



维生素 C 对紫外线诱导的光老化大鼠皮肤结构的影响

楼彩霞¹, 高擎², 孙侠¹, 黄威¹, 钟志勇¹, 邝少松¹, 葛亚中²

(1. 广东省医学实验动物中心比较医学实验室, 佛山, 广东 528248; 2. 无限极(中国)有限公司, 广州, 广东 510000)

【摘要】 目的 研究维生素 C 对光老化大鼠皮肤结构的保护作用, 为临床用药和保健提供依据。**方法** 用紫外线辐射背部皮肤的方法建立光老化大鼠模型, 每周照射 2 次, 连续 4 周, UVA 累计辐射量为 123 J/cm², UVB 累计辐射量为 5 J/cm²。造模期间, 大鼠每天灌胃给予维生素 C 溶液 50 mg/kg, 持续 30 d。实验结束后, 比较模型组和治疗组照射部位皮肤在大体形态、光镜和透射电镜下的组织结构差异。**结果** 与模型组相比, 维生素 C 组以下方面的皮肤结构损伤程度得到减轻: 红疹、溃疡、表皮细胞增生、表皮增厚、真皮血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生、内质网扩张、线粒体肿胀和空泡化、弹力纤维变性和局灶性蓄积、胶原纤维横断面粗细不均。**结论** 大鼠皮肤光老化模型建立成功。维生素 C 对紫外线诱导的光老化皮肤结构损伤有明显的保护作用。

【关键词】 维生素 C; 抗光老化; 皮肤结构; 模型, 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0023-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.005

Effects of vitamin C on UV-induced photoaged skin in rats

LOU Cai-xia¹, GAO Qing², SUN Xia¹, HUANG Wei¹, ZHONG Zhi-yong¹, KUANG Shao-song¹, GE Ya-zhong²

(1. Laboratory of Comparative Medicine, Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan, Guangdong 528248, China; 2. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510000, China)

【Abstract】 Objective To study the protective effect of vitamin C on UV-induced photoaged skin structure in rats and provide a basis for clinical medicine and health care. **Methods** Photoaging skin models were set up by chronic ultraviolet radiation in 24 SPF female Sprague-Dawley rats, irradiated twice weekly for 4 weeks. The rat photoaged skin was induced by exposure to a total dose of 123 J/cm² UVA and 5 J/cm² UVB for 4 weeks. Vitamin C was administered by gastric gavage in a dose of 50 mg/kg once daily for 30 days during the model development. We compared the pathological changes in the irradiated skin using HE, Masson's trichrome and Victoria blue B staining, and compared the ultrastructural changes by electron microscopy. **Results** Rat models with photoaged skin were developed successfully. The vitamin C group showed significant reduction of pathological severity including erythema, ulcers, epidermal cell proliferation, epidermal thickness, dermis vasodilation, inflammatory cell infiltration, fibroblast proliferation, endoplasmic reticulum dilatation, mitochondrial swelling and vacuolization, elastic fibers degeneration and focal accumulation, collagen fibers swelling with uneven thickness, compared with the rats of model group at the irradiation site. **Conclusions** Vitamin C is effective in reducing the structural damage of UV-induced photoaged skin in rats.

【Key words】 Vitamin C; Anti-photoaging; Skin structure; Model rat; Histopathology; Pathology; Electron microscopy

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:81403212); 广东省医学科研基金(编号:B2014062); 广东省中医药管理局基金(编号:20142019)。

【作者简介】 楼彩霞(1983-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 药理学和保健食品功能评价。E-mail: alou_1218@163.com。

