

皮肤光老化小鼠模型的构建及效果评估

孔悦¹, 郭砚²

(1. 青海大学研究生院, 西宁 810001; 2. 青海大学附属医院医学美容科, 西宁 810001)

[摘要] 目的 建立中波紫外线诱导小鼠皮肤光老化动物模型, 为皮肤光老化的研究提供参考。方法 30 只雄性 KM 小鼠分为对照组和模型组, 对照组接受正常光照, 模型组使用 D-半乳糖皮下注射联合中波紫外线每日照射 40 min, 每次辐射量为 120 mJ/cm², 持续 40 d。通过小鼠背部脱毛皮肤表面肉眼观察, 皮肤组织 HE 染色和 Masson 染色病理学观察, 皮肤组织匀浆中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量测定, 以及采用蛋白质印迹法检测小鼠背部脱毛皮肤中基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、c-fos 和 c-jun 的表达水平, 进行建模效果评估。结果 与对照组相比, 模型组小鼠的皮肤颜色加深、松弛、干燥、粗糙, 且褶皱加深; 组织病理染色观察发现, 模型组的表皮增厚, 真皮层纤维减少、断裂、排列杂乱。模型组的皮肤中 GSH-PX 和 SOD 活性降低, HYP 含量降低, MDA 含量增加, 而且 MMP-1、c-fos 和 c-jun 表达水平明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结论 皮下注射 D-半乳糖联合中波紫外线照射后, 小鼠产生的皮肤损伤与光老化的皮肤损伤一致; 该模型可作为一种有效的皮肤光老化小鼠模型。

[关键词] 皮肤光老化; 动物模型; 中波紫外线; D-半乳糖; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0116-06

Construction and Evaluation of Skin Photoaging Mouse Model

KONG Yue¹, GUO Yan²

(1. Graduate School of Qinghai University, Xining 810001, China; 2. Department of Medical Cosmetology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

Correspondence to: GUO Yan, E-mail: qhguoyan@163.com

[Abstract] **Objective** To establish a mouse model of skin photoaging induced by ultraviolet B (UVB) radiation, and to provide a reference for the study of skin photoaging. **Methods** Thirty male KM mice were divided into a control group and a model group. The control group received normal light, while the model group was subcutaneously injected with D-galactose combined with narrow-band UVB daily irradiation for 40 min at a dose of 120 mJ/cm² for 40 d. The skin appearance of mice with fur on the back being removed was observed. Skin tissue pathology was observed after HE staining and Masson staining. Biochemical indexes of skin tissue homogenate including glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD), hydroxyproline (HYP), and malondialdehyde (MDA) were measured by enzymatic analysis. The expressions of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), c-fos, and c-jun were determined by Western blotting. **Results** The skin of the model group was darker, looser, drier, more rough, and deeper than that of the control group. Pathological observation revealed that the epidermis thickened and the dermis fibers were reduced, broken, and disorderly arranged in the model group. In the model group, the activities of GSH-PX and SOD decreased, the content of MDA increased, the content of HYP decreased, and the expression levels of MMP-1, c-fos and c-jun of the model group increased (all $P < 0.01$). **Conclusion** The skin damage of mice induced by subcutaneous injection of D-galactose combined with UVB irradiation is consistent with photoaging, so it is an effective mouse model of skin photoaging.

[Key words] Skin photoaging; Animal model; Ultraviolet radiation B; D-galactose; Mice

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760781)

[作者简介] 孔悦(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 皮肤光老化的防治。E-mail: 516924741@qq.com

[通信作者] 郭砚(1968—), 女, 教授, 从事皮肤病的临床与基础研究以及防治工作。E-mail: qhguoyan@163.com

皮肤是人体最浅表且最大的器官,在保护人体免受环境损害和进行物质交换方面发挥了重要作用。皮肤衰老是一个由基因和外界环境因素等共同导致的复杂过程。皮肤老化分为内源性老化和外源性老化。内源性老化是指由基因决定的随着时间推移产生的自然老化。外源性老化是指环境因素如紫外线辐射、吸烟、毒害化学品等影响下产生的皮肤损害积累,其中紫外线辐射是导致外源性老化最主要的因素^[1]。因此,外源性老化又称为皮肤光老化。建立有效的皮肤光老化动物模型,是研究及防治人体皮肤光老化的基础。

