al. Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging[J]. Stem Cells International, 2016,2016: 1-14.
- [46] YAMABA H, HABAM, KUNITAM, et al. Morphological change of skin fibroblasts induced by UV Irradiation is involved in photoaging[J]. Experimental Dermatology, 2016,25: 45-51.
- [47] POON F, KANG S, CHIEN A L. Mechanisms and treatments of photoaging[J]. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine, 2015,31(2): 65-74.
- [48] MCCART E A, THANGAPAZHAM R L, LOMBARDINI E D, et al. Accelerated senescence in skin in a murine model of radiation-induced multi-organ injury[J]. Journal of Radiation Research, 2017,58(5): 636-646.
- [49] CHAINIAUX F, MAGALHAES J, ELIAERS F, et al. UVB-induced premature senescence of human diploid skin fibroblasts[J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2002,34(11): 1331-1339.
- [50] DAVINA A. LEWIS Q Y J B. UVB-induced Senescence in Human Keratinocytes Requires a Functional Insulin-like Growth Factor-1 Receptor and p53[J]. The international journal of biochemistry & cell biology, 2002.
- [51] LOWE S W, CEPERO E, EVAN G. Intrinsic tumour suppression[J]. Nature, 2004,432(7015): 307-315.
- [52] BALL K L, LAIN S, FAHRAEUS R, et al. Cell-cycle arrest and inhibition of Cdk4 activity by small peptides based on the carboxy-terminal domain of p21WAF1[J]. Curr Biol, 1997,7(1): 71-80.
- [53] DEBACQ-CHAINIAUX F, LEDUC C, VERBEKE A, et al. UV, stress and aging[J]. Dermato-Endocrinology, 2014,4(3): 236-240.
- [54] A O T, B E E M, C T V Z. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature

- senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes - ScienceDirect[J]. *Experimental Gerontology*, 2000,35(8): 927-945.
- [55] DEBACQ-CHAINIAUX, F. Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF- $\beta$ 1 signaling pathway[J]. *Journal of Cell Science*, 2005,118(4): 743-758.
- [56] 郭娴菲, 周炳荣, 李巍, 等. UVB 诱导下早衰人皮肤成纤维细胞中 miR-34c 及 SIRT1 表达的研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(09): 1289-1293.
- [57] 胡燕燕. 芒果苷抑制 UVB 诱导的人皮肤成纤维细胞早衰的实验研究[D]. 南京医科大学, 2014.
- [58] 董雨荷, 胡文忠, 连俊辉, 等. 黑果枸杞活性成分及其药理作用的研究进展[J]. *广东化工*, 2020, 47(23): 48-49.
- [59] 孙晓晨, 张放, 邵华. 紫外线对人体健康影响[J]. *中国职业医学*, 2016, 43(03): 380-383.



## 致 谢

学习的时光总是短暂的，当年满怀激情踏上这异地求学之旅的情景，像是才发生在昨日一样，然而现在却是三年时光已过，即将毕业之时。回想三年前背上行囊，坐着绿皮火车，憧憬了未来的美好学习生活。在这三年学习生涯中，我努力学习，刻苦专研，积累大量的临床经验，收获了丰富的知识。同时因西宁地处高原地区，在此亦体验了夏日炽阳，冬日暖雪。三年光阴匆匆而过，在此离别之际，心中多有不舍。

首先，感谢恩师燕华玲教授，在学习上从论文的选题、写作、答辩给予指导。在临床工作中，恩师工作勤恳敬业，专业知识渊博，传授了很多专业知识；老师为人谦诚，这些优秀的品质都是我学习的榜样。在燕华玲教授的教导下，我掌握了皮肤科常见疾病的诊治方法，掌握了皮肤科手术及活检术等技能操作。在生活上予以关照，记得初来青海多有不适应，在生活上给予了我较大帮助。

其二，感谢国家对研究生的培养的大力支持。也感谢学校给予我这个学习的机会。我将以我学到的知识报效祖国，回馈社会。

其三，感谢各科老师在工作中授业解惑，感谢临床中护士老师的包容。同时感谢中心试验室里的每一位老师，他们在试验期间给予的帮助和支持。

其四，感谢父母对我学业的支持。

## 附录 A 综述

### 皮肤光老化作用机制及预防

摘要：皮肤是直接遭到光直射的器官，其中紫外线对人体的损伤较大，紫外线对人体有双重作用，其有利的方面是紫外线能够用医治疗皮肤病；不利的一方面是紫外线辐射会对机体形成急性和慢性伤害，如紫外线辐射会导致发红、晒斑等光毒性急性损伤，超剂量照射会导致皮肤出现皱纹、粗糙等慢性损伤，甚至致癌。紫外线辐射诱导皮肤提前老化会影响一个人的容貌，而皮肤癌则是对健康构成直接威胁。因此对于如何避免紫外线给机体带来的这些影响，紫外线的防护也是一重点。本文我们从细胞层面描述了皮肤光老化可能的作用机制及如何预防紫外线辐射。