【通讯作者】 葛亚中, E-mail: Star.Ge@infinitus-int.com。

皮肤细胞经常暴露于外源性和内源性来源的活性氧(ROS)和氧化应激中,由于紫外线可以增强细胞活性氧的产生,使得皮肤老化通常与紫外线辐射密切相关^[1]。紫外线辐射是致皮肤老化或皮肤癌发展最重要的环境因素,通过降低暴露于紫外线的辐射水平或增加抗氧化防御有效地清除活性氧能够减少皮肤的老化损伤^[2]。可以保护我们皮肤的内源性物质是黑色素和酶的抗氧化剂,补充抗氧化剂可以对紫外线辐射起到保护作用^[1]。日常生活中引起皮肤光老化的紫外线,主要是长波 UVA 和中波 UVB。UVA 具有很强的穿透力,有超过 98% 能到达地球表面,可以直达肌肤的真皮层,破坏弹性纤维和胶原纤维;UVB 具有中等穿透力,仅有不足 2% 能到达地球表面,对皮肤具有红斑作用。维生素 C 常被作为化妆品添加物用于防治皮肤老化,抗氧化方面的指标研究得比较多,它作为抗氧化剂、酪氨酸酶抑制剂,可以诱导胶原合成,对皮肤皱纹、质地、强度和均匀度有修复的功效^[3],对人体皮肤癌细胞因紫外线辐射诱导的细胞凋亡有保护作用^[4]。由于人体皮肤组织标本不易获取,动物实验在一定程度上可以弥补人体试验的局限性。目前未见针对维生素 C 对光老化动物皮肤在电镜和光镜下结构影响的报道。本研究一方面通过大致模拟日光中 UVA 和 UVB 辐射比例参数,采用 UVA + UVB 紫外线辐射的方法建立光老化大鼠模型,为光老化动物模型研究提供背景数据和方法学参考;另一方面通过采用在大鼠造模期间灌胃给予维生素 C 的方法,研究模型组和维生素 C 组照射部位皮肤在大体形态、光镜和透射电镜下组织结构的差异。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

SPF 级 SD 大鼠,24 只,雌性,体重(180 ~ 220)g,均购于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0002]。本实验所有动物实验操作均在广东省医学实验动物中心实验设施内进行[SYXK(粤)2013-0002]。

1.2 主要试剂

维生素 C 片(批号 130803),广东华南药业集团有限公司;石蜡、二甲苯、酒精、丽春红,上海试剂三厂;伊红、苏木素,广州市中南化学试剂有限公司;维多利亚蓝 B(批号 1112067),Aladdin Chemistry;中性树胶,中国上海标本模型厂。

1.3 主要仪器

紫外光疗仪,天津市合普科技有限公司;BS224S 天平,德国 Sartorius 公司;TS-12N 全自动生物组织脱水机,湖北宏业医用仪器有限公司;RM2135 轮转切片机,德国徕卡;RS-18II 全自动生物组织染色机,湖北宏业医用仪器有限公司;正置光显微镜, Olympus BX41; Image-Pro Express 5.1.1.14 病理图像分析系统;Hitachi(日立)-7650 透射电子显微镜。

1.4 动物造模

将检疫合格的 24 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组和维生素 C 组,每组 8 只。空白对照组不进行任何处理;模型组每次照射前,在大鼠背部 5 cm × 5 cm 区域内剃毛,使皮肤充分暴露,将大鼠置于头部避光、背部暴露的固定器中,放入紫外光疗仪(UVA + UVB)灯具正下方的 30 cm 处照射,每周照射 2 次,连续照射 4 周,UVA 累计辐射量为 123 J/cm²,UVB 累计辐射量为 5 J/cm²;维生素 C 组参照模型组方法照射紫外线。本实验所有动物实验操作均经过广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会批准。

1.5 维生素 C 干预

空白对照组不进行任何处理;模型组灌胃同体积溶媒,每周照射紫外线 2 次,连续照射 4 周;大鼠给予维生素 C 的剂量为每天 50 mg/kg,连续灌胃 30 d,期间每周照射紫外线 2 次。造模过程中,观察大鼠照射部位皮肤的变化。

1.6 组织学检测

给药 30 d 后,动物用 3% 戊巴比妥钠麻醉,安乐处死,切取受试部位皮肤进行检测。各组每只动物的受试部位皮肤同时分成两份进行处理:一部分皮肤切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小,放置于 4% 多聚甲醛液固定,常规制作石蜡切片,分别进行苏木精-伊红染色法(H&E)、马松三色法(Masson's trichrome)、维多利亚蓝 B(Victoria blue B)染色;另一部分皮肤切成 1 mm × 2 mm 大小,放置于 3.1% 的 4℃ 戊二醛溶液固定,常规制作电镜样品,超薄切片,透射电镜观察各组之间受试部位皮肤病理学形态差异。

2 结果

2.1 大体观察

除空白对照组外,其他组动物在造模期间照射部位皮肤出现不同程度的皮损,如红疹、溃疡、结痂

等。实验结束时,空白对照组大鼠皮肤正常,肉眼未见皮损,表皮厚薄均匀;模型组大鼠紫外线辐射部位皮肤表面出现局部红疹、溃疡、结痂,表皮厚薄不均;维生素 C 组大鼠紫外线辐射部位皮肤表面出现少量红疹、溃疡、结痂,表皮厚度增厚,程度都较模型组减轻。(图 1 见文后彩插 1)。

