

紫外线 A 诱导的人真皮成纤维细胞光老化及小鼠 皮肤光老化模型的构建与评价*

张 畅 王 楠 侯梦惠 马千惠 李明赫 张海英 石英爱 何 旭**

吉林大学基础医学院病理生物学教育部重点实验室, 吉林 长春 130021

[摘要] **目的** 建立紫外线 A (UVA) 诱导的人真皮成纤维细胞 (HDFs) 光老化和小鼠皮肤光老化模型, 为探究皮肤光老化机制及防治皮肤光老化提供良好的模型。**方法** 利用酶消化法分离获得 HDFs, 并检测其表面标志物。采用 UVA 照射 HDFs (剂量 5 J/cm², 15 min/d, 连续 3 d) 构建体外 HDFs 光老化模型。将 12 只雌性昆明小鼠分为对照组 (Control 组) 和模型组 (UVA 照射组), 每组 6 只。采用 UVA 照射小鼠 (剂量 20 J/cm², 1 h/d, 5 次/周, 连续 8 周), 构建小鼠皮肤光老化模型。通过观察细胞形态、检测其增殖能力和衰老相关 β-半乳糖苷酶活性, 小鼠背部皮肤的大体观察, 皮肤组织苏木素-伊红和 Masson 染色, 实时荧光定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测衰老相关因子 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达, 以及 Western blot 和免疫组织化学染色检测皮肤老化相关蛋白 I 型胶原蛋白 (Collagen-I) 和基质金属蛋白酶 1 (MMP1) 的表达, 对模型进行评价。**结果** HDFs 呈长梭形, 表达波形蛋白而不表达 E 钙黏蛋白。UVA 照射后 HDFs 体积变大、呈铺展状, 其增殖能力减弱, 衰老细胞阳性率及 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达水平增高, Collagen-I 表达下调, 而 MMP1 表达上调。与 Control 组比较, UVA 照射组小鼠的背部皮肤粗糙, 可见色素沉着, 其表皮增厚, 真皮变薄, 胶原沉积减少, 胶原纤维排列紊乱, 且 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达水平显著增高, Collagen-I 表达降低, 而 MMP1 表达升高。**结论** 成功建立了 UVA 照射所致的 HDFs 光老化模型和小鼠皮肤光老化模型, 为探究皮肤光老化的机制以及开发光老化防治策略提供了实验基础。

[关键词] 皮肤光老化; 紫外线 A; 成纤维细胞; 动物模型; 评价

doi: 10.3969/j.issn.1674-7593.2026.01.003

Construction and evaluation of photoaging models of human dermal fibroblasts and mouse skin induced by ultraviolet A

Zhang Chang, Wang Nan, Hou Menghui, Ma Qianhui, Li Minghe,

Zhang Haiying, Shi Ying'ai, He Xu**

Key Laboratory of Pathobiology, Ministry of Education, College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, China

** Corresponding author: He Xu, email: hexu@jlu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To establish photoaging models of human dermal fibroblasts (HDFs) and mouse skin induced by ultraviolet A (UVA), so as to provide the optimized models for exploring mechanisms of skin photoaging and preventing and treating skin photoaging. **Methods** Enzyme digestion was used to isolate HDFs and surface markers were examined. UVA at a dose of 5 J/cm² was utilized to irradiate HDFs for 15 minutes each day for three consecutive days, and then *in vitro* HDF photoaging models were established. Twelve female Kunming mice were divided into a control group and a model group (UVA irradiation group) with six mice in each group. A dose of 20 J/cm² of UVA was applied for 1 hour daily, 5 times a week, which was continued for eight weeks to establish a mouse skin photoaging model. Furthermore, the model efficacies were assessed by observing the cellular morphology, detecting the cell proliferation ability and the activity of senescence-related β-galactosidase, observing the gross appearance of the dorsal skin of mice, performing hematoxylin-eosin staining and Masson staining of the skin tissues, detecting the expression of P16^{INK4a} and P21 mRNA via RT-qPCR, and examining the expression of type I collagen (Collagen-I) and matrix metalloproteinase 1 (MMP1) by Western blot and immunohistochemical staining. **Results** HDFs were long fusiform-shaped, which expressed vimentin but did not express E-cadherin. After UVA irradiation, the size of HDFs became larger with spreading morphology, along with attenuated proliferation ability. And the positive rate of senescent cells and the expression levels of P16^{INK4a} and P21 mRNA were up-regulated. Meanwhile, Collagen-I expression was declined, while MMP1 expression was elevated. Compared with the control group, the dorsal skin of mice was

