

• 综 述 •

构建皮肤衰老模型方法的研究进展*

符思媛¹综述,付贵勤¹,杨逢文²,龙芸鸾³,李 征³,李晶洁^{3△} 审校

(遵义医科大学:1. 第一临床学院;2. 公共卫生学院;3. 基础药理教育部重点实验室/特色民族药教育部国际合作联合实验室/贵州省基础药理重点实验室,贵州 遵义 563009)

[摘 要] 随着年龄增长,皮肤衰老成为不可避免的过程。该文通过归纳总结既往研究中对皮肤衰老模型的构建,探讨皮肤衰老研究的造模方法。根据实验对象的不同,分成动物模型和细胞模型,希望为有效地建立皮肤衰老模型提供思路。

[关键词] 皮肤衰老; 长波紫外线; 中波紫外线; 自然老化; 光老化; 模型构建; 综述

DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2023.09.024 中图法分类号:R75;R332

文章编号:1009-5519(2023)09-1555-04 文献标识码:A

Research progress on methods for constructing skin aging models*

FU Siyuan¹, FU Guiqin¹, YANG Fengwen², LONG Yunluan³, LI Zheng³, LI Jingjie^{3△}

(1. First Clinical College; 2. School of Public Health; 3. Key Laboratory of Basic Pharmacology of Ministry of Education/ Key Laboratory Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education/Key Laboratory of Basic Pharmacology of Guizhou Province, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563009, China)

[Abstract] As we age, skin aging becomes an inevitable process. In this paper, the modeling method of skin aging research is discussed by summarizing the previous research on the construction of skin aging model. It is divided into animal model and cell model according to different experimental subjects, hoping to provide ideas for establishing skin aging model effectively.

[Key words] Skin aging; UVA; UVB; Intrinsic aging; Photoaging; Model building; Review

皮肤衰老是一个多因素综合作用的过程,根据成因可分为内源性衰老和外源性老化。外源性老化主要是紫外线(UV)辐射引起,因此又称光老化。在研究皮肤衰老相关实验中,均离不开模型的构建。本文查阅相关文献,主要围绕建立有效的皮肤衰老模型,分别从动物模型和细胞模型两方面展开论述,希望为研究及防治皮肤衰老提供理论基础。

1 动物衰老模型

用于研究皮肤衰老的动物主要为啮齿类动物,如不同品系的实验鼠。动物衰老模型可分为三类,分别为内源性衰老模型、外源性衰老模型、内源性合并外源性衰老模型。三类模型相比较,自然衰老模型(内源性衰老模型中的一种)和内外源合并衰老模型的临床症状吻合度大于或等于 90%,但由于前者造模时间长,在实验中更倾向于选择后者^[1]。目前,新兴的造

模方法是内源性合并外源性衰老模型构建。此方法相对简便、快速,且造模效果更加显著。

1.1 内源性衰老模型 根据引起内源性衰老的途径不同,动物的内源性衰老模型分为自然衰老模型、D-半乳糖所致的亚急性衰老模型和去势大鼠模型。

1.1.1 自然衰老动物模型 自然衰老动物模型是模拟人体自然状态下发生的内源性衰老,相对于其他内源性衰老模型,更加符合皮肤衰老的状态。正常饲养动物待其进入衰老期,但由于其实验周期长、价格昂贵等因素,因此,本模型在实验中使用较少。

1.1.2 D-半乳糖所致的亚急性衰老模型 通过连续注射不同剂量的 D-半乳糖使其在实验动物身体细胞内累积,促进体内氧化酶活性改变诱导机体发生衰老,衰老机制与 D-半乳糖所造成的氧化应激反应、钙稳态失调、线粒体功能障碍、端粒缩短和端粒酶活性

* 基金项目:贵州省科学技术厅科技计划项目(黔科合支撑[2020]4Y066);贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2019-010);遵义医科大学研究生科研基金项目(ZYK81);遵义医科大学大学生创新创业训练计划项目(ZYDC2020076)。