2.2 皮肤组织 H&E、Masson's trichrome、Victoria blue B 染色结果

经 H&E 染色后,空白对照组皮肤表皮厚薄均匀,皮脂腺未见明显增生;模型组紫外线照射部位皮肤表面局部坏死结痂,表皮细胞明显增生,表皮厚度明显增厚,厚薄不均,真皮层血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生,皮脂腺明显增生,毛囊明显增大;维生素 C 组皮肤真皮间质血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生较模型组减轻。图 2,见文后彩插 1。

经 Masson's trichrome 染色后,空白对照组胶原纤维呈蓝色,弹力纤维呈红色,胶原纤维丰富,弹力纤维较均匀的散在分布在胶原束之间;模型组真皮层纤维排列较乱,弹力纤维变性、局灶性蓄积、增粗、排列紊乱;维生素 C 组皮肤真皮层纤维排列较规整,弹力纤维变性、局灶性蓄积较模型组减轻。(图 3 见文后彩插 2)。

经 Victoria blue B 染色后,空白对照组见胶原纤维呈红色,弹力纤维呈蓝绿色,弹力纤维较均匀地分布在胶原束之间,数量较胶原纤维少;模型组见弹力纤维变性、局灶性蓄积、增粗、排列紊乱;维生素 C 组见弹力纤维变性、局灶性蓄积较模型组减轻。(图 4 见文后彩插 2)。

2.3 电镜检测

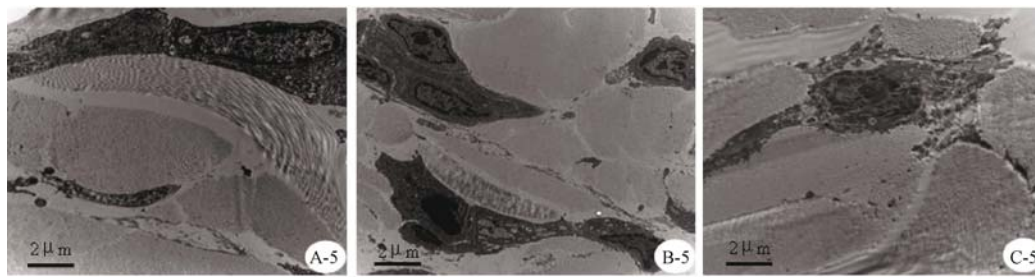
空白对照组表皮细胞之间间隙小,细胞间可见桥粒连接,表皮基底膜完整,真皮纤维排列整齐,成纤维细胞散在稀少,胶原纤维横截面大小较均一,胶原纤维纵切面周期性横纹清晰可见,成纤维细胞形态正常,胞质内见大量粗面内质网,内质网未见扩张,线粒体未见空泡化,真皮间质血管未见明显扩张充血;模型组表皮细胞之间间隙明显增宽,局部表皮基底膜中断、不连续,真皮纤维排列较乱,真皮层成纤维细胞数目明显增多,胶原纤维肿胀,胶原纤维横断面粗细不均,部分胶原纤维之间见较多致密物质,成纤维细胞内质网高度扩张,线粒体空泡化,局部成纤维细胞周围见新生的网状纤维和弹性纤维,真皮间质血管明显扩张充血、出血;维生素

C 组表皮细胞之间间隙较模型组略减小,表皮基底膜完整,真皮纤维排列较整齐,成纤维细胞数目较模型组减少,胶原纤维横断面粗细较均一,胶原纤维纵切面周期性横纹较清晰,成纤维细胞内质网轻度扩张,间质血管扩张充血、出血较模型组减轻。各组真皮成纤维细胞数目、内质网和线粒体胶原纤维的微观结构变化见图 5、6、7。

3 讨论

本研究采用 UVA + UVB 紫外线辐射的方法,成功建立了光老化大鼠模型,此模型可以广泛用于抗光老化药物的药效学筛选。SD 大鼠由于价格低廉、适用性广、可取材面积大,被本研究选用作为造模动物。杨汝斌等^[5]采用 UVA + UVB 辐射成功建立 SD 大鼠光老化模型,造模结束时 UVA、UVB 辐照强度累计分别为 148.5 J/cm^2 和 21.38 J/cm^2 。在杨研究的基础上,本研究采用了更接近日光 UVA、UVB 比例的辐射参数,更模拟日常光老化环境,大鼠光老化皮肤模型的病理改变和杨报道的基本一致,损伤程度也相应减轻。本研究详细阐述了模型建立之后照射皮肤病理结构上的改变,也通过使用公认的抗氧化剂维生素 C 的干预,表明维生素 C 在一定程度上可以改善光老化大鼠表皮和真皮层皮肤的结构,具有一定的光保护作用,同时也验证了模型的有效性。我们通过本研究其他数据(本文未列出)推测其作用机制可能与增加皮肤中 HYP 含量,提高皮肤 III 型胶原蛋白水平有关。有一点需要说明的是,在我们的实验中,维生素 C 干预的大鼠个体差异比较大,疗效参差不齐。结合文献分析,我们认为导致上述结果的原因可能是由于口服补充抗氧化剂,受到溶解性、皮肤渗透效率、存储过程不稳定等因素的限制,皮肤生物利用度下降^[6]。

