

# 烟草烟雾提取物通过 Klotho-CHRNA5 轴 诱发皮肤衰老的机制

王艺博<sup>1</sup>, 王颖超<sup>1</sup>, 徐琳琳<sup>1</sup>, 黄淑红<sup>2</sup>, 党宁宁<sup>1</sup>

(1. 山东第一医科大学附属省立医院皮肤科; 2. 山东第一医科大学临床与基础医学院, 山东 济南 250021)

**摘要:** **目的** 探讨烟草烟雾导致抗衰老蛋白 Klotho 与烟碱型乙酰胆碱受体 CHRNA5 表达变化调控皮肤衰老的机制。**方法** 采用烟草烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)处理 HaCaT 角质形成细胞,通过  $\beta$ -半乳糖苷酶染色及 Western blotting 检测细胞衰老相关表型及 CHRNA5、Klotho 蛋白表达变化。随后,在 3~5 月龄、6~7 月龄及 14 月龄小鼠中,利用 HE 染色、免疫组化、Western blotting 及 RT-qPCR 分析皮肤组织中 CHRNA5、Klotho 及衰老相关标志物的年龄依赖性变化。进一步地,在野生型与 Klotho 基因敲低小鼠中,通过免疫组化、Western blotting 及 RT-qPCR 验证 Klotho 敲低效率,并检测 Klotho 基因对 CHRNA5 及衰老标志物的表达的影响。最后,对 HaCaT 细胞分别进行 Klotho 或 CHRNA5 的 siRNA 干扰,采用 Western blotting 及 RT-qPCR 检测两者及相关衰老标志物的表达,以验证其相互关系。**结果** CSE 处理可诱导 HaCaT 细胞衰老,表现为  $\beta$ -半乳糖苷酶染色阳性细胞显著增加( $P=0.0004$ ),同时伴随 CHRNA5 蛋白水平显著上调( $P=0.0002$ )及 Klotho 蛋白水平下调( $P=0.0025$ )。在 14 月龄小鼠衰老小鼠相较于 3-5 月龄小鼠,皮肤表皮厚度减少( $P<0.0001$ ),CHRNA5 升高( $P=0.0009$ ),而 Klotho 降低( $P=0.0001$ )。在 Klotho 基因敲低小鼠中,皮肤组织出现加速衰老表型,并伴随 CHRNA5 上调( $P=0.0107$ )。在 Klotho 敲低的 HaCaT 细胞中,同样观察到衰老标志物上升及 CHRNA5 表达增强( $P=0.0347$ )。相反,CHRNA5 敲低可显著降低 p16 和 p21 等衰老相关标志物的表达( $P=0.0023$ ;  $P=0.0054$ )。**结论** 烟草提取物可以下调 Klotho 表达,及上调 CHRNA5 表达促进角质形成细胞衰老,进而促进皮肤衰老。

**关键词:** 烟草烟雾提取物; Klotho; CHRNA5; 角质形成细胞; 皮肤衰老

中图分类号: R574

文献标志码: A

## Mechanism of skin aging induced by cigarette smoke extract via the Klotho-CHRNA5 axis

WANG Yibo<sup>1</sup>, WANG Yingchao<sup>1</sup>, XU Linlin<sup>1</sup>, HUANG Shuhong<sup>2</sup>, DANG Ningning<sup>1</sup>

(1. Department of Dermatology, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University;

2. School of Clinical and Basic Medicine, Shandong First Medical University, Jinan 250021, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To investigate how cigarette smoke accelerates skin aging by focusing on the interaction between the anti-aging protein Klotho and the tobacco-associated receptor CHRNA5, and explore potential targets for skin rejuvenation strategies. **Methods** HaCaT cells were treated with CSE(cigarette smoke extract). Cellular senescence and the expression of CHRNA5 and Klotho proteins were assessed by  $\beta$ -galactosidase staining and Western blotting. Subsequently, skin samples from mice aged 3-5, 6-7, and 14 months were analyzed using H&E staining, immunohistochemistry, Western blotting, and RT-qPCR to determine age-dependent changes in CHRNA5, Klotho and senescence-associated markers. Furthermore, in Klotho-knockdown mice, we assessed the efficiency of Klotho silencing and the effects of

*Klotho* on both CHRNA5 expression and senescence markers using immunohistochemistry, Western blotting and RT-qPCR. Finally, HaCaT cells were transfected with siRNAs targeting *Klotho* or *CHRNA5*, and the expression of both genes and related senescence markers was measured by Western blotting and RT-qPCR to verify their regulatory relationship. **Results** CSE exposure induced senescence in HaCaT cells, as evidenced by a significant increase in  $\beta$ -galactosidase-positive cells ( $P=0.0004$ ), accompanied by the upregulation of CHRNA5 ( $P=0.0002$ ) and the downregulation of *Klotho* ( $P=0.0025$ ). In 14-month-old mice, compared with 3-5-month-old controls, the epidermis was thinner ( $P<0.0001$ ), CHRNA5 was elevated ( $P=0.0009$ ), and *Klotho* was markedly decreased ( $P=0.0001$ ). In *Klotho*-knockdown mice, accelerated skin aging phenotypes were observed along with increased CHRNA5 expression ( $P=0.0107$ ). Similarly, *Klotho*-knockdown HaCaT cells exhibited enhanced senescence markers and elevated CHRNA5 expression ( $P=0.0347$ ). In contrast, *CHRNA5* knockdown significantly reduced the expression of senescence-associated markers p16 and p21 in HaCaT cells ( $P=0.0023$ ;  $P=0.0054$ ). **Conclusion** CSE downregulates *Klotho* and upregulates CHRNA5, thereby promoting keratinocyte senescence and accelerating skin aging.

**Key words:** Cigarette smoke extract; *Klotho*; CHRNA5; HaCaT; Skin aging

随着社会经济的发展与人口老龄化的加剧,公众对皮肤健康和年轻化的关注不断提升。皮肤衰老分为两种类型:内源性衰老受遗传、激素水平及生物钟调控,外源性衰老由日晒、污染、烟草等外部因素诱发,其机制包括活性氧的过量生成、胶原降解、细胞外基质破坏等关键过程<sup>[1-2]</sup>。吸烟与皮肤衰老密切相关,可引起面部皱纹、色素沉着等典型表现<sup>[3-4]</sup>。香烟烟雾含多种有害化学物质,可以导致微循环障碍、氧化应激增强、黑色素生成增加并导致 DNA 损伤进而增加衰老细胞数量<sup>[5-6]</sup>。进一步研究吸烟诱导皮肤衰老的分子通路并探索有效干预策略,不仅具有重要的科学研究意义,也契合日益增长的社会需求。

*Klotho* 基因于 1997 年首次被发现,缺失可导致寿命缩短及多系统早衰,过表达则可延长寿命<sup>[7]</sup>。其表达随年龄、肾功能衰退等下降<sup>[8]</sup>,且参与血管稳态维持<sup>[9]</sup>。*Klotho* 基因编码单通道跨膜蛋白参与调控多条衰老相关信号通路<sup>[10]</sup>。现有证据显示,随年龄增长,皮肤组织/表皮细胞的 *Klotho* 水平呈下降趋势;在动物与细胞模型中,*Klotho* 的缺失或抑制与表皮变薄、胶原与基底膜成分减少相关<sup>[11-12]</sup>。因此,探究吸烟是否通过影响 *Klotho* 的表达参与皮肤衰老的发生,具有重要意义。

尼古丁是烟草中的主要生物碱,结构上可模仿内源性神经递质乙酰胆碱,能够与烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptors, nAChRs)结合并激活其离子通道功能。*CHRNA5* (cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit) 基因编码的  $\alpha 5$  亚基是烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)的辅助组分。研究表明其参与尼古丁对 nAChR 的激活并调节下