日光中的紫外线 (ultraviolet, UV) 分为 3 个波段: 短波紫外线 (UVC, 190~290 nm)、中波紫外线 (UVB, 290~320 nm) 和长波紫外线 (UVA, 320~400 nm)^[2]。其中 UVC 几乎全被臭氧层吸收,到达地面的主要为 UVA 和 UVB; UVA 的活性很低,而 UVB 活性是 UVA 活性的 1 000 倍^[3]。UVB 主要导致皮肤表皮层和真皮浅层的损伤^[4],可引起皮肤松弛、干燥、粗糙、皱纹加深、色素沉着等,甚至可以导致皮肤癌^[5]。另一方面, D- 半乳糖是生物体内一种生理性的营养成分,在正常代谢中可以转化为葡萄糖。有研究发现,持续给动物注射大剂量 D- 半乳糖可引起与自然衰老相似的生理生化改变^[6-8]。因此,本实验采用窄谱 UVB (311~312 nm) 辐射联合 D- 半乳糖皮下注射的方法建立小鼠皮肤光老化模型,并评估其建模效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物和饲养环境

SPF 级雄性 KM 小鼠 30 只,45 日龄,体质量为 22~25 g,购自西安交通大学医学部实验动物中心[SCXK (陕) 2018-001]。实验小鼠饲养及造模在青海大学医学院高原医学研究中心 SPF 级实验室[SYXK (青) 2020-001]进行,实验期间小鼠自由摄食饮水。本研究获得青海大学附属医院科研伦理委员会的审核批准(编号为 P-SL-2017066)。

1.2 主要试剂

D- 半乳糖和强效 RIPA 裂解液均购自北京索莱宝科技有限公司,HE 染色试剂盒和 Masson 三色染色试剂盒购自南京建成生物工程研究所,聚氰基丙

烯酸正丁酯 (butyleanoacrylate, BCA) 蛋白定量试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 检测试剂盒、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 检测试剂盒及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,兔抗鼠基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、c-fos、c-jun 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗鼠 β -actin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京索莱宝科技有限公司,电化学发光试剂 (electrochemiluminescence, ECL) 购自德国 Merck Millipore 公司。

1.3 主要仪器

40 W UVB 灯 (311~312 nm, TL 40W/01-RS) 为德国 Philips 公司产品,UVB 辐照度监视器 (UV-340A) 为中国台湾路昌电子企业股份有限公司产品,电泳仪 (PowerPac HC) 和化学发光成像仪 (ChemiDoc XRS) 为美国 Bio-Rad 公司产品,全波长酶标仪 (Multiskan GO) 为美国 Thermo Fisher 公司产品。

1.4 动物分组处理

在 22~25 °C、相对湿度为 60% 的环境下,实验小鼠自由饮水进食,适应性饲养 1 周后,通过随机数字表法分为对照组和模型组,每组 15 只。所有小鼠背部使用 4% 硫化钠溶液除去表面毛发,暴露大小约 4 cm × 4 cm 的皮肤,间隔 5 d 脱毛一次。模型组每日于颈背部皮下注射 5% D- 半乳糖 10 mg/kg; 并且将 UVB 灯置于小鼠上方 40 cm 垂直高处,照射前测辐射强度,每次辐射剂量为 120 mJ/cm²,持续 40 d。对照组每日于颈背部皮下注射 0.9% 氯化钠溶液 (即生理盐水) 10 mg/kg,但正常光照饲养。

1.5 皮肤肉眼观察及组织病理学观察

造模过程中,肉眼观察比较对照组和模型组照射后小鼠皮肤的光泽、光滑度等变化情况。实验第 42 天,所有小鼠经腹腔麻醉后颈椎脱臼法处死,剪取颈背部的脱毛皮肤约 4 cm × 4 cm 大小,送至青海大学附属医院中心实验室进行后续操作。去除皮下多余脂肪,取部分皮肤标本摊平