#### 1. 皮肤光老化作用机制

紫外线对机体的辐射无处不在，随着大众自我保健意识的提升，对抗皮肤衰老的研究更加关注，促使皮肤衰老与细胞老化等概念更加明确，两者之间的关系更加清晰，但对细胞老化介导皮肤衰老机制的相关研究处于摸索性前进阶段，有较大的完善空间，也是皮肤科领域研究的一个热点。

细胞衰老这个概念是 Hayflick<sup>[1]</sup>等人首次提出来的，他们发现成纤维细胞在培养一段时间后复制能力有限而进入一种永久性细胞周期停滞状态。衰老是生命的默认命运，它的组成成为 DNA、RNA、蛋白质收到不断化学变化的影响，会出现生理功能的一系列改变，提示细胞衰老可能会导致器官功能下降<sup>[2]</sup>。

#### 一、DNA 损伤

细胞核 DNA 是细胞组成部分中重要的一部分，任何因素导致 DNA 双螺旋结构的损伤都会引起细胞反应，这种反应有两个作用，一是阻止受损 DNA 的复制，让被破坏的遗传信息不被继续复制传播；另一方面是对受损的 DNA 进行修复，这两方面的最终目的就是维持基因组的完整性。如果增殖细胞产生的 DNA 损伤得到及时修复时，细胞恢复正常功能；当 DNA 损伤严重时，细胞不能修复可能会进入凋亡程序。持续的 DNA 损伤会阻碍细胞正常的转录和复制，促进细胞衰老。

p53 是一种重要的肿瘤抑制因子，抑癌基因 p53 由 TP53 基因编码，调节下游多个基因在细胞周期和细胞凋亡中发挥作用，被认为是人类基因组的守护者，在细胞增殖过程中起着重要作用<sup>[3]</sup>。受内外源性衰老因素的刺激影响，会提高细胞内活性氧的水平，促使 DNA 损伤。当 DNA 受损使会出现激活 p53 基因，p53 通过激活下游 p21 的转录来诱导细胞周期停滞，p21 是一种周期蛋白依赖性激酶抑制剂，可以阻止细胞周期的进展。细胞衰老是通过 p53-p21-周期蛋白依赖性激酶（CDK）2 与 p16INK4A-CDK4/CDK6 这两条途径激活。

#### 二、分泌表型

衰老细胞在体外培养细胞和体内也会形成一种复杂的衰老相关分泌表型（SASP），分泌表型的改变对衰老的关键作用早已被认识到。早期研究表明，传代后期的人成纤维细胞或来自早衰综合征患者的成纤维细胞会产生分泌蛋白，包括纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)，后者后来成为衰老的功能标志<sup>[4]</sup>。在正常细胞受到严重或不可修复的 DNA 损伤时会发生衰老，如 DNA 双链断裂。ATM(共济失调毛细血管扩张症突变)或其他对 DNA 损

伤做出反应的因子丢失会导致衰老相关表型的某些因子减少<sup>[5]</sup>。涉及以下几方面；基质金属蛋白酶（MMP）：活性氧簇聚集与蛋白酪氨酸磷酸酶失活、细胞表面生长因子和许多酶激活等因素影响，可迅速诱导 c-Jun 蛋白的表达，c-Jun 和 c-Fos 组成异二聚体，异二聚体与其他蛋白一起组成激活转录因子激活蛋白（AP-1），AP-1 可调控 MMP，MMP 升高它会降低细胞外基质，是皮肤失去弹性，导致皮肤衰老；富含半胱氨酸的 61 蛋白(cysteine rich 61, CYR61)也可以诱导 AP-1，这是紫外线辐射引发的胶原合成的另一个主要调节因子<sup>[6]</sup>。细胞会分泌其他因子，如 IL-6，IL-6 水平与年龄呈正相关，IL-6 上调 MMP，会促使胶原表达量下降，无功能性胶原占比增大。