游信号通路<sup>[13]</sup>。*CHRNA5* 作为 nAChRs 的重要组成部分与多种疾病相关<sup>[13-14]</sup>。课题组前期工作观察到 *CHRNA5* 在皮肤银屑病病理状态中的上调,与表皮细胞的过度增殖及炎症有关,其过度激活可能加剧慢性炎症性皮肤损伤<sup>[15]</sup>。然而,*CHRNA5* 是否参与吸烟所引起的皮肤衰老有待进一步探究。

尽管既往研究提示 *Klotho* 与 nAChRs 通路分别与皮肤稳态相关,然而当前无论是在转录调控层面还是信号通路层面,并没有关于 *Klotho*-*CHRNA5* 轴的研究。二者在吸烟相关暴露下是否协同驱动皮肤衰老也缺乏直接证据。本研究通过烟草烟雾提取物处理过的 HaCaT 细胞作为研究对象,探究烟草烟雾暴露是否调控 *Klotho* 和 *CHRNA5* 引起角质形成细胞的衰老及其是否在吸烟促进皮肤衰老过程中可能存在相互作用,并拟通过体内及体外实验探讨其机制,为减缓皮肤衰老研究提供新的潜在靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验细胞与动物

人永生角质形成细胞(HaCaT 细胞)购买于自富衡公司。实验选用雄性 C57BL/6J 小鼠;其中野生型个体购于星康公司,依月龄划分为 3~5 月龄、6~7 月龄及 14 月龄 3 个实验组;涉及本课题组自行繁育的 6~7 月龄 *Klotho* 基因修饰鼠购自赛业公司,包括 *Klotho*<sup>+/+</sup>(野生型对照组)与 *Klotho*<sup>+/-</sup>两种基因型。本实验所有动物实验均获得山东第一医科大学附属省立医院动物伦理委员会许可(No. SD

NSFC 2021-0310)。

### 1.1.2 主要试剂

万宝路香烟为美国 Marlboro 公司产,阿霉素购于美国 MCE 公司,*Klotho* 或 *CHRNA5* siRNA 购于锐博生物,组织 RNA 提取试剂盒购于康为试剂公司,细胞 RNA 提取试剂盒购于山东思科捷公司,*Klotho* 抗体购于美国 Santa Cruz 公司,*CHRNA5*、*p16*、*p21*、*Tubulin* 抗体和 ECL 化学发光检测试剂盒购于中国 Proteintech 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 烟草烟雾提取物的制备

先去除万宝路香烟的过滤嘴,然后取两支香烟并分别固定在连续抽吸系统的进烟口。接通装置,保持恒定气流,每支以 5 min 速率燃烧,烟雾通入 50 mL DMEM;随后用 NaOH 调节 pH 至 7.4,并经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜除菌,即得 CSE 原液。原液需在 30 min 内使用或  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存;实验浓度由 DMEM 稀释配制。文献估算,在培养基中加入 10% CSE 的溶液相当于每日吸 30 支香烟的暴露量<sup>[16]</sup>。

### 1.2.2 CSE 处理的 HaCaT 细胞衰老 $\beta$ -半乳糖苷酶染色检测

使用 5% CSE 处理 HaCaT 细胞 24 h,吸除细胞培养液,用 PBS 洗涤 1 次,加入  $\beta$ -半乳糖苷酶染色

固定液 1 mL,室温固定 15 min。按照细胞衰老  $\beta$ -半乳糖苷酶染色试剂盒(碧云天,C0602)说明书配置染色工作液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。染色终止后,PBS 洗 1~2 次,明场成像并计数蓝绿色细胞为阳性,以总细胞数为分母计算阳性率。

### 1.2.3 siRNA 转染

在 6 孔板中将 HaCaT 细胞接种至 60%~70% 融合度;配制转染复合物时,分别将 50 nM 的 *Klotho* 或 *CHRNA5* siRNA 与 RNAiMax 用无血清 Opti-MEM 稀释后轻轻混匀,室温孵育 10 min,随后滴加至细胞培养基中并轻摇均匀。换液后继续培养 24~48 h 以确保基因敲低。

### 1.2.4 RNA 提取与实时荧光定量 PCR

组织总 RNA 采用超纯 RNA 提取试剂盒或收集细胞使用 RNA 快速提取试剂盒提取;测定纯度与浓度后,用 HiFiScript cDNA Synthesis Kit 逆转录 1  $\mu\text{g}$  RNA (20  $\mu\text{L}$  体系,42  $^{\circ}\text{C}$  15 min,85  $^{\circ}\text{C}$  5 s)。随后按照 SYBR Green 法进行实时定量 PCR:在 10  $\mu\text{L}$  反应体系中加入 1  $\mu\text{L}$  cDNA、0.4  $\mu\text{L}$  正反向引物(各 10  $\mu\text{M}$ )、5  $\mu\text{L}$  2 $\times$ SYBR Premix,95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s,接着 40 个循环(95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  30 s);以  $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$  计算相对表达量,确认目的基因水平。见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列信息  
Table 1 RT-PCR primer sequence information

名称	种属	正向(5'-3')	反向(5'-3')
<i>CHRNA5</i>	小鼠	ATCCTCTGTCTGCAAAAACATGA	TCCACGTCCACTAACTGAGAT
<i>CHRNA5</i>	人	AAAGATGGGTTTCGTCCTGTGG	CAAACAAAACGATGTCTGGTGTTC
<i>Klotho</i>	小鼠	GACGGTTTCGAGTGGGCATAGG	CCGACACTGGTGTTTTGTCAAAGG
<i>Klotho</i>	人	GTGCGTCCATCTGGGATACG	TGTCGCGGAAGACGTTGTT
$\beta$ -actin	小鼠	GCTGTCCCCTGTATGCCTCT	GTCACGCACGATTTCC
<i>GAPDH</i>	人	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTTCTCATGG
<i>p21</i>	人	CGATGGAACCTCGACTTTGTCA	GCACAAGGGTACAAGACAGTG
<i>p16</i>	人	ATGGAGCCTTCGGGCTGACT	GTAACATTCGGTGC GTTGGG

### 1.2.5 蛋白提取与 Western blotting 实验

细胞蛋白首先以 RIPA 裂解液裂解,并在缓冲液中额外加入 1% 的蛋白酶抑制剂和 1% 的磷酸酶抑制剂。皮肤组织样品则采用 Invent 品牌的专用蛋白提取试剂盒进行裂解。进行 SDS-PAGE 电泳分离,并随即转到 PVDF 膜。转膜结束后,PVDF 膜在封闭液中充分封闭非特异位点。随后按目标蛋白分别加入相应的一抗;完成一抗孵育后,使用 HRP-标记的二抗进一步孵育,以放大检测信号。最后,采用 ECL 化学发光底物显影。

### 1.2.6 免疫组化

石蜡切片经二甲苯脱蜡后,先用环保透明剂过渡并梯度乙醇复水,随后以柠檬酸钠修复液在高压或微波条件下完成抗原修复;室温冷却后,依次滴加内源性过氧化物酶阻断剂、山羊血清封闭后,加入对应一抗 *Klotho* (Santa Cruz, 1:200) 或 *CHRNA5* (ProteinTech, 1:200) 孵育。次日 PBS 冲洗后,分别孵育增强酶标山羊抗兔/鼠 IgG 聚合物和 HRP-链霉亲和素各 30 min;随后加入 DAB 显色液控制显色,流水终止,并用苏木素溶液复染,并用结晶紫染核、封片后观察。

### 1.3 统计学处理

统计分析应用 SPSS 26.0 软件和 GraphPad Prism10.0。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较前,首先采用  $F$  检验评估方差齐性。当  $F$  检验没有显著性时,采用两独立样本  $t$  检验;当  $F$  检验呈显著性时,采用 Welch 校正  $t$  检验。三组及以上比较,若方差齐性,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)及 Tukey 多重比较;当方差不齐时,采用 Welch 校正的 ANOVA 并进行多重比较。细胞实验中,每个处理条件均包含 3 个独立重复( $n=3$ );动物实验中,每组小鼠 3 只( $n=3$ )。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 烟草烟雾提取物加速角质形成细胞的衰老