后,用4%多聚甲醛溶液固定,梯度乙醇溶液脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 μm 厚切片,然后行常规HE染色及Masson染色。余下皮肤组织保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待用。

1.6 酶生化法检测皮肤组织中SOD、MDA、HYP和GSH-PX含量

取出部分冷冻的小鼠皮肤组织,用眼科剪剪碎后,按照组织质量(g):试剂体积(mL)为1:9的比例加入0.9%氯化钠溶液,置于冰水浴中匀浆,2 000 $\times g$ 低温离心10 min。取上清液,用0.9%氯化钠溶液稀释成1%的皮肤组织匀浆液,然后按照试剂盒说明书操作,测定SOD、GSH-PX活性和MDA、HYP含量。

1.7 蛋白质印迹法检测皮肤组织中MMP-1、c-fos和c-jun的表达

取小鼠背部皮肤,眼科剪剪碎后加入RIPA裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心5 min后,取上清液。采用BCA法测定上清液中蛋白浓度,进行SDS-PAGE,然后将电泳分离的条带转移至PVDF膜;用1% BSA封闭1 h后,加入1:2 000稀释的一抗(兔抗鼠MMP-1、c-fos、c-jun和 β -actin单克隆抗体),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;再加入1:10 000

稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG),室温孵育50 min;然后用ECL发光液显色,应用Image J软件进行显色条带分析。

1.8 统计学方法

使用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析。每个样本重复检测3次,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

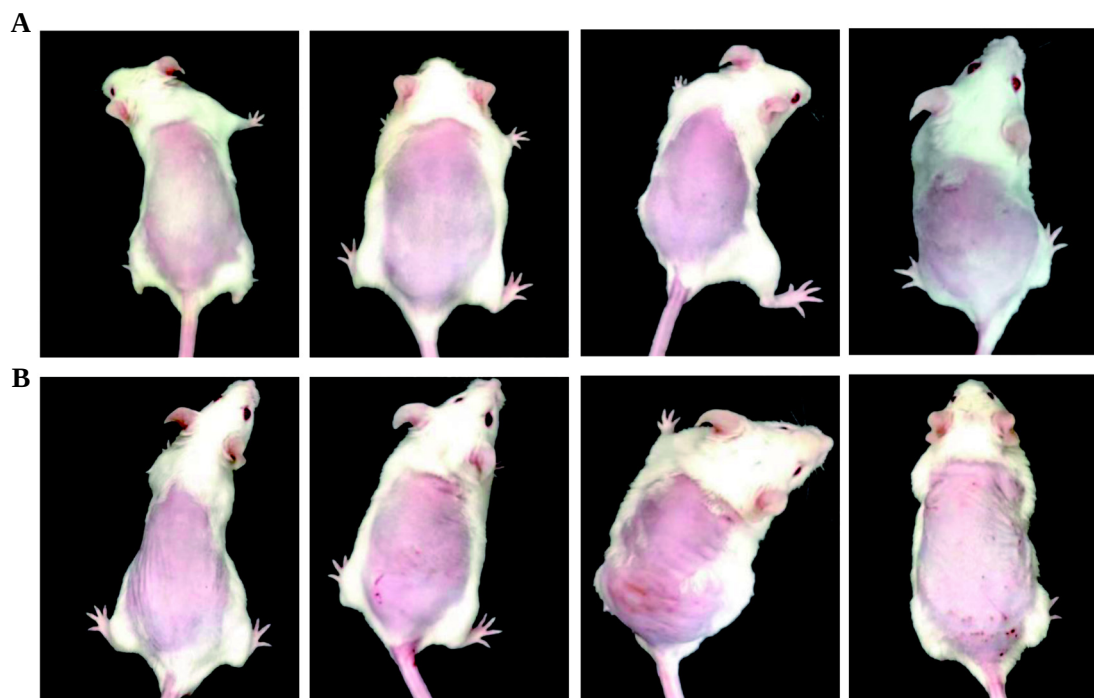
2 结果

2.1 两组小鼠皮肤的肉眼观察

在造模第10、20、30及40天对两组小鼠背部裸露皮肤拍照,肉眼观察结果如图1所示。可发现同一时间,与对照组相比,模型组小鼠经UVB照射后皮肤颜色变红,变松弛,并且明显干燥、脱屑、粗糙,甚至出现皱纹。