### 三、端粒环形结构破坏及活性氧浓度升高

染色体完整性取决于端粒长度，染色体末端有一个保护的帽状环形结构是端粒，由六个碱基片段反复连接组成的一环形结构<sup>[7]</sup>。当紫外线辐射诱导 DNA 损伤时，端粒的环形结构被破坏，3' 段暴露从而被感受器蛋白识别，启动 DNA 损伤后的信号。紫外线辐射导致活性氧（ROS）浓度升高，高浓度的 ROS 对皮肤有害，它通过对细胞的直接氧化损伤可与皮肤产生多种生物效应，导致皮肤衰老<sup>[8]</sup>。皮肤中 ROS 升高有两种途径，一种是当紫外线照射会产生超氧阴离子、过氧化物这些离子升高，另一种是活性氧(ROS)过氧化氢是由烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)活化生成的，NADPH 在分子氧和超氧阴离子之间产生催化反应。由于活性氧的暂时性，有可能改善其效果，保护皮肤免受过早衰老的影响。在药理学上，ROS 一直被认为是光老化预防和治疗的潜在靶点。

### 2. 皮肤光老化的预防

紫外线对人体的损伤不仅仅体现在皮肤光老化方面，紫外线照射还可能引起皮肤如多形性日光疹、慢性光化性皮炎等日光性疾病，甚至发生皮肤癌。因此保护机体免受紫外线的照射尤为重要，光保护是预防皮肤老化及皮肤日光性疾病的主要措施。紫外线辐射无处不在，尤其户外活动时接受到越多的紫外线辐射，对机体的损害越大，在夏季和高原地区，一天日照时间长，紫外线辐射一般在上午 10 时到下午 4 时之前最强。因此良好的防护措施如涂抹防晒霜、穿防晒服、外出打伞及避免在紫外线最强的时间段外出极其重要。防晒霜是直接涂抹在皮肤表面，是光防护里的一个初级预防措施。目前市面上的防晒霜主要为两大类，一是物理遮光剂，二是化学类遮光剂。UVA、UVB 能到达地面，因此我们应该选用能够对它们具有防护隔离的防晒霜。市面上防晒类产品的品类较多，防晒系数（SPF）和防晒指标（PA）是我们在选用防晒霜需要关注的一个指标，前者代表对 UVB 的防护能力的一个指数，后者代表防止 UVA 的有效程度的一个指标。不管选用哪种类型的防晒霜，其防晒效果最重要的因素是涂抹在皮肤上的防晒霜总量、涂抹的持续时间及涂抹的均匀性。在日常外出中一般建议在紫外线照射前 15min 涂抹防晒霜，并每隔 2h 涂抹一次，以起到更好的防护作用<sup>[9]</sup>。

### 总结：

随着人们物质水平生活的提高，人们对皮肤健康的问题越来越关注。皮肤衰老是无法逆转与中止的，而抗衰老则成为了每个个体追求皮肤年轻的心愿。皮肤光老化对机体的损伤不可小觑，需要得到我们足够的重视。

## 参考文献

- [1] HAYFLICK L, MOORHEAD P S. The serial cultivation of human diploid cell strains[J]. *Experimental Cell Research*, 1961,25(3): 585-621.
- [2] OU H, SCHUMACHER B. DNA damage responses and p53 in the aging process[J]. *Blood*, 2018,131(5): 488-495.

- 
- [3] KUMAR M, LU Z, TAKWI A A, et al. Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs[J]. *Oncogene*, 2011,30(7): 843-853.
- [4] KORTLEVER R M, HIGGINS P J, BERNARDS R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence[J]. *Nature Cell Biology*, 2006,8(8): 877-884.
- [5] RODIER F, COPPÉ J, PATIL C K, et al. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion.[J]. *Nature Cell Biology*, 2009,11(8): 973-979.
- [6] POON F, KANG S, CHIEN A L. Mechanisms and treatments of photoaging[J]. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2015,31(2): 65-74.
- [7] PANICH U, SITTITHUMCHAREE G, RATHVIBOON N, et al. Ultraviolet Radiation-Induced Skin Aging: The Role of DNA Damage and Oxidative Stress in Epidermal Stem Cell Damage Mediated Skin Aging[J]. *Stem Cells International*, 2016,2016: 1-14.
- [8] 邓映, 钟建桥. 皮肤光损伤与氧化应激研究进展[J]. *临床皮肤科杂志*, 2017,046(009): 671-673.
- [9] KULLAVANIJAYA P, LIM H W. Photoprotection[J]. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2005,52(6): 937-958, 959-962.