收稿日期: 2025-08-08 修回日期: 2025-09-18 录用日期: 2025-09-18

* 吉林省科技发展计划项目 (20240404038ZP)

** 通信作者: 何 旭, 电子邮箱 hexu@jlu.edu.cn

rough with pigmentation after UVA irradiation. UVA exposure gave rise to thickening of the epidermis and thinning of the dermis with decreased and disorganized collagen. Moreover, the expression levels of P16^{INK4a} and P21 mRNA in UVA irradiation group were dramatically higher than those in the control group. And the expression of Collagen- I diminished, while the expression of MMP1 enhanced. **Conclusion** The UVA-induced HDF photoaging model and mouse skin photoaging model are successfully established, which provide an experimental basis for exploring the mechanism of skin photoaging and developing therapeutic strategies.

[**Key words**] Skin photoaging; Ultraviolet A; Fibroblasts; Animal model; Evaluation

皮肤作为人体最大且位于最外层的器官,由表皮、真皮和皮下脂肪构成,在保护、排泄和感觉知觉方面发挥着关键作用^[1]。皮肤老化是由遗传和环境因素共同所致,是人体衰老的直接表现^[2]。80%的面部皮肤老化是由紫外线辐射(Ultraviolet radiation, UVR)引起的,即光老化^[3]。皮肤光老化的组织学特征为表皮增厚、真皮变薄以及真皮胶原纤维排列紊乱等^[4-5]。当持续过量的UVR辐照时,人真皮成纤维细胞(Human dermal fibroblasts, HDFs)能够释放大量基质金属蛋白酶1(Matrix metalloproteinase 1, MMP1),降解真皮中的胶原蛋白和弹性蛋白,致使皮肤光老化。近年来环境污染加重,臭氧层破坏加剧,导致环境中UVR过量,这将不可避免地诱发皮肤光老化。同时,人们日益追求美丽、年轻态的皮肤,使得皮肤光老化成为影响身心健康的问题之一^[5]。因此,建立有效的细胞光老化模型和皮肤光老化动物模型,是探究皮肤光老化机制以及防治皮肤光老化的前提和基础。日光中的紫外线分为A、B、C三种,其中95%为紫外线A(Ultraviolet A, UVA),UVA波长较长,具有穿透真皮的能力,故UVA在UVR造成的皮肤光老化中发挥重要作用^[6-7]。本研究拟通过UVA照射的方法,建立体外HDFs光老化模型以及小鼠皮肤光老化模型,并对模型进行评价,以期探究皮肤光老化的机制及防治策略提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

高糖DMEM培养基(赛文创新北京生物科技有限公司,生产批号SC102-01),胎牛血清(翊圣生物科技有限公司,生产批号40130ES76),中性蛋白酶(美国Gibco公司,生产批号17100017),放射免疫沉淀试验(Radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液(北京索莱宝科技有限公司,生产批号R0020),I型胶原酶(美国Sigma公司,生产批号SCR103),衰老相关-β-半乳糖苷酶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,生产批号C0602),波形蛋白(Vimentin)抗体和E钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(美国CST公司,生产批号5741和3195),I型胶原蛋白(Collagen- I)和MMP1抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,生产批号A24112、RP00211),P16^{INK4a}和P21引物(生工生物工程上海股份有限公司,生产批号270224545和270104469),实时荧光定量聚合酶链

反应(Real time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒(北京全式金生物技术有限公司,生产批号YQ51001),UVA紫外灯管(8 W)(医献医疗公司产品),荧光定量PCR仪(美国Thermofisher Scientific公司,型号QuantStudio 1),化学发光仪(上海天能科技有限公司,型号Tanon 4600SF)。