2.2 两组小鼠皮肤组织的HE染色

HE染色结果如图2A所示,低倍镜($\times 10$)下,与对照组相比,模型组小鼠UVB照射后表皮变厚,真皮胶原纤维疏松;高倍镜($\times 40$)下,与对照组相比,模型组小鼠经UVB照射后真皮层胶原纤维及弹力纤维缺失、断裂、卷曲,



注: A 为正常对照组, B 为UVB照射模型组;从左到右,依次为造模第10、20、30和40天。

图1 两组小鼠皮肤肉眼观察

Figure 1 Visual inspection of skin of mice in two groups

结构松散, 排列紊乱。

2.3 两组小鼠皮肤组织的 Masson 染色

Masson 染色结果如图 2B 所示, 低倍镜(光镜 $\times 10$)下可发现, 与对照组相比, 模型组的表皮角质层变薄, 真皮层胶原纤维含量减少。高倍镜(光镜 $\times 40$)下可见, 对照组胶原纤维分布均匀, 排列紧密整齐; 而模型组胶原纤维分布不均, 含量减少, 出现断裂, 排列紊乱。

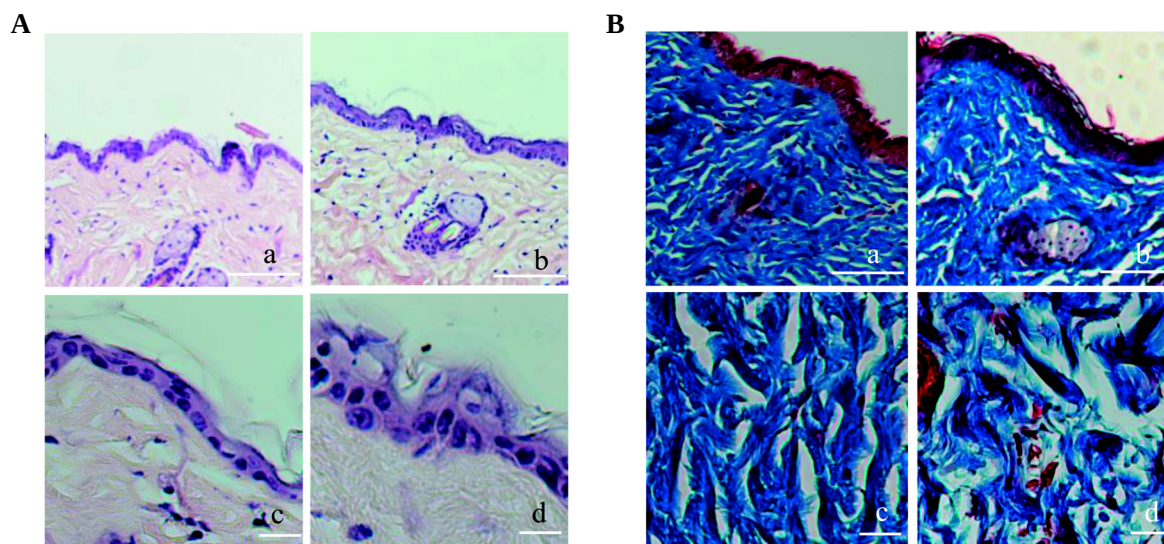
2.4 小鼠皮肤组织的生化指标检测

两组小鼠皮肤组织中各生化指标的检测结果如图 3 所示。与对照组相比, 模型组小鼠皮肤组

织中 SOD 和 GSH-PX 活性明显降低, HYP 含量明显减少, MDA 含量明显增多, 差异均具有统计学意义(t 值分别为 24.578、22.803、14.477 和 18.260, P 值均 < 0.01)。