△ 通信作者, E-mail: lijingjiezmu@sina.com。

下降,以及免疫炎症有关^[1],称为 D-半乳糖所致的亚急性衰老模型。本模型常用实验动物有昆明(KM)小鼠、ICR 小鼠及 SD 大鼠,因雄性鼠比雌性鼠更加敏感^[2],故使用雄性鼠构建的衰老模型效果更加显著。D-半乳糖的注射剂量与实验鼠的月龄、品系有关,一般使用 2~3 月龄的实验鼠进行连续 6~8 周的皮下注射或腹腔注射^[3-4]。如 8 周龄雌性 KM 小鼠每天皮下注射 1.0 g/kg 的 D-半乳糖,持续 6 周,可得到衰老模型^[3]。值得注意的是,皮下注射更倾向于研究皮肤老化,而腹腔注射多应用于体内应激、脑衰老等方面的研究探讨^[5]。因此,本模型的建立通过皮下注射效果更加突出。

1.1.3 去势大鼠模型 去势大鼠模型是通过手术摘除成熟雌性大鼠的卵巢(去势)使雌激素水平明显下降,是目前应用最多的绝经状态模型。雌激素可刺激成纤维细胞和角质形成细胞增生,使胶原和胶原蛋白含量增加,基质金属蛋白酶表达水平降低,透明质酸生成增多,从而维持皮肤的厚度、水分及弹性。相反,本模型雌激素含量减少,皮肤会出现不同程度的衰老。本模型主要使用雌性 SD 大鼠和雌性 Wistar 大鼠,卵巢切除后还需进行阴道细胞涂片检查,以证明去势是否彻底^[6]。

1.2 外源性衰老模型 外源性衰老模型模拟日光照射[主要包括长波紫外线(UVA)和中波紫外线(UVB)],又称为光老化模型。目前,关于光老化模型的实验动物,由于实验条件有限,国内研究者多使用人工剃毛后的 ICR 小鼠、KM 小鼠和 SD 大鼠,而国外学者常选择无毛小鼠和裸鼠。国内使用的实验鼠经 4%~5%的硫化钠人工脱毛后,再进行 UV 照射。照射剂量、距离和时间与预实验中最小红斑量(MED)及实验鼠种类有关。MED 是指特定的个体或部位在一定的光源、特定波段光线照射 24 h 后产生肉眼可观察到的红斑最小剂量^[7]。外源性衰老模型虽造模简单,但其实验耗时较长,小鼠长期照射易脱水死亡,因此有一定的局限性。不同种类实验鼠进行该造模方法如下。

1.2.1 ICR 小鼠模型 在 UV 辐射前,ICR 小鼠需适应性喂养 1~2 周以适应实验环境。照射距离大部分为 30 cm,光源为 UVA、UVB 联合,首次照射剂量以 MED 为准,每次照射时间以周为单位逐渐延长,总造模时间为 12 周^[8]。李贺等^[9]研究照射距离为 6.5 cm,每天均进行照射。第 1 周 2 min/d,每周照射时间增加 2 min,至第 4 周为 8 min/d,并按此时间照射至第 8 周末。

1.2.2 KM 小鼠模型 与 ICR 小鼠不同的是,KM 小鼠不需适应性喂养,可以直接进行 UV 照射。照射

距离为 25~30 cm,光源选择 UVA、UVB 联合和 UVB 单独照射,总造模时间为 6~8 周^[10-11]。

1.2.3 SD 大鼠模型 适应性喂养 SD 大鼠 1 周后,使用 UVA、UVB 联合照射。可能由于 SD 大鼠体积较大,研究者多采用自制的固定器和照射盒。如照射过程中大鼠皮肤出现水疱、糜烂、渗出等急性炎症表现,应暂时停止照射 2~3 d,待症状好转后再继续照射,直至造模成功。调整的照射距离与照射时间呈负相关,即照射距离缩短,照射时间则延长^[12]。

1.2.4 无毛小鼠模型 无毛小鼠相对于人工脱毛的小鼠更加符合自然衰老的指标。但其价格昂贵、实验室的等级要求较高,国外研究中使用无毛小鼠较多,主要为白化无毛小鼠(SKH:HR-1)和 BALB/C 突变无毛小鼠。照射前调整照射高度 30~40 cm。若照射光源为 UVA、UVB 联合时,持续照射 10 周^[13];若单独使用 UVB 照射,照射周期随天数而不同,即前 10 周隔日照射 1 次;后 10 周每周照射 5 d,间隔 2 d^[14]。