1.2 细胞和动物

1.2.1 细胞培养 获取人包皮组织,无菌条件下去除脂肪组织后剪成小碎块,置于含有中性蛋白酶的培养皿中,37℃孵育。次日分离表皮和真皮后,将真皮碎块放于I型胶原酶中37℃孵育6 h,筛网过滤后1 500 r/min离心5 min(离心半径12.5 cm),然后将细胞悬液置于含5%胎牛血清的高糖DMEM培养基中,在37℃、含5%CO₂的孵箱内培养,获得原代HDFs。当HDFs生长约80%融合时,按1:3或1:4进行传代培养^[5]。上述研究经吉林大学中日联谊医院伦理委员会审批同意(批号2020042606),受试者及家属签署知情同意书。

1.2.2 实验动物及饲养环境 由于雌性动物具有高水平的雌激素,更易发生色素沉着等光老化损伤,故本研究选用SPF级昆明小鼠作为实验动物,雌性、6周龄,体质量20~23 g,购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司,合格证号SYXK(吉)2023-0010,在吉林大学基础医学院动物实验中心进行小鼠饲养及造模(20~24℃,12 h明/暗循环)。本研究的动物实验获得吉林大学基础医学院伦理审查委员会批准(批号2025669),实验操作严格遵守实验动物福利与伦理的规定^[5]。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫荧光染色鉴定HDFs HDFs生长至约50%融合时,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)洗涤细胞,4%多聚甲醛固定20 min, PBS洗涤后加入0.1%的Triton X-100室温孵育20 min,1%牛血清白蛋白室温封闭1 h,直接加入一抗(Vimentin抗体稀释比例为1:50, E-cadherin抗体稀释比例为1:1 600)后4℃孵育过夜, PBS洗涤后加入荧光标记二抗,室温孵育1 h, PBS洗涤后4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)复染,荧光显微镜下观察并拍摄代表性图像^[5]。

1.3.2 建立HDFs光老化模型 当HDFs生长融合到40%~50%时,进行UVA照射。将HDFs分为对

对照组 (Control 组) 和模型组 (UVA 照射组), UVA 照射组每日给予 5 J/cm^2 剂量的 UVA 照射 15 min, 连续照射 3 d, 对照组不进行 UVA 照射^[5]。UVA 照射完成后继续培养 48 h, 立即收集细胞样品或进行染色。

1.3.3 乙炔基-2'-脱氧尿苷 (5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EDU) 检测 HDFs 细胞增殖能力 加入终浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 的 EDU 孵育 2 h, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 洗涤后于 2 mg/mL 甘氨酸中孵育 5 min, 0.5% TritonX-100 中孵育 10 min, PBS 洗涤后于 $1 \times \text{Apollo } \text{C}$ 染色反应液中室温孵育 30 min, 0.5% TritonX-100 清洗后 Hoechst33342 室温下孵育 30 min (避光), PBS 洗涤后荧光显微镜下观察并拍照^[5]。

1.3.4 衰老相关 β -半乳糖苷酶 (SA- β -gal) 染色 6 孔板中 HDFs 生长融合约 60% 时, PBS 洗涤细胞, 加入 $500 \mu\text{L}$ /孔固定液室温静置 30 min, PBS 洗涤后加入 1 mL /孔工作液 (封口膜密封孔板边缘, 锡纸包裹孔板), 在无 CO_2 的 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育 24 h, 显微镜下观察阳性细胞 (蓝绿色), 随机拍照 5 个视野用于统计学分析^[5]。

1.3.5 RT-qPCR 检测 P16^{INK4a} 和 P21 mRNA 的表达 将 $500 \mu\text{L}$ Trizol 加入细胞或皮肤组织样本中, 在冰上充分裂解; 使用氯仿、异丙醇、无水乙醇及无菌无酶水提取 RNA, 然后利用逆转录试剂盒合成互补脱氧核糖核酸 (Complementary deoxyribonucleic acid, cDNA), 依照 RT-qPCR 试剂体系说明加入 cDNA、引物及相关试剂, 混匀上机检测, 分析阈值循环数, 确定 mRNA 的表达水平。引物序列如下^[5]: P16^{INK4a} 上游引物 5'-AGCCACCGATC-CAGACAGAGTAC-3', 下游引物 5'-CGGGGAT-GTCTGAGGGACCTTC-3'; P21 上游引物 5'-GAT-GTCCGTCAGAACCCATGCG-3', 下游引物 5'-CCT-GCCTCCTCCCAACTCATCC-3'; β -actin 上游引物 5'-GCATCCACGAGACCACCTACAAC-3', 下游引物 5'-AGCCACCGATCCAGACAGAGTAC-3'。