2.5 小鼠皮肤组织中 MMP-1、c-fos 和 c-jun 蛋白的表达

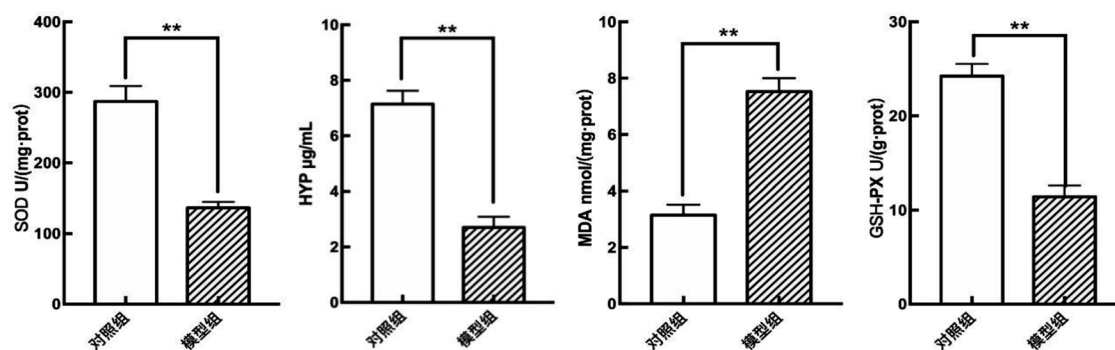
两组小鼠皮肤组织蛋白质印迹法检测结果见图 4。与对照组相比, 模型组小鼠皮肤组织中 MMP-1、c-fos、c-jun 表达水平明显升高, 差异均具有统计学意义(t 值分别为 11.814、10.786 和 7.717, P 值均 < 0.01)。



注: a 和 c 为正常对照组, b 和 d 为 UVB 照射模型组。a、b 图为低倍镜视野($\times 10$), 标尺为 500 μm ; c、d 图为高倍镜视野($\times 40$), 标尺为 125 μm 。

图 2 两组小鼠皮肤组织的 HE 染色 (A) 和 Masson 染色 (B) 结果

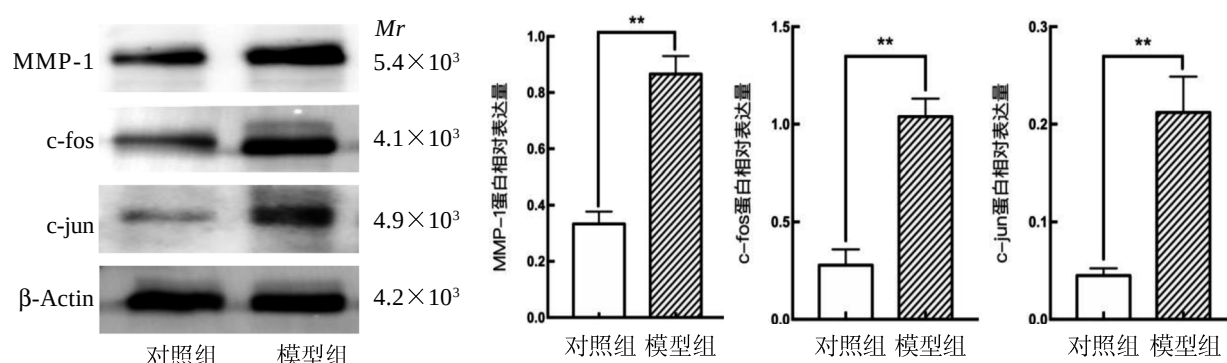
Figure 2 HE staining (A) and Masson staining (B) results of skin tissues of mice in two groups



注: SOD 为超氧化物歧化酶, HYP 为羟脯氨酸, MDA 为丙二醛, GSH-PX 为谷胱甘肽过氧化物酶。* $P < 0.01$, 每组 15 只。

图 3 两组小鼠皮肤组织中 SOD、HYP、MDA 和 GSH-PX 含量

Figure 3 Contents of SOD, HYP, MDA and GSH-PX in skin tissues of mice in two groups