国内外研究表明,外用或口服抗氧化剂可以改善紫外线辐射引起的皮肤损伤。Oresajo C 等^[7]研究发现外用含维生素 C、阿魏酸和根皮素的抗氧化剂混合物,对紫外线诱导的光损伤人体皮肤有保护作用;Reeve VE 等^[8]研究发现小鼠口服宁夏枸杞浆汁可以通过抗氧化途径减少由于紫外线辐射引起的皮肤损伤。针对口服补充抗氧化剂的局限性,目前国内外有一些方法可以提高皮肤的生物利用度,如通过外用补充皮肤抗氧化剂增强抗氧化防御、对维生素进行化学修饰、使用新胶体药物递送系统(如微乳液)等,可以达到更好的疗效。

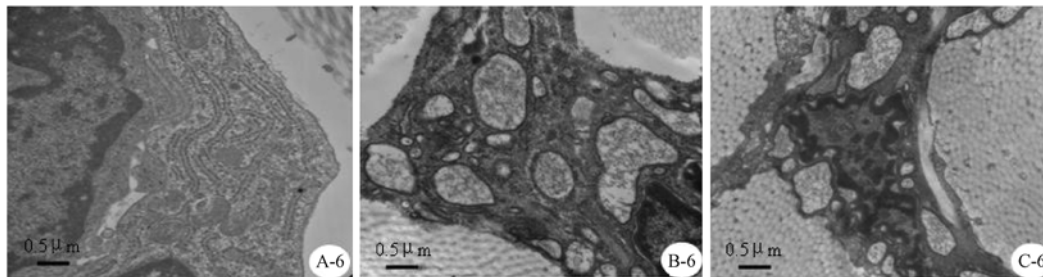


注: A-5:空白对照组;B-5:模型组;C-5:维生素 C 组。

图 5 大鼠皮肤成纤维细胞数目比较(标尺 = 2 μm)

Note: A-5: Control group; B-5: Model group; C-5: Vitamin C group.

Fig. 5 Comparison of the number of fibroblasts in rats with normal or UV-induced photoaged skin. Bar = 2 μm

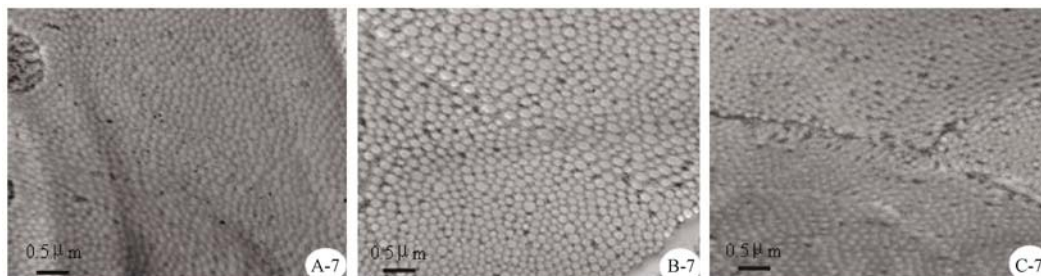


注: A-6:空白对照组;B-6:模型组;C-6:维生素 C 组。

图 6 大鼠皮肤真皮层成纤维细胞内质网和线粒体微观结构比较(标尺 = 0.5 μm)

Note: A-6: Control group; B-6: Model group; C-6: Vitamin C group.

Fig. 6 Comparison of the microstructure of endoplasmic reticulum and mitochondria in dermis fibroblasts of rats with normal or UV-induced photoaged skin. Bar = 0.5 μm.



注: A-7:空白对照组;B-7:模型组;C-7:维生素 C 组。

图 7 大鼠皮肤胶原纤维微观结构比较(标尺 = 0.5 μm)

Note: A-7: Control group; B-7: Model group; C-7: Vitamin C group.

Fig. 7 Comparison of the microstructure of collagen fibers in rats with normal or UV-induced photoaged skin. Bar = 0.5 μm.