1.3.6 Western blot 检测 Collagen-I 和 MMP1 的表达 RIPA 裂解液裂解细胞或皮肤组织, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $10\ 715 \text{ r/min}$ 离心 20 min (离心半径 11.5 cm), 吸取上清液后用二喹啉甲酸法 (BCA) 测定蛋白浓度, 进行十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 利用半干转膜法转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜, 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入相应一抗 (Collagen-I 抗体稀释比例为 $1:1\ 000$, MMP1 抗体稀释比例为 $1:70\ 000$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 加入二抗室温孵育 1 h, ECL 发光仪显色, Image J 软件分析显色条带。

1.3.7 建立小鼠皮肤光老化模型 将小鼠随机分为对照组 (Control 组) 和模型组 (UVA 照射组), 每组 6 只。先用剃毛器剃除小鼠背部毛发后, 再用脱毛剂完全去除毛发, 暴露大小约 $4 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ 的皮

肤^[5]。模型组采用 UVA 照射, 剂量为 20 J/cm^2 , 1 h/d , 5 次/周, 连续 8 周, 对照组每日正常光照饲养。实验结束后, 采用二氧化碳吸入的方式处死所有小鼠, 随后皮肤组织取材, 部分用于病理学染色, 其余用于 mRNA 和蛋白检测。

1.3.8 小鼠皮肤的肉眼观察及组织病理学染色 造模过程中, 肉眼观察对照组和模型组小鼠皮肤的光泽、光滑度等。将小鼠背部脱毛皮肤置于中性甲醛溶液中固定, 经石蜡包埋切片后进行常规苏木素-伊红染色 (Hematoxylin-eosin staining, HE)、Masson 染色及免疫组织化学染色^[5]。HE 染色: 水化后苏木素染色 10 min, 1% 盐酸乙醇中浸泡 10 s, 自来水冲洗后弱氨水返蓝 1 min, 水洗后梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片, 图像采集。Masson 染色: 水化后苏木素浸染 10 min, 丽春红酸性品红液浸染 10 min, 0.2% 冰醋酸洗涤, 磷钼酸液浸染 2 min, 0.2% 冰醋酸洗涤, 苯胺蓝液浸染 5 min, 0.2% 冰醋酸洗涤, 封片后观察切片并拍照。免疫组织化学染色: 枸橼酸高压修复, PBS 洗涤, 然后内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min, 去除阻断剂, 加入一抗 (稀释比例均为 $1:500$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 次日 PBS 洗涤后加入生物素标记的羊抗小鼠二抗室温孵育 30 min, PBS 洗涤后加入 DAB 液 (观察显色情况), 苏木素染色 1 min, 自来水返蓝, 封片后观察切片并采集图像。

1.4 统计学方法

采用 Graphpad Prism 9 软件进行数据分析, 服从正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