注: MMP-1 为基质金属蛋白酶 1, c-fos 和 c-jun 为快速反应蛋白。** $P < 0.01$, 每组 15 只。

图 4 两组小鼠皮肤组织中 MMP-1、c-fos 和 c-jun 蛋白的表达量

Figure 4 Expressions of MMP-1, c-fos and c-jun in skin tissues of mice in two groups

3 讨论

随着社会老龄人口的增加,人们对皮肤衰老的关注度日益提高。皮肤衰老中 80% 都是光老化,因此有关光老化的研究具有重要意义,而建立简单有效的光老化动物模型可为光老化相关研究提供基础。在实验动物方面,有研究证实,无毛鼠可以直接用于光老化造模,且其发生的皮肤损伤与人类皮肤光老化极为相似^[9];但是由于无毛鼠的价格昂贵,国内学者多选择人工脱毛后的实验鼠来构建皮肤光老化的动物模型^[10-12]。

在光老化造模的光源方面,目前人们常用的是 UVB 和 UVB + UVA 辐射。而本研究选用的是 UVB 照射,同时联合 D-半乳糖皮下注射,成功建立了小鼠皮肤光老化模型。与 UVB 辐射模型和 UVB + UVA 辐射模型相比,本研究的造模时间更短,并且兼顾内源性老化和外源性老化,更加符合实际;而且本研究建模小鼠的皮肤光老化情况更加符合自然状态下受 UV 辐射和内环境共同影响的皮肤状况。另外,与 UVB + UVA 联合辐射模型相比,虽然本研究的 UVB 光源较单一,但其活性远高于 UVA,是导致皮肤光老化的主要因素;为了使造模更加经济、简便,故本研究选用 UVB 联合 D-半乳糖皮下注射的方法建立小鼠皮肤光老化模型。

氧化应激是皮肤光老化的机制之一^[13]。UV 辐射可诱导机体产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS),从而导致组织损伤,细胞内酶抗氧化系统中的 SOD 和 GSH 被大量消耗,氧

化的终产物 MDA 增多,间接反映了机体细胞的氧化损伤程度^[2]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一类需要钙、锌等金属离子作为辅助因子的蛋白水解酶,几乎可以水解细胞外基质中的全部蛋白成分^[14]。UV 辐射可以激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路和核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 通路,从而增加 MMPs 的表达^[15-16]。MMPs 参与皮肤光老化、皮肤创伤修复等过程的细胞外基质重构^[17]。而且 MMPs 可以破坏皮肤胶原蛋白,这是皮肤老化的直接原因^[18]。其中, MMP-1 可降解 I 型和 III 型纤维胶原蛋白,引起胶原纤维的碎裂,在细胞外基质的修复过程中起到重要作用^[19]。细胞核内原癌基因 c-fos 和 c-jun 属于伤害性信息与即刻早期基因,其编码的蛋白为转录因子,可诱导下游基因的转录和表达,在细胞增殖和凋亡中起到重要的调节作用^[20]。

本实验结果显示,模型组小鼠的皮肤肉眼可见变红、松弛、粗糙、色素沉着、皱纹增加等;病理观察可发现表皮增厚,胶原纤维含量减少,排列紊乱。而且,模型组小鼠的皮肤组织中 SOD 和 GSH 活性降低, HYP 含量减少,而 MDA 含量增多, MMP-1 和 c-fos、c-jun 表达也明显增多,与自然光老化皮肤的损伤机制一致^[21-22]。因此,本研究的造模方法可用于复制有效的小鼠皮肤光老化模型。

需要说明的是,本研究未对皮肤光老化损伤程度与 UVB 辐射强度和 D-半乳糖注射剂量之间的

关系做深入分析,今后拟通过设置不同的UVB辐射强度和不同的D-半乳糖剂量组,进一步探讨造模过程中UVB辐射强度及D-半乳糖剂量对光老化损伤程度的影响。

参考文献:

- [1] GARRE A, NARDA M, VALDERAS-MARTINEZ P, et al. Antiaging effects of a novel facial serum containing L-Ascorbic acid, proteoglycans, and proteoglycan-stimulating tripeptide: *ex vivo* skin explant studies and *in vivo* clinical studies in women[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2018, 11:253-263. DOI:10.2147/CCID.S161352.
- [2] 吴斯敏, 杨慧龄. 紫外线引起皮肤光老化机制及防治的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(2):341-346. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2018.02.025.
- [3] OLIVEIRA M M, RATTI B A, DARÉ R G, et al. Dihydrocaffeic acid prevents UVB-induced oxidative stress leading to the inhibition of apoptosis and MMP-1 expression via p38 signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:2419096. DOI:10.1155/2019/2419096.
- [4] SKLAR L R, ALMUTAWA F, LIM H W, et al. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review[J]. Photochem Photobiol Sci, 2013, 12(1):54-64. DOI:10.1039/c2pp25152c.
- [5] 龚婕, 马良娟. 皮肤光老化和抗氧化剂研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(11):692-695.
- [6] 龚国清, 徐赓本. 小鼠衰老模型研究[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(2):101-103.
- [7] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview[J]. Biogerontology, 2019, 20(6):763-782. DOI:10.1007/s10522-019-09837-y.
- [8] FOLCH J, BUSQUETS O, ETTCHETO M, et al. Experimental models for aging and their potential for novel drug discovery[J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(10):1466-1483. DOI:10.2174/1570159x15666170707155345.
- [9] LIM J Y, KIM O K, LEE J, et al. Protective effect of the standardized green tea seed extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice[J]. Nutr Res Pract, 2014, 8(4):398-403. DOI:10.4162/nrp.2014.8.4.398.
- [10] 郭鲁义, 李春雨, 张宁, 等. 实用光老化动物模型建立方法的探讨[J]. 中国美容医学, 2008, 17(2):235-237. DOI:10.3969/j.issn.1008-6455.2008.02.031.
- [11] 张璃, 梁虹. 小白鼠皮肤光老化模型的建立[J]. 广东医学, 2005, 26(12):1642-1643. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2005.12.026.
- [12] 杨汝斌, 万屏, 刘玲, 等. SD大鼠光老化模型中氧化性损伤及灯盏花素的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(6):1180-1182. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2012.06.031.
- [13] 刘媛, 李福民, 廖金凤, 等. 皮肤光老化机制研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2016, 45(6):479-481. DOI:10.16761/j.cnki.1000-4963.2016.06.029.
- [14] KIM J, LEE C W, KIM E K, et al. Inhibition effect of Gynura procumbens extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1):427-433. DOI:10.1016/j.jep.2011.04.072.
- [15] MUTHUSAMY V, PIVA T J. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways[J]. Arch Dermatol Res, 2010, 302(1):5-17. DOI:10.1007/s00403-009-0994-y.
- [16] VICENTINI F T, HE T Y, SHAO Y, et al. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway[J]. J Dermatol Sci, 2011, 61(3):162-168. DOI:10.1016/j.jdermsci.2011.01.002.
- [17] YU W, YING H H, TONG F D, et al. Protective effect of the silkworm protein 30Kc6 on human vascular endothelial cells damaged by oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL)[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e68746. DOI:10.1371/journal.pone.0068746.
- [18] TAKAHASHI Y, FUKUSHIMA Y, KONDO K, et al. Facial skin photo-aging and development of hyperpigmented spots from children to middle-aged Japanese woman[J]. Skin Res Technol, 2017, 23(4):613-618. DOI:10.1111/srt.12380.
- [19] 顾振华, 汪俊军. 基质金属蛋白酶-1的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(11):1028-1031. DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2006.11.022.
- [20] FISHER G J, TALWAR H S, LIN J, et al. Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid[J]. Photochem Photobiol, 1999, 69(2):154-157. DOI:10.1562/0031-8655(1999)0690154: mmopih>2.3.co;2.
- [21] 邓映, 杜宇, 刘萍, 等. 氧化应激在皮肤光老化中的作用[J]. 中国医疗美容, 2020, 10(8):117-122. DOI:10.19593/j.issn.2095-0721.2020.08.030.
- [22] 林芳. 金属蛋白酶在皮肤光老化信号通路中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(11):2502-2507. DOI:10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.033.

(收稿日期: 2020-11-10 修回日期: 2021-03-05)