1.3 内源性合并外源性衰老模型 随着对光老化研究的深入,许多研究表明,内源性合并外源性衰老模型,兼顾 UV 辐射和内环境的共同影响更加符合自然状态下的皮肤衰老状况,但由于操作烦琐,应用较少。目前已知的主要有注射 D-半乳糖联合 UV^[15]和涂抹甲氧沙林联合 UV^[16]模型。构建本模型的学者多选择 KM 小鼠,照射光源有 UVA + UVB、UVA 及 UVB 照射。

2 细胞衰老模型

人体皮肤由外至内分成表皮层、真皮层和皮下组织层。其中人皮肤成纤维细胞(HSF)主要位于真皮层(少部分存在表皮层),人皮肤角质形成细胞(HaCaT)位于表皮层。由于 UVB 主要伤及皮肤表皮层,而 UVA 可到达真皮层,因此,多使用 UVA 和 UVB 分别照射 HSF 细胞和 HaCaT 细胞构建模型。

目前,许多研究学者多采用过氧化氢(H₂O₂)或 UV 诱导的 HSF 细胞和 HaCaT 细胞构建皮肤衰老的体外模型^[17]。模型的建立包括利用 H₂O₂ 或 UV 诱导、检测相关衰老指标。采用不同剂量(UV 剂量=UV 辐照强度×照射时间)的光照射后,观察其相关衰老指标,用以判断造模是否成功。

相关衰老指标包括衰老相关生物标志物、抗氧化酶指标和过氧化产物、胶原代谢指标及其他指标。(1)衰老相关生物标志物:主要包括经典的 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)和近年新兴的无声信息调节基因 T1(Sirt-1),其中 SA-β-gal 属于衰老因素,而 Sirt-1 属于抗衰老因素^[18]。因此,不难发现成功的衰老模型测得的指标为 SA-β-gal 活性增加,Sirt-1 表达减少。(2)抗氧化酶指标和过氧化产物:衰老细胞内自由基含量升

高,活性氧(ROS)形成增多。一方面,自由基的氧化能力使脂类过氧化分解代谢形成丙二醛(MDA),MDA 含量增加;另一方面,细胞内抗氧化剂和自由基清除剂不足以维持抗氧化水平,因此检测谷胱甘肽过氧化物酶(GSP-PX)和超氧化物歧化酶(SOD)水平均降低。(3)胶原代谢指标:胶原蛋白中富含羟脯氨酸(Hyp),随着细胞衰老,Hyp 生成减少。此外,基质金属蛋白酶(MMP)与金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)相互拮抗,共同维持皮肤中的胶原蛋白含量。在衰老细胞中可测得 MMP-1、MMP-2、MMP-7、MMP-9 的表达上调和 TIMPs 的表达下调^[19]。(4)其他指标:可以检测线粒体激活蛋白激酶(MAPK)的磷酸化和 c-Jun 磷酸化水平。

皮肤结构的完整性主要由胶原蛋白构成,而 HSF 细胞存在的真皮层含有胶原纤维,故 HSF 细胞衰老模型应用更广泛。细胞衰老模型虽实验因素可控,但由于是体外环境,与体内衰老的情况存在一定差异,因此具有一定局限性。以下为 2 种细胞造模方法。

2.1 HSF 细胞

2.1.1 UVA 诱导的 HSF 细胞衰老模型

一般通过设置一系列梯度的 UV 剂量组分别进行照射,得到 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 的剂量组,并选取该剂量作为后续诱导衰老的剂量。建立老化模型的 UVA 剂量大多数选择细胞毒性低的 3 J/cm^2 剂量^[20-21]。照射后,检测 HSF 细胞增殖活性降低和凋亡率上升^[22]。细胞内 ROS 水平增加,SOD 和 GSP-PX 水平下降导致了过氧化脂质(LPO)水平上升^[20]。另外,弹性蛋白酶深度参与弹性纤维网络的破坏,经照射后弹性蛋白酶的活性明显增加^[23]。