本研究利用人源皮肤角质形成细胞系

HaCaT 细胞来探讨 CSE 对皮肤衰老的影响机制。首先,5% CSE 处理显著增加 HaCaT 细胞的  $\beta$ -半乳糖苷阳性细胞数量(图 1)( $P=0.0004$ ),提示 CSE 可加速 HaCaT 细胞进入衰老状态。将细胞分别暴露于不同浓度 CSE 24 小时后,Western blotting 分析显示(图 2、图 3):相较于对照组(Ctrl),5% CSE 处理组衰老特异性标志物 p16 蛋白表达升高( $P=0.0002$ ),p21 蛋白表达升高( $P=0.0005$ ),同时抗衰老蛋白 Klotho 的表达被显著抑制( $P=0.0025$ ),这提示 CSE 可诱导角质形成细胞的衰老。同时,5% CSE 也导致 HaCaT 细胞中 CHRNA5 蛋白水平显著升高( $P=0.0002$ ),这预示着 CHRNA5 可能参与调控 CSE 导致的角质形成细胞衰老。

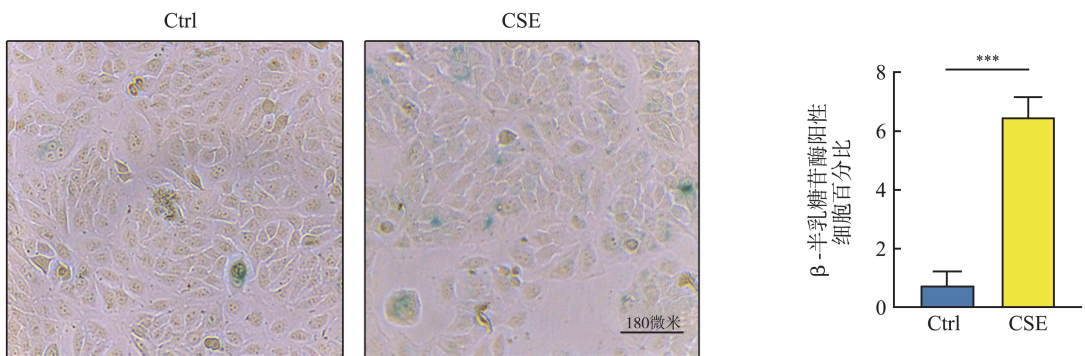


图 1  $\beta$ -半乳糖苷酶染色检验 CSE 处理诱导 HaCaT 细胞衰老(\*\*\* $P<0.001$  vs. 对照组)

Figure 1  $\beta$ -galactosidase staining demonstrated CSE-induced senescence in HaCaT cells (\*\*\*) $P<0.001$  vs. Ctrl group)

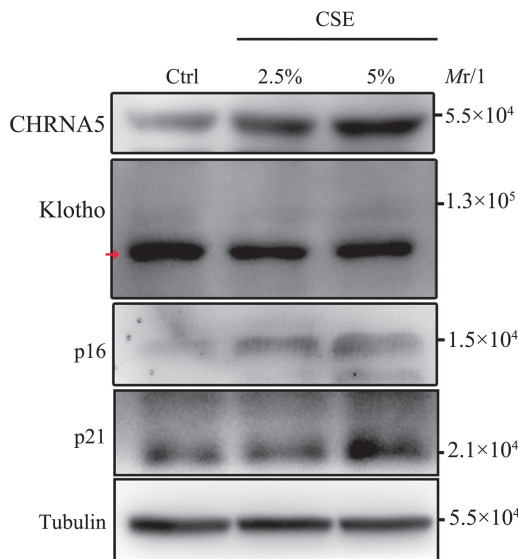


图 2 烟草提取物处理 HaCaT 细胞后的 CHRNA5、Klotho、p16、p21 蛋白表达情况

Figure 2 Expression levels of CHRNA5, Klotho, p16, and p21 in HaCaT cells after treatment with CSE

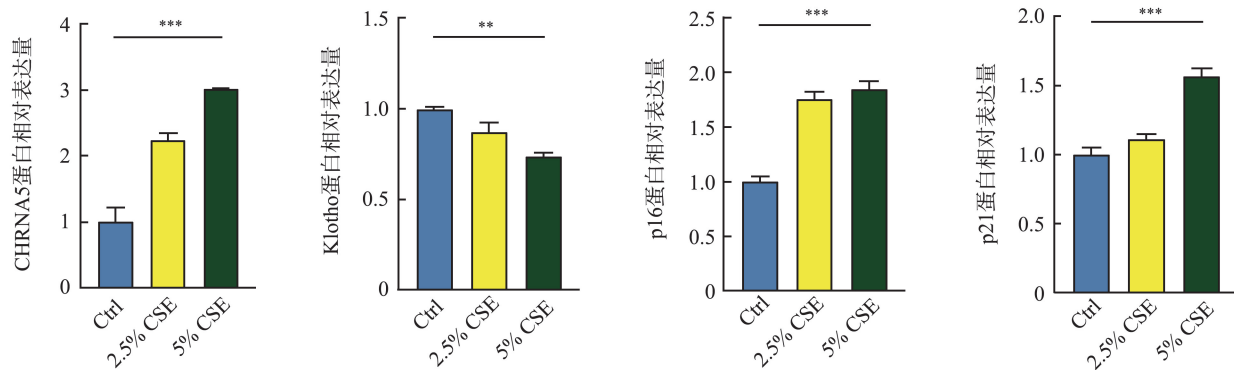


图3 烟草提取物处理 HaCaT 细胞后的 CHRNA5、Klotho、p16、p21 蛋白表达水平的定量分析 (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. 对照组)

Figure 3 Quantification of CHRNA5, Klotho, p16, and p21 protein levels in HaCaT cells treated with CSE (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. Ctrl group)

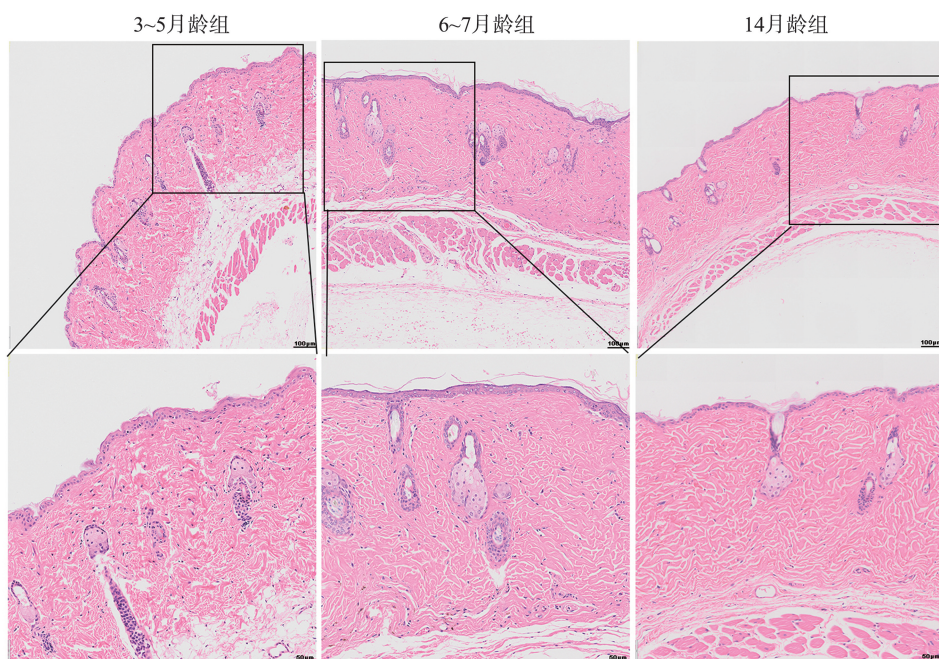
## 2.2 衰老小鼠表皮萎缩伴随 Klotho 下降与 CHRNA5 升高

为观察小鼠皮肤随年龄的形态变化,对 3~5 月龄、6~7 月龄及 14 月龄雄性 C57BL/6J 小鼠背部剃毛皮肤行 HE 染色(图 4A)。结果显示,较 3~5 月龄组( $24.34 \pm 0.80$ )  $\mu\text{m}$ ,6~7 月龄组( $15.31 \pm 0.17$ )  $\mu\text{m}$  和 14 月龄组( $8.43 \pm 0.11$ )  $\mu\text{m}$  表皮显著变薄( $P = 0.0075$ ;  $P < 0.0001$ ) (图 4B);14 月龄组真皮厚度较 6~7 月龄组明显减少[( $456.6 \pm 88.91$ )  $\mu\text{m}$  vs. ( $545.5 \pm 51.31$ )  $\mu\text{m}$ ,  $P = 0.0193$ ] (图 4C)。此外,Western blotting 结果(图 4D)显示,14 月龄