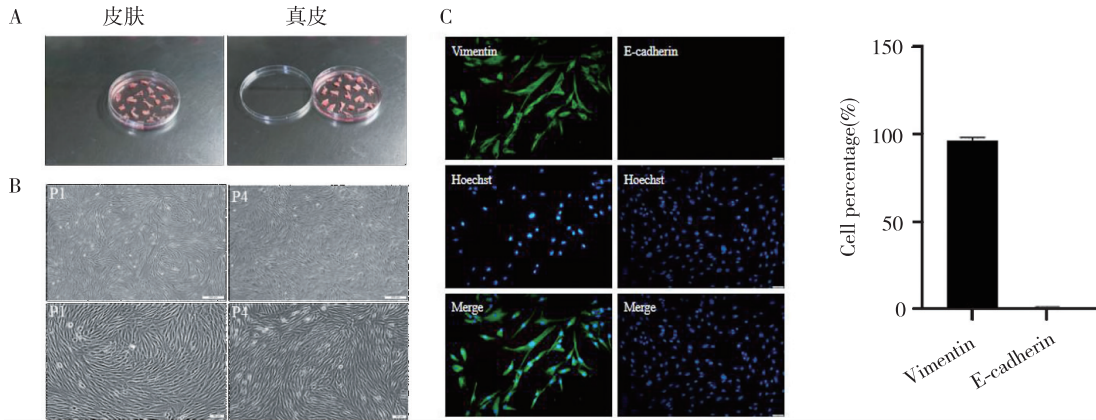
2.1 体外 HDFs 光老化模型的建立

2.1.1 HDFs 的形态学特点及表面标志物 首先利用 0.2% 中性蛋白酶分离获得真皮, 见图 1A。然后用 0.2% I 型胶原酶消化真皮, 获得原代细胞, 并将其按 $1:3$ 或 $1:4$ 传代至第 3~5 代备用。P1 和 P4 代细胞均呈长梭形、边界清楚, 当生长至 80%~90% 融合时, 细胞排列呈旋涡状, 见图 1B。免疫荧光染色结果显示, P4 代细胞表达间质标志物 Vimentin, 其阳性率高达 97%, 不表达上皮标志物 E-cadherin, 见图 1C。以上说明本研究成功分离并获得 HDFs。

2.1.2 光老化 HDFs 的形态学特点及细胞增殖能力 与 Control 组比较, UVA 照射组 HDFs 体积变大, 呈铺展状, 见图 2A。EDU 染色结果显示, UVA 照射组中 EDU 阳性率显著低于 Control 组 ($P < 0.01$), 见图 2B。

2.1.3 光老化 HDFs 的 SA- β -gal 染色 SA- β -gal 染色结果显示, Control 组中蓝绿色细胞较少, 而 UVA 照射组中蓝绿色细胞较多。定量分析结果进一步显示, UVA 照射组中 SA- β -gal 阳性细胞率明

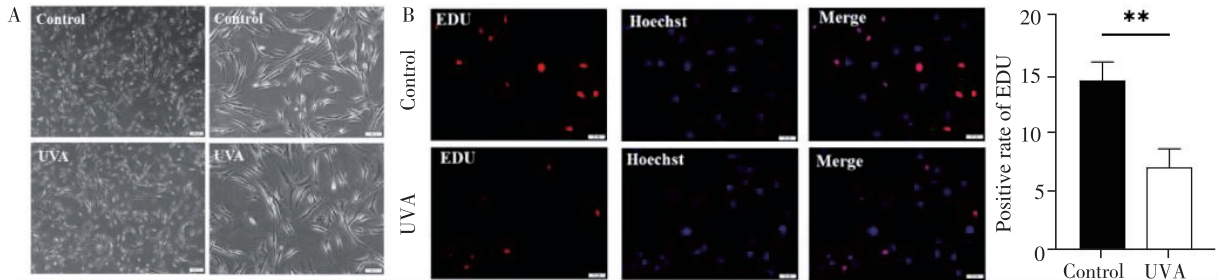
显著高于 Control 组 ($P < 0.001$), 说明 UVA 照射使 衰老细胞明显增多, 见图 3。



注: A 为分离获得真皮; B 为 HDFs 形态学特点 (标尺为 200 μm 和 100 μm); C 为免疫荧光染色检测 HDFs 表面标志物 (标尺为 50 μm)。

图 1 HDFs 的分离培养及鉴定

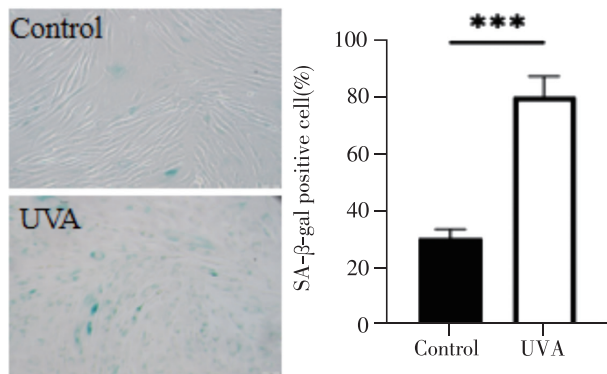
Fig. 1 Isolation and culture of HDFs and identification



注: A 为 HDFs 形态学特点 (标尺为 200 μm 和 100 μm), B 为 EDU 检测细胞增殖能力 (标尺为 100 μm); 与 Control 组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 2 UVA 照射对 HDFs 形态及其增殖能力的影响

Fig. 2 The effect of UVA irradiation on the morphology and proliferation ability of HDFs