参考文献:

- [1] Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects [J]. J Dermatol Sci, 2010, 58(2): 85-90.
- [2] Godic A, Poljšak B, Adamic M, et al. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014; 860479.
- [3] Baumann L, Duque DK, Schirripa MJ. Split-face vitamin C consumer preference study [J]. J Drugs Dermatol, 2014, 13(10): 1208-1213.
- [4] Lin JR, Qin HH, Wu WY, et al. Vitamin C protects against UV irradiation-induced apoptosis through reactivating silenced tumor suppressor genes p21 and p16 in a Tet-dependent DNA demethylation manner in human skin cancer cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2014, 29(6): 257-264.
- [5] 杨汝斌,万屏,刘玲,等. SD 大鼠皮肤光老化动物模型建立方法的探索 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(3): 199-202.

- [6] Ga šperlin M, Gosenca M. Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2011, 8(7): 905 – 919.
- [7] Oresajo C, Stephens T, Hino PD, et al. Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin [J]. J Cosmet Dermatol, 2008, 7(4): 290 – 297.
- [8] Reeve VE, Allanson M, Arun SJ, et al. Mice drinking goji berry juice (*Lycium barbarum*) are protected from UV radiation-induced skin damage via antioxidant pathways [J]. Photochem Photobiol Sci, 2010, 9(4): 601 – 607.
- 〔修回日期〕2015-04-27

《中国比较医学杂志》论文书写格式要求

论文包括中文题目、作者、单位(单位所在地和邮编)、中文摘要以及英文题目、作者、单位与摘要、中文关键词(3~8个)、中图分类号、英文关键词(与中文关键词对应)、正文、参考文献。

1. 题目应简明扼要、准确地反映文章的主题,避免使用非公知公用的缩略语符号和代号。一般以 20 个字内为限,英文题名不宜超过 10 个实词。中英文题名含义应一致。

2. 作者姓名之间以逗号隔开,姓字母全部大写,名第一个字母大写,双名之间加连字符(-)。作者单位要求同中文,后面加 China。不同单位的作者,应在姓名右上角标上角码。作者单位另起一行在作者姓名之下,包括单位全称,所在城市名称和邮编,两端加圆括号。不同单位的作者,应在单位名称前加上与作者名字相同的标识。如:

链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型稳定性观察

蒋 升¹, 谢自敬¹, 张 莉²

(1. 新疆医科大学第一临床医学院内分泌科, 乌鲁木齐 830054; 2. 武警新疆总队医院眼科, 乌鲁木齐 830000)

Observation of Stability of Type I Diabetic Rat Models Induced by Streptozotocin

JIANG Sheng¹, XIE Zi-jing¹, ZHANG Li²

(1. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. Xinjiang General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Urumqi 830091, China)

3. 摘要和关键词

中文摘要应包括目的、方法、结果(应有主要数据)、结论四部分内容。篇幅一般 300 字左右。摘要不分段。英文摘要应有英文题目、作者、作者单位、邮政编码、正文和关键词。英文摘要正文的内容与中文摘要基本相同,可更为详细些,但不宜过长。英文摘要置于中文摘要下方。

关键词是反映文章最主要内容的术语。中英文的意思要相同。关键词之间用分号隔开。

4. 脚注(文章首页左下方):(1)基金项目(论文所受资助的课题基金来源及编号);(2)作者简介(第一作者);(3)通讯作者。第一作者和通讯作者简介包括:姓名(生年-)、性别、职称、学位、研究方向。

5. 正文:格式和层次结构按照引言、材料和方法、结果、讨论 4 部分撰写。各层次标题应简短明确,同一级标题应反映同一层次的内容(格式为 1 1.1 1.1.1 1.2……2 2.1 2.2……)。

凡在文中出现的生物名称请用正确的中英文学名,并在第一次使用时提供其完整的拉丁学名。

凡可用文字说明者均不用图表。每个图表均应有图表题。图表题及其文字说明及注释采用中英文两种文字,先中文后英文。图、表按照在文中出现的顺序编号,图表序号一律用阿拉伯数字。表格一律采用三线表。图表置于正文中。如是彩图,按照顺序统一置于文章参考文献后,作彩版使用。

参考文献采用顺序编码标注,按照引文先后顺序,用阿拉伯数字连续编号。参考文献格式如下:(1)期刊:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 文题[文献标识码]. 刊名,出版年,卷:起-止页。

(2)专著:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 书名(版次)[文献标识码]. 出版地:出版者,出版年:起-止页。

(3)论文集:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 文题[文献标识码]. 见(In):著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 论文集,出版地:出版者,出版年:起-止页。

文献标识码按:期刊[J]、专著[M]、论文集[C]、标准[S]、学位论文[D]。