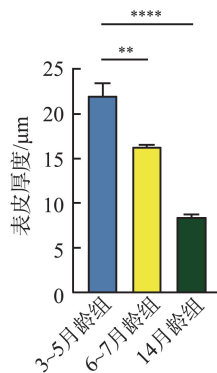
小鼠皮肤中 p16 和 p21 的蛋白含量较 3~5 月龄小鼠增加( $P = 0.0089$ ;  $P = 0.0012$ )。

RT-qPCR 检测结果(图 5A)显示,6~7 月龄组及 14 月龄月龄小鼠皮肤中 CHRNA5 mRNA 水平均高于 3~5 月龄组( $P = 0.0274$ ;  $P = 0.0009$ ),而 Klotho mRNA 水平显著降低( $P = 0.0049$ ;  $P = 0.0001$ )。Western blotting 结果(图 5B)也提示,随年龄增长,CHRNA5 蛋白表达升高,Klotho 蛋白表达下降。综上,衰老小鼠背部表皮呈现 CHRNA5 mRNA 与蛋白表达增加、Klotho mRNA 与蛋白表达减少的特征。

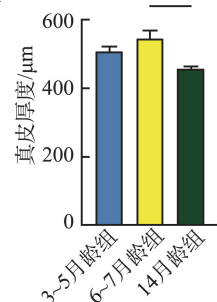
A



B



C



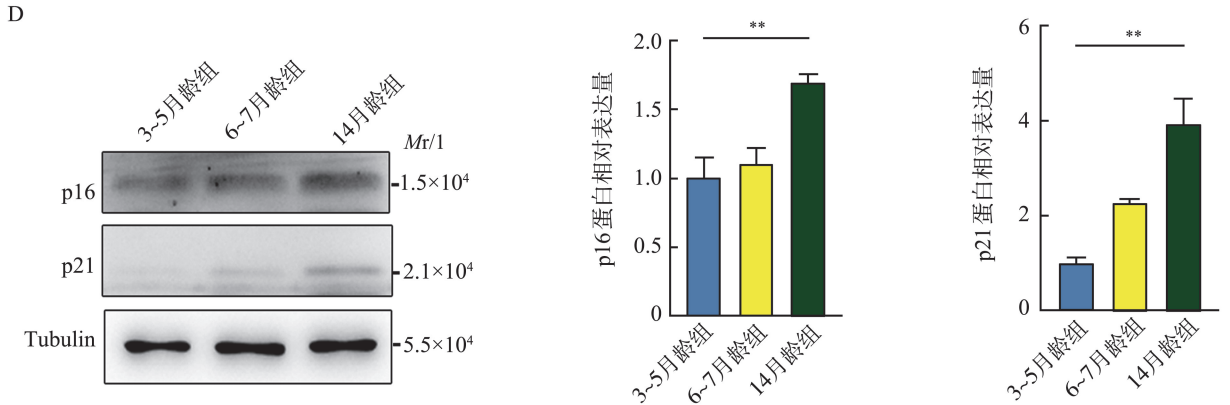


图4 不同月龄 C57BL/6J 小鼠背部皮肤 H&E 染色及 p16、p21 蛋白表达情况 (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ )

A: 小鼠背部皮肤 HE 染色代表图片; B: 表皮厚度测定; C: 真皮厚度测定; D: p16、p21 蛋白表达水平。

Figure 4 H&E staining of dorsal skin and relative expressions levels of p16 and p21 in C57BL/6J mice of different ages (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ )

A: Representative H&E-stained images of dorsal skin; B: Quantification of epidermal thickness; C: Quantification of dermal thickness; D: Protein levels of p16 and p21.

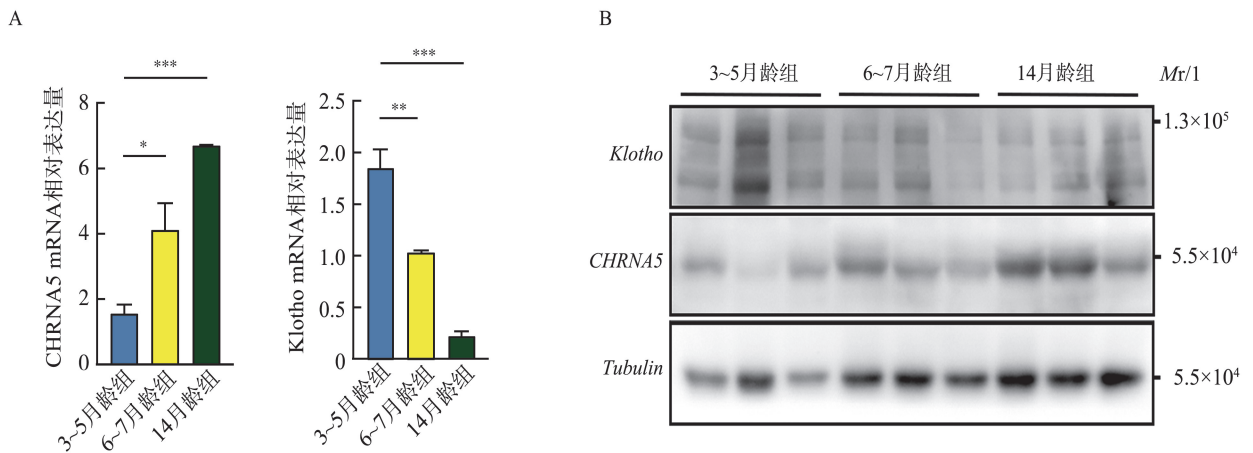


图5 不同月龄 C57BL/6J 小鼠背部 *Klotho* 和 *CHRNA5* 基因(A)和蛋白(B)表达的检测(\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

Figure 5 Expressions of *Klotho* and *CHRNA5* mRNA(A) and protein levels(B) in the dorsal skin of C57BL/6J mice at different months(\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )

### 2.3 *Klotho* 基因敲低促进小鼠皮肤 *CHRNA5* 表达上调

对 *Klotho* 基因敲低小鼠 (*Klotho*<sup>+/-</sup>) 和野生型鼠 (*Klotho*<sup>+/+</sup>) 背部取材进行免疫组织化学染色。结果显示(图6),在表皮中 *Klotho*<sup>+/-</sup> 小鼠相较于野生型鼠, *Klotho* 蛋白表达水平显著下降, *CHRNA5* 蛋白表达水平显著升高 ( $P = 0.0081$ ;  $P = 0.0012$ )。