注: 与 Control 组比较 *** $P < 0.001$; 标尺为 100 μm 。

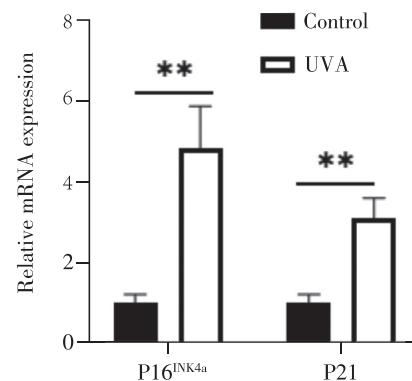
图 3 光老化 HDFs 的 SA-β-gal 染色及定量分析

Fig. 3 SA-β-gal staining and quantitative analysis of photoaged HDFs

2.1.4 光老化 HDFs 中 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达
利用 RT-qPCR 技术检测两组细胞中衰老相关因子 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达水平, 结果显示, UVA 照射组的 HDFs 中 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达水平均显著高于 Control 组 ($P < 0.01$), 见图 4。

2.1.5 光老化 HDFs 中 Collagen- I 和 MMP1 的表

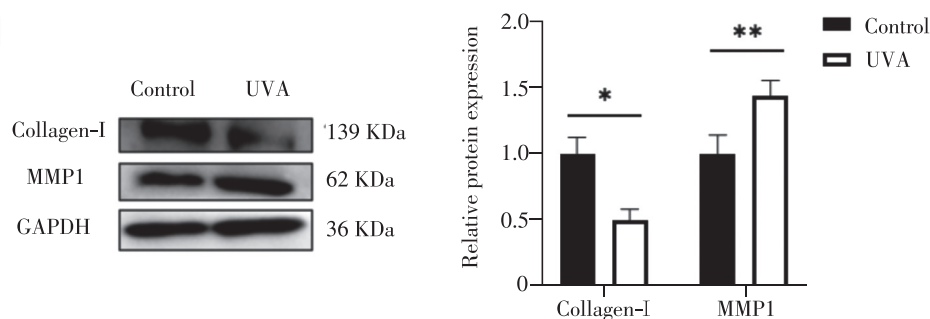
达 应用 Western blot 检测两组细胞中皮肤老化相关指标的表达发现, 与 Control 组比较, UVA 照射组中 Collagen- I 表达水平降低 ($P < 0.05$), MMP1 表达水平则明显升高 ($P < 0.01$), 见图 5。



注: 与 Control 组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 4 RT-qPCR 检测光老化 HDFs 中 P16^{INK4a} 和 P21 mRNA 的表达水平

Fig. 4 RT-qPCR detection of mRNA expression levels of P16^{INK4a} and P21 in photoaged HDFs



注: 与 Control 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 Western blot 检测 HDFs 中 Collagen- I 和 MMP1 的表达水平

Fig. 5 Western blot detection of the expression levels of Collagen- I and MMP1 in photoaged HDFs

2.2 小鼠皮肤光老化模型的建立

2.2.1 小鼠背部皮肤的大体特点

UVA 照射组 8 周后肉眼观察小鼠背部皮肤的大体特点, 发现

Control 组小鼠背部皮肤质地光滑、光泽度较好, 而 UVA 照射组背部皮肤粗糙、坚硬, 有色素沉着和轻微破损, 见图 6。

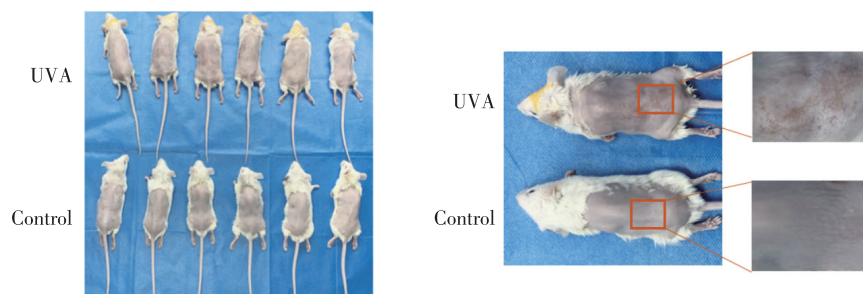