2.1.2 UVB 诱导的 HSF 细胞衰老模型

本模型 UVB 剂量的选择范围为 $5 \sim 300 \text{ mJ/cm}^2$ ^[24-25]。有研究表明,当照射剂量大于 25 mJ/cm^2 时开始对 HSF 细胞造成损伤,并且细胞活力呈剂量依赖性降低;选取 25 mJ/cm^2 进行照射,结果显示,HSF 细胞中 MMP-1 mRNA 和蛋白表达量显著增加,人 I 型胶原蛋白(COL-I) mRNA 和蛋白表达水平显著降低^[26]。

2.1.3 H_2O_2 诱导的 HSF 细胞衰老模型

选取不同浓度的 H_2O_2 处理 HSF 细胞,得出 $200 \mu\text{mol/L}$ H_2O_2 是建立衰老细胞模型的最佳浓度^[27]。经处理 1 h 后,细胞增殖活力明显下降,SA- β -gal 活性增加,ROS 和 MDA 水平上升,SOD 和过氧化氢酶的活性明显下降,DNA 损害物 8-OHdG 水平升高。

2.2 HaCaT 细胞

2.2.1 UVB 诱导的 HaCaT 细胞衰老模型

照射诱导 HaCaT 细胞衰老的 UVB 剂量大部分为 30 mJ/cm^2 ^[28]。照射 24 h 后检测 HaCaT 细胞得到细胞存活

率降低、细胞黏附力下降、贴壁性降低^[29],SA- β -gal 表达增加,Sirt-1 的活性相对下降。

2.2.2 UVA 诱导的 HaCaT 细胞衰老模型

使用 UVA 造模的方法较少,测量的指标较局限。LI 等^[30]采用 30 J/cm^2 剂量的 UVA 诱导 HaCaT 细胞,测得细胞内 ROS 水平增加,MMP 水平下降,ATP 水平降低,辅酶 I⁺/还原型辅酶 I 比率下降。

3 小结及展望

目前,关于衰老的机制有多种学说支持,但仍需通过长期大量的实验探究其具体机制。这些实验均离不开模型构建,使用合适的方法往往可以达到事半功倍的效果。理解衰老完整的生物学基础有助于人类延缓衰老,例如发现新的靶点药物。建议研究者根据自己的实验目的选择最佳的造模方法,从而更加准确模拟人体内、外环境。另外,目前缺乏关于中西医结合的致衰老模型,值得研究者进一步探索。

参考文献

- [1] 刘建亚,冯文静,王仁萍,等. D-半乳糖致衰老动物模型及其机制研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志,2018,17(3):224-227.
- [2] 张常娥,魏伟,刘英华,等. D-半乳糖亚急性衰老大鼠模型的建立及评价[J]. 中国老年学杂志,2012,32(4):742-745.
- [3] 吴亚妮,唐寅,王妹畅,等. 山茶油对 D-半乳糖致衰老小鼠皮肤抗衰老功效的代谢组学研究[J]. 日用化学工业,2021,51(7):632-638.
- [4] 陈耕. 左旋芳樟醇的小鼠体内抗氧化及抗皮肤衰老活性研究[J]. 食品与机械,2021,37(2):169-172.
- [5] 姜国良,于晓,徐恺,等. 腹腔和皮下注射 D-半乳糖衰老大鼠模型分析[J]. 中国老年学杂志,2013,33(5):1101-1103.
- [6] 宋梅英,赖爱鸾,张李松. 雌激素对大鼠皮肤老化的影响及相关分子机制探讨[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志(电子版),2018,14(2):158-165.
- [7] 陈教全,梁碧华,彭丽倩,等. 330 例慢性光化性皮炎患者紫外线最小红斑量测定[J]. 皮肤性病诊疗学杂志,2021,28(2):105-109.
- [8] 李敏,赵飞. 维生素甲酸在中长波紫外线诱导小鼠皮肤光老化模型中的作用[J]. 中国老年学杂志,2021,41(12):2630-2633.
- [9] 李贺,钱柳青,陈雪,等. 铁皮石斛超微粉对光老化模型小鼠的预防作用及机制研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(21):4677-4684.
- [10] 陈小玫,汪盛,李利. 不同皮肤老化小鼠模型的