提取小鼠背部皮肤的 mRNA, 进行 RT-PCR 结

果显示, *Klotho*<sup>+/-</sup> 小鼠背部皮肤中 *Klotho* 的 mRNA 水平下降(图7A) ( $P = 0.0029$ ), *CHRNA5* 的 mRNA 水平增加(图7A) ( $P = 0.0048$ )。同样, Western blotting 实验显示(图7B、C),相较于野生型小鼠, *Klotho*<sup>+/-</sup> 小鼠背部皮肤中 *Klotho* 蛋白水平下降 ( $P = 0.0297$ ), *CHRNA5* 蛋白表达水平增加 ( $P = 0.0107$ ), 衰老标志物 p16 与 p21 蛋白表达水平平均增加 ( $P = 0.0213$ ;  $P = 0.0327$ )。

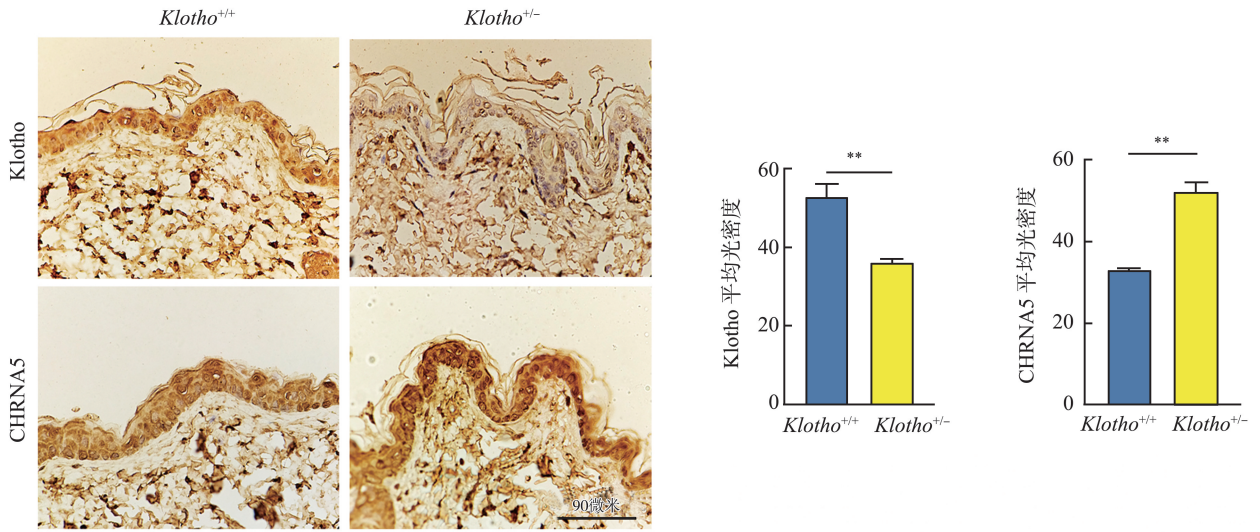


图 6 Klotho 和 CHRNA5 在不同基因型小鼠背部皮肤组织中的表达 (免疫组化染色) (\*\* $P < 0.01$ )

Figure 6 Immunohistochemical staining showed Klotho and CHRNA5 expression in dorsal skin tissues of mice with different genotypes (\*\* $P < 0.01$ )

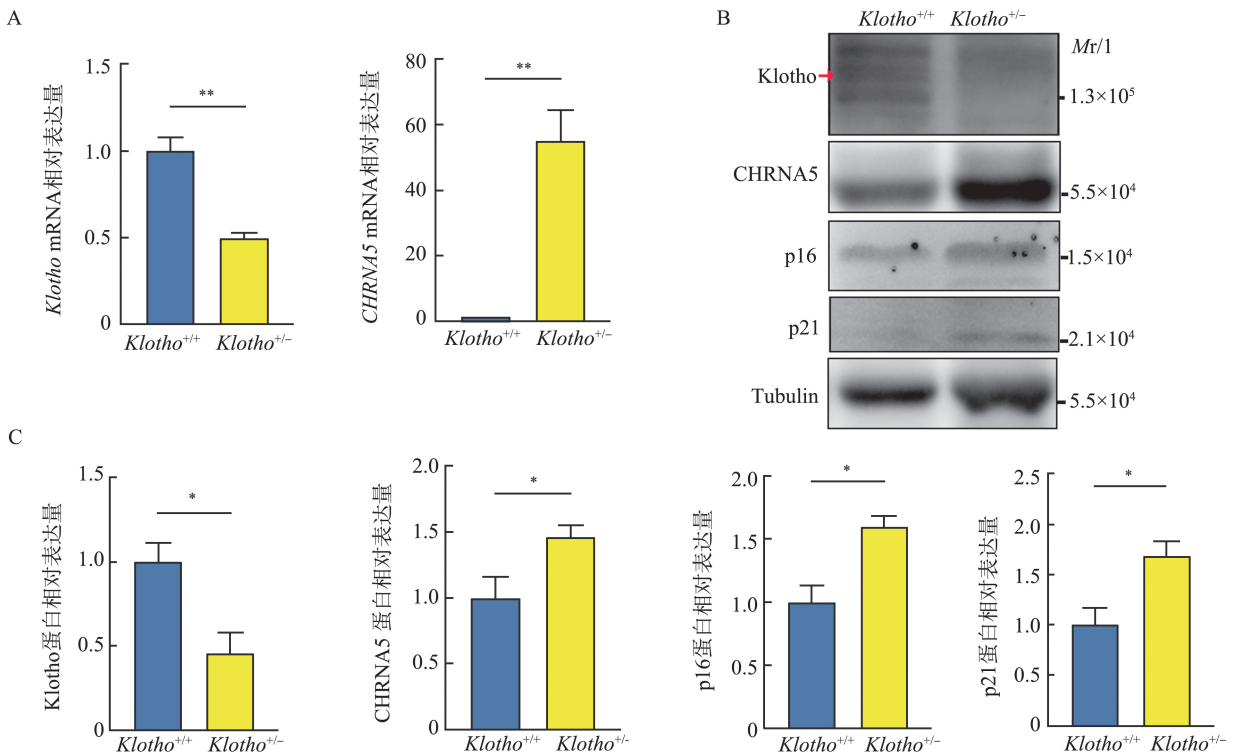


图 7 CHRNA5 在不同基因型小鼠背部皮肤组织中 mRNA 与蛋白表达 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )

A: Klotho 和 CHRNA5 在小鼠背部中 mRNA 表达量变化差异; B, C: Klotho, CHRNA5, p16 与 p21 蛋白表达量条带图与统计。

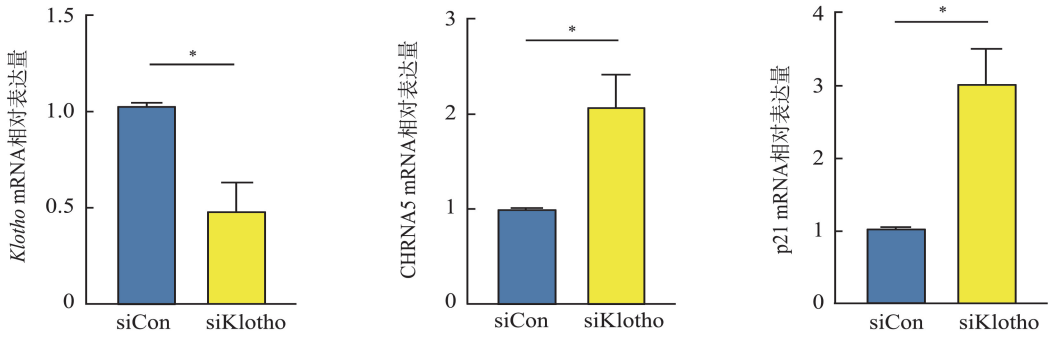
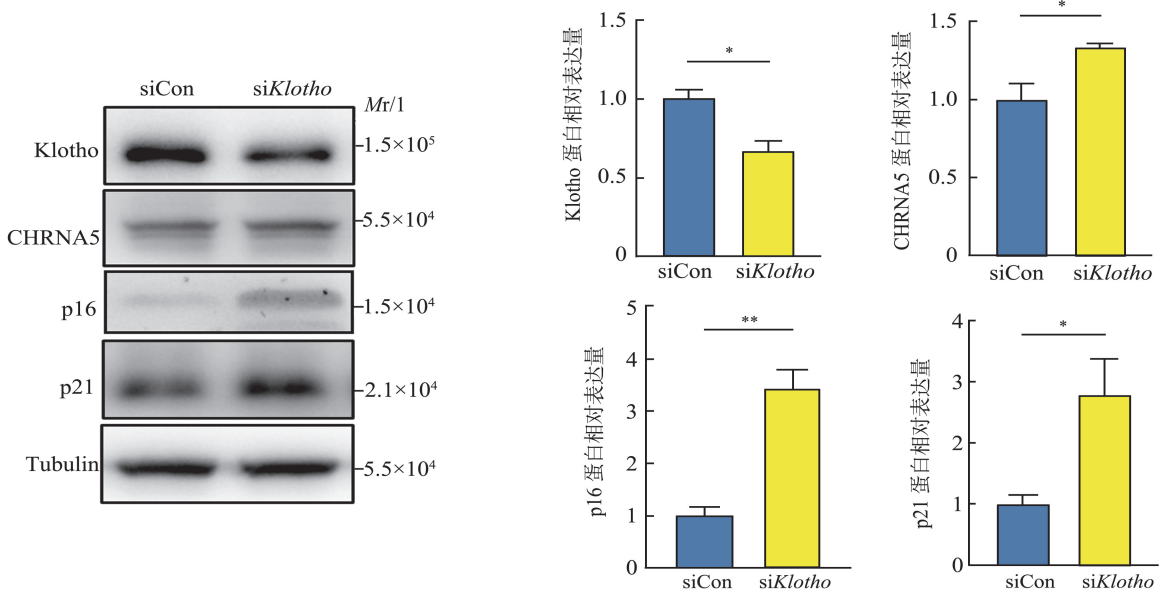
Figure 7 CHRNA5 expression level in dorsal skin tissues of mice with different genotypes (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )

A: Relative mRNA expression levels of Klotho and CHRNA5 in dorsal skin; B, C: Representative immunoblot bands and quantification (C) of Klotho, CHRNA5, p16 and p21 protein levels.

### 2.4 Klotho 基因敲低促进 HaCaT 细胞 CHRNA5 及衰老相关基因表达

转染 siRNA (siKlotho) 后, RT-qPCR 检测 (图 8) 显示, HaCaT 细胞中 Klotho 敲低成功 ( $P = 0.0204$ ), 同时, 相较于对照组, siKlotho 组 CHRNA5 和 p21 的 mRNA

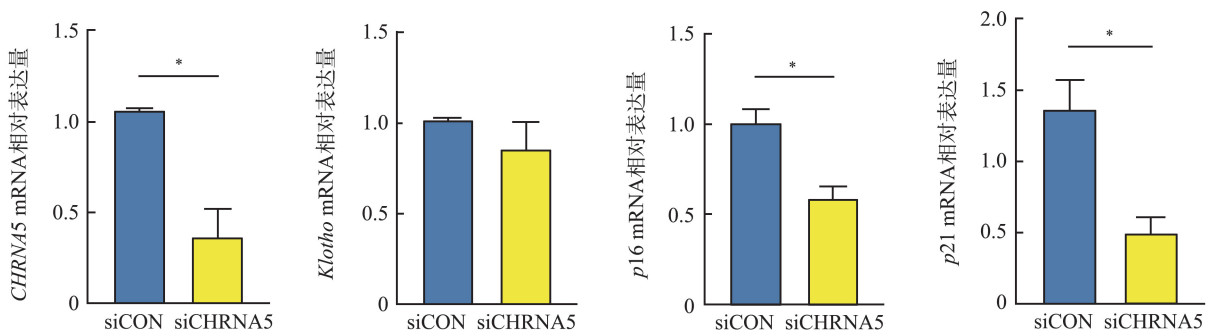
转录水平显著升高 ( $P = 0.0341$ ;  $P = 0.0146$ )。Western blotting 结果显示 (图 9), CHRNA5 在 siKlotho 组中的蛋白表达水平高于 siCon 组 ( $P = 0.0347$ ), p16 和 p21 在 siKlotho 组中的蛋白表达水平高于 siCon 组 ( $P = 0.0036$ ;  $P = 0.0390$ )。

图 8 角质形成细胞敲低 *Klotho* 后 *Klotho*、*CHRNA5* 和 *p21* 基因表达 (\* $P<0.05$ )Figure 8 mRNA expression of *Klotho*, *CHRNA5*, and *p21* in HaCaT cells after *Klotho* knockdown (\* $P<0.05$ )图 9 角质形成细胞敲低 *Klotho* 后 *Klotho*、*CHRNA5*、*p16* 和 *p21* 蛋白表达 (\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ )Figure 9 Protein levels of *Klotho*, *CHRNA5*, *p16* and *p21* in HaCaT cells after *Klotho* knockdown (\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ )

## 2.5 CHRNA5 敲低抑制 HaCaT 细胞衰老相关基因表达而不改变 *Klotho* 水平

进一步探讨 *CHRNA5* 是否调控 *Klotho* 与衰老。RT-qPCR 结果 (图 10) 显示 *CHRNA5* 在 si*CHRNA5* 组 mRNA 明显低于对照组 ( $P=0.0121$ ), 干扰效率 36.37%; HaCaT 细胞中敲低 *CHRNA5* 后 *p16*、*p21* mRNA 水平均显著降低 ( $P=0.0148$ ;  $P=$

0.0237), *Klotho* mRNA 无明显变化 ( $P=0.3431$ )。Western blotting (图 11) 结果一致, si*CHRNA5* 组 *CHRNA5*、*p16*、*p21* 蛋白水平均显著下降 ( $P=0.0243$ ;  $P=0.0023$ ;  $P=0.0054$ ), *Klotho* 蛋白差异无统计学意义 ( $P=0.4537$ )。提示敲低 *CHRNA5* 可抑制衰老相关基因表达, 但对 *Klotho* 无显著影响。

图 10 角质形成细胞敲低 *CHRNA5* 后 *Klotho*、*CHRNA5*、*p16* 和 *p21* 基因表达 (\* $P<0.05$ )Figure 10 mRNA expression of *Klotho*, *CHRNA5*, *p16* and *p21* in HaCaT cells after *CHRNA5* knockdown (\* $P<0.05$ )

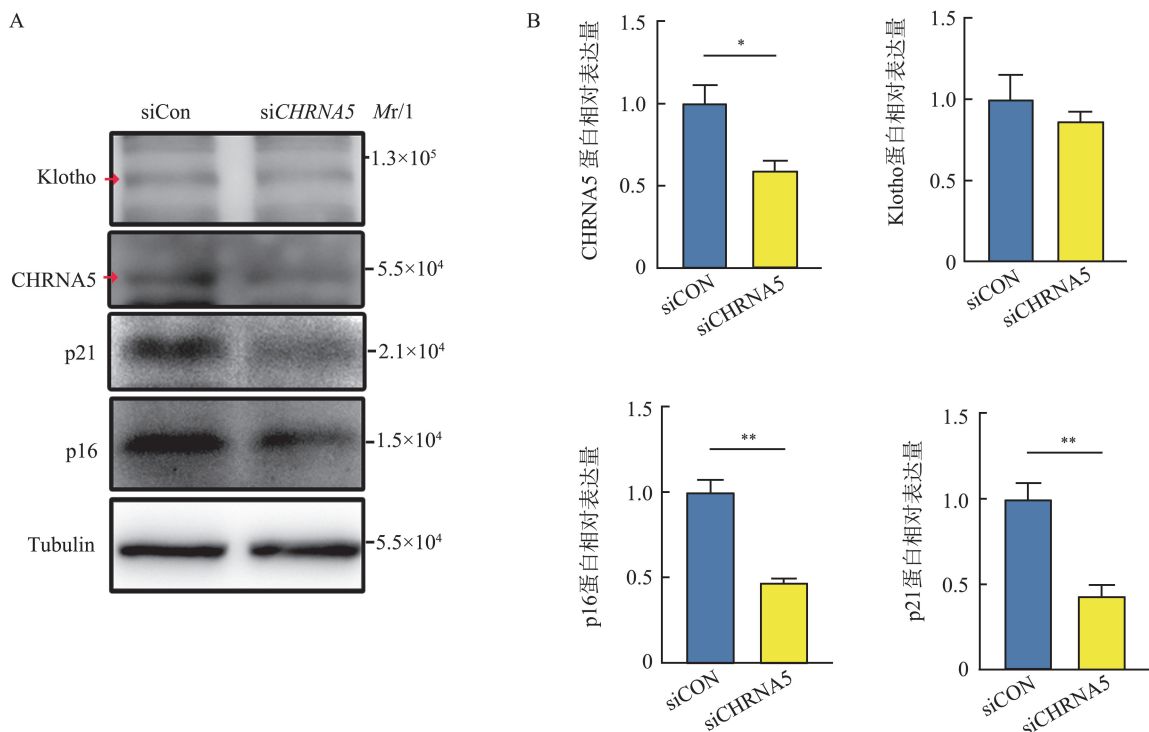


图 11 角质形成细胞敲低 *CHRNA5* 后 *Klotho*, *CHRNA5*, *p16* 和 *p21* 蛋白表达(箭头示目的蛋白条带) (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )  
 Figure 11 Protein expression of *Klotho*, *CHRNA5*, *p16* and *p21* in HaCaT cells after *CHRNA5* knockdown (redarrows indicated the target protein bands) (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ )

### 3 讨论

衰老是一个复杂的生物学过程,涉及机体几乎所有组织与器官的功能逐渐衰退。随着年龄增长,人体多项生理功能逐步下降可导致心血管疾病、神经退行性疾病及癌症等<sup>[17-18]</sup>。皮肤作为人体最大的器官,其衰老也是全人类所面对的问题。皮肤内源性衰老时间推移引起外观与功能变化,而皮肤外源性衰老由日晒、污染、烟草烟雾、压力、睡眠不足和营养不良等引起,两者共同作用致使皮肤衰老<sup>[19]</sup>。

在多种疾病与皮肤衰老中吸烟被视为最易通过生活方式干预加以避免的危险因素之一。在皮肤中,烟草暴露与皮肤过早出现皱纹及胶原蛋白加速降解高度相关。其潜在机制既包括抑制成纤维细胞合成胶原蛋白的能力,也涉及促发基质金属蛋白酶活化,从而加速胶原蛋白的分解<sup>[19]</sup>。烟草中的主要成分尼古丁激活烟碱型乙酰胆碱受体调节细胞增殖、凋亡和血管生成,其中 *CHRNA5/A3/B4* 基因簇与多种疾病及寿命相关,但其在皮肤衰老中的作用未明。本研究首先使用烟草烟雾提取物处理的 HaCaT 细胞为烟草皮肤暴露模型,发现 *p16*、*p21* 显著升高,*CHRNA5* 上调、*Klotho* 下调,提示 CSE 可加速细胞衰老并调控两者表达。随后建立自然衰老小

鼠模型(3~5月龄、6~7月龄、14月龄),结果显示随年龄增长,表皮变薄;衰老表皮中,*Klotho* 表达下调,同时 *p16*、*p21* 和 *CHRNA5* 表达升高。

*Klotho* 是重要抗衰老基因,敲除可导致多器官早衰及皮肤萎缩等,通过多种通路延缓衰老。近年来,*Klotho* 蛋白在肾脏和心血管疾病中的研究取得了显著进展<sup>[20]</sup>。在慢性肾脏病患者中,*Klotho* 基因和蛋白表达水平显著降低。同样在心血管系统中,*Klotho* 被证明对血管具有广泛的保护作用;*Klotho* 缺乏可能促进高血压相关的血管损伤,其调节血压的作用机制可能与影响血管内皮功能、钠盐稳态和抗氧化等过程有关<sup>[21]</sup>。综上所述,*Klotho* 在肾脏病和心血管疾病中表现出表达下降和功能受损,并通过多种机制参与疾病发生发展,已成为潜在的诊疗靶点之一。目前关于 *Klotho* 在皮肤组织中的表达变化和作用机理的文献报道有限。尽管研究发现 *Klotho* 基因缺失的小鼠会出现皮肤萎缩、毛发稀疏等早衰表型<sup>[11]</sup>,但皮肤领域尚缺乏对其深入的机制探讨。

本研究在烟草提取物处理过的角质形成细胞中发现了 *Klotho* 的下调与 *CHRNA5* 的上调,接着进一步论证了两者之间是否存在调控关系。首先,本研究检测了 *Klotho*<sup>+/-</sup> 小鼠模型,发现其表皮和真皮变薄,*p21* 升高提示出现衰老表型,其中 *CHRNA5* 显著上调,提示敲低 *Klotho* 上调 *CHRNA5* 的蛋白

表达。进一步通过在 HaCaT 细胞中敲低 *Klotho*, 发现 *CHRNA5*, p16 和 p21 mRNA 和蛋白水平均升高, 提示 *Klotho* 下调可促进 *CHRNA5* 上调及细胞衰老。相反, 敲低 *CHRNA5* 后, 其 mRNA 下降 36.37%, p16、p21 下调, *Klotho* 无明显变化, 结果提示 *CHRNA5* 对 *Klotho* 无调控作用, *Klotho* 可能为其上游因子。*Klotho* 蛋白的下调往往伴随着机体炎症反应和氧化应激水平的升高<sup>[22]</sup>。研究表明, *Klotho* 缺失会解除其对 NF- $\kappa$ B 通路的负调控, 从而导致 NF- $\kappa$ B 过度活化, 促使促炎因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等的表达增加<sup>[23]</sup>。同时, *Klotho* 通过激活 FOXO 等转录因子提高抗氧化基因的表达, 从而减轻细胞内 ROS 累积; 因此当 *Klotho* 水平降低时, 细胞抗氧化能力削弱, 氧化应激加剧, 继而进一步刺激炎症相关信号通路<sup>[24]</sup>。炎症微环境下释放的 IL-6 等细胞因子可激活 JAK2/STAT3 信号, 而缺乏 *Klotho* 时这些炎症介质更容易使 STAT3 过度激活。值得注意的是, *CHRNA5* 基因启动子区域含有多个 STAT3 的结合元件, STAT3 活化后可直接结合启动子并促进 *CHRNA5* 的转录上调<sup>[25]</sup>。另一方面, *CHRNA5* 本身的异常高表达也与炎症/应激信号呈正相关: 在银屑病模型中敲除 *CHRNA5* 会显著减轻炎症程度, 并下调 MAP3K1-JNK/MAPK 和 NF- $\kappa$ B 等通路的活性, 同时 JAK/STAT 信号亦受到抑制, 提示 *CHRNA5* 与这些转录因子介导的炎症应激通路可能形成了正反馈循环<sup>[15]</sup>。综上, 在 *Klotho* 下调时, 炎症因子和 ROS 增多、NF- $\kappa$ B 及 STAT3 等转录因子过度活跃等多重因素可能协同作用, 可能间接促使了 *CHRNA5* 基因表达上调。这一机制有助于解释本研究中观察到的 *Klotho* 下调伴随 *CHRNA5* 上调的现象。

吸烟对皮肤的损伤既可以通过全身作用间接影响皮肤, 也可以通过烟雾直接接触皮肤所致<sup>[26]</sup>。吸入的烟草烟雾成分通过呼吸系统进入血液循环, 随血流到达全身皮肤组织通过氧化应激、胶原降解等途径从而加速皮肤的衰老进程。当然, 吸烟时环境烟雾直接接触皮肤, 烟气中的焦油、尼古丁等可沉积于皮肤表面, 导致皮肤干燥、毛孔粗大、皮脂膜受损, 这些都会加速皮肤的老化。现有文献报道, CSE 可上调基质金属蛋白酶并使皮肤成纤维细胞合成 I/III 型胶原能力下降 40%<sup>[27]</sup>。本研究在细胞水平确认了 CSE 可诱导角质形成细胞衰老, 并初步揭示了 *Klotho* 与 *CHRNA5* 在其中可能的作用。本研究存在局限性。烟草烟雾提取物仅用于体外细胞实验, 以诱导角质形成细胞衰老, 其他实验结果旨在探讨 *Klotho*-*CHRNA5* 信号轴的分子机制。可以使用

CSE 在基因敲低小鼠和基因敲低细胞系中进一步验证并分析, 为 CSE 所引起的角质形成细胞中 *Klotho* 下调与 *CHRNA5* 的上调提供更多的体内与体外实验证据。同时, p16 与 p21 不仅仅参与细胞衰老, 也参与细胞周期<sup>[28]</sup>, 更多对 CSE 处理的细胞衰老状态的指标如增殖能力检测等有待进一步的探索, 从而弥补本研究在表型论证广度上的不足。

综上, 本研究显示 CSE 通过下调 *Klotho*、上调 *CHRNA5* 途径诱导皮肤衰老。

## 参考文献:

- [1] Furman D, Auwerx J, Bulteau AL, et al. Skin health and biological aging [J]. *Nat Aging*, 2025, 5(7): 1195-1206.
- [2] 刘贺磊, 都日娜, 董俊娟, 等. 光老化与自噬机制的研究进展 [J]. *内蒙古医学杂志*, 2024, 56(3): 322-325.
- [3] 付雨, 姜伟, 朱高培, 等. 基于多水平模型的山东省老年人健康相关生命质量及其影响因素 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2025, 63(9): 57-64.  
FU Yu, JIANG Wei, ZHU Gaopei, et al. Health-related quality of life and its influencing factors of the elderly in Shandong Province based on multilevel models [J]. *Journal of Shandong University (Health Science)*, 2025, 63(9): 57-64.
- [4] Neves Cruz J, Santana de Oliveira M, Gomes Silva S, et al. Insight into the interaction mechanism of nicotine, NNK, and NNN with cytochrome P450 2A13 based on molecular dynamics simulation [J]. *J Chem Inf Model*, 2020, 60(2): 766-776.
- [5] Böhm M, Stegemann A, Paus R, et al. Endocrine controls of skin aging [J]. *Endocr Rev*, 2025, 46(3): 349-375.
- [6] Krutmann J, Bouloc A, Sore G, et al. The skin aging exposome [J]. *J Dermatol Sci*, 2017, 85(3): 152-161.
- [7] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing [J]. *Nature*, 1997, 390(6655): 45-51.
- [8] Espuch-Oliver A, Vázquez-Lorente H, Jurado-Fasoli L, et al. Reference values of soluble  $\alpha$ -*klotho* serum levels using an enzyme-linked immunosorbent assay in healthy adults aged 18-85 years [J]. *J Clin Med*, 2022, 11(9): 2415. doi:10.3390/jcm11092415
- [9] 任颖洁, 田庆华, 姜亦欣, 等. *Klotho* 与脑血管疾病的关系及其相关生物学机制 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2023, 40(8): 763-768.  
REN Yingjie, TIAN Qinghua, JIANG Yixin, et al. Association of *Klotho* with cerebrovascular disease and associated biological mechanisms [J]. *Journal of Apoplexy*

- and Nervous Diseases, 2023, 40(8): 763-768.
- [10] Kuro-O M. The Klotho proteins in health and disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(1): 27-44.
- [11] Yamashita K, Yotsuyanagi T, Yamauchi M, et al. Klotho mice: a novel wound model of aged skin [J]. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 2014, 2(1): e101. doi:10.1097/GOX.0000000000000045
- [12] Jin XH, Pi LQ, Lee WS. Expression pattern and role of klotho in human hair follicles [J]. *Ann Dermatol*, 2019, 31(5): 511-517.
- [13] Pechlivanidou M, Ninou E, Karagiorgou K, et al. Autoimmunity to neuronal nicotinic acetylcholine receptors [J]. *Pharmacol Res*, 2023, 192: 106790. doi:10.1016/j.phrs.2023.106790
- [14] 蔡佳莹, 王靖婷, 王增萍, 等.  $\alpha 5$ -nAChR 对慢性应激肺腺癌荷瘤小鼠疑核 c-Fos 表达的影响 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2025, 63(4): 69-74.  
CAI Jiaying, WANG Jingting, WANG Zengping, et al. Effect of  $\alpha 5$ -nAChR on the expression of c-Fos in nucleus ambiguus in chronic stress-induced lung adenocarcinoma mice [J]. *Journal of Shandong University (Health Science)*, 2025, 63(4): 69-74.
- [15] Wang J, Li XY, Zhang P, et al. CHRNA5 is over-expressed in patients with psoriasis and promotes psoriasis-like inflammation in mouse models [J]. *J Investig Dermatol*, 2022, 142(11): 2978-2987.
- [16] Su Y, Han W, Giraldo C, et al. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(5): 819-825.
- [17] Colucci M, Sarill M, Maddalena M, et al. Senescence in cancer [J]. *Cancer Cell*, 2025, 43(7): 1204-1226.
- [18] O'Reilly S, Tsou PS, Varga J. Senescence and tissue fibrosis: opportunities for therapeutic targeting [J]. *Trends Mol Med*, 2024, 30(12): 1113-1125.
- [19] Rahman A, Rehmani R, Pirvu DG, et al. Unlocking the therapeutic potential of marine collagen: a scientific exploration for delaying skin aging [J]. *Mar Drugs*, 2024, 22(4): 159. doi:10.3390/md22040159
- [20] Li Z, Li J, Li L, et al. Klotho enhances stability of chronic kidney disease atherosclerotic plaques by inhibiting GRK2/PLC- $\beta$ -mediated endoplasmic reticulum stress in macrophages via modulation of the ROS/SHP1 pathway [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 32091. doi:10.1038/s41598-024-83596-w
- [21] Awasthi R, Manger PT, Khare RK, et al. Klotho protein: a new insight into the pathogenesis of essential hypertension [J]. *Clin Hypertens*, 2024, 30(1): 36. doi:10.1186/s40885-024-00294-5
- [22] Chen P, Tang YF, Luo L, et al. Lower serum Klotho level and higher systemic immune-inflammation index: an inverse correlation [J]. *BMC Geriatr*, 2023, 23(1): 650. doi:10.1186/s12877-023-04349-4
- [23] Jin MH, Lv PF, Chen GY, et al. Klotho ameliorates cyclosporine A-induced nephropathy via PDLIM2/NF- $\kappa$ B p65 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2): 451-457.
- [24] Yan F, Zhao Q, Li Y, et al. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review [J]. *J Ovarian Res*, 2022, 15(1): 100. doi:10.1186/s13048-022-01032-x
- [25] Zhang Y, Jia YF, Li P, et al. Reciprocal activation of  $\alpha 5$ -nAChR and STAT3 in nicotine-induced human lung cancer cell proliferation [J]. *J Genet Genomics*, 2017, 44(7): 355-362.
- [26] Ernster VL, Grady D, Miike R, et al. Facial wrinkling in men and women, by smoking status [J]. *Am J Public Health*, 1995, 85(1): 78-82.
- [27] Morita A. Tobacco smoke causes premature skin aging [J]. *J Dermatol Sci*, 2007, 48(3): 169-175.
- [28] Ogrodnik M, Carlos Acosta J, Adams PD, et al. Guidelines for minimal information on cellular senescence experimentation in vivo [J]. *Cell*, 2024, 187(16): 4150-4175.

(编辑:李伟)