- 比较[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2019, 33(6): 651-656.
- [11] 钟沁月, 侯君, 肖雯婧, 等. 花椒精油抑制紫外线辐射致小鼠皮肤光老化[J]. 西南国防医药, 2020, 30(3): 188-191.
- [12] 雷波. 芦荟多糖对光老化大鼠皮肤中 SOD、GSH-Px、Hyp、CAT、MDA 水平的影响[J]. 宜春学院学报, 2020, 42(12): 73-75.
- [13] CHAQUOUR B, SEITÉ S, COUTANT K, et al. Chronic UVB- and all-trans retinoic-acid-induced qualitative and quantitative changes in hairless mouse skin[J]. J Photochem Photobiol B, 1995, 28(2): 125-135.
- [14] 朱彦君, 冯光珍, 孟宇宏, 等. 皮肤光老化动物模型的建立[J]. 中国体视学与图像分析, 2004, 9(1): 51-54.
- [15] 陶丛敏, 冶娟, 马文宇, 等. 青海黑果枸杞原花青素对小鼠光老化皮肤的保护作用[J]. 实用皮肤病学杂志, 2018, 11(2): 74-77.
- [16] 孔悦, 郭砚. 皮肤光老化小鼠模型的构建及效果评估[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(2): 116-121.
- [17] GRUBER F, KREMSLEHNER C, ECKHART L, et al. Cell aging and cellular senescence in skin aging-recent advances in fibroblast and keratinocyte biology[J]. Exp Gerontol, 2020, 130: 110780.
- [18] CHEN C, ZHOU M, GE Y, et al. SIRT1 and aging related signaling pathways [J]. Mech Ageing Dev, 2020, 187: 111215.
- [19] 任润健, 刘天一, 方磊, 等. PDGF-BB 对光老化皮肤成纤维细胞 TIMPs 及胶原蛋白的影响[J]. 中国美容整形外科杂志, 2018, 29(12): 739-742.
- [20] LIANG B, PENG L, LI R, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects HSF cells against ultraviolet-induced damage through the activation of Nrf2[J]. Cell Mol Biol Lett, 2018, 23: 18.
- [21] HSEU Y C, CHANG C T, GOWRISANKAR Y V, et al. Zerumbone exhibits antiphotaging and dermatoprotective properties in ultraviolet a-irradiated human skin fibroblast cells via the activation of Nrf2/ARE defensive pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 4098674.
- [22] QIN H, ZHANG G, ZHANG L. GSK126 (EZH2 inhibitor) interferes with ultraviolet a radiation-induced photoaging of human skin fibroblast cells [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(4): 3439-3448.
- [23] 殷庆飞, 陈田. 人真皮成纤维细胞受长波紫外线辐照引起基因表达动态变化[J]. 日用化学工业, 2021, 51(9): 874-880.
- [24] 张杰, 高波. UVB 诱导人皮肤成纤维细胞的 SMP30 基因表达变化[J]. 东南国防医药, 2018, 20(2): 126-129.
- [25] 李锋, 李清仙, 程志远, 等. 坛紫菜多酚抗氧化及抑制 UVB 致 HSF 细胞氧化损伤作用[J]. 食品科学, 2017, 38(17): 190-197.
- [26] 刘国良, 姚远, 张宁, 等. 补骨脂酚对光老化 HSF 细胞保护作用研究[J]. 中国医药导报, 2019, 16(19): 11-15.
- [27] PAN C, LANG H, ZHANG T, et al. Conditioned medium derived from human amniotic stem cells delays H₂O₂-induced premature senescence in human dermal fibroblasts[J]. Int J Mol Med, 2019, 44(5): 1629-1640.
- [28] 刘川, 黄欣, 王萍, 等. 皮肤角质形成细胞光老化模型的构建及老化机制的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2019, 41(17): 1649-1655.
- [29] 周思思, 姜建国. 红景天对人皮 HSF 和 HaCaT 细胞的抗衰老作用[J]. 现代食品科技, 2018, 34(8): 16-23.
- [30] LI Q, BAI D, QIN L, et al. Protective effect of L-hexaguluroic acid hexasodium salt on UVA-induced photo-aging in HaCaT cells[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(4): 1201.

(收稿日期: 2022-07-19 修回日期: 2023-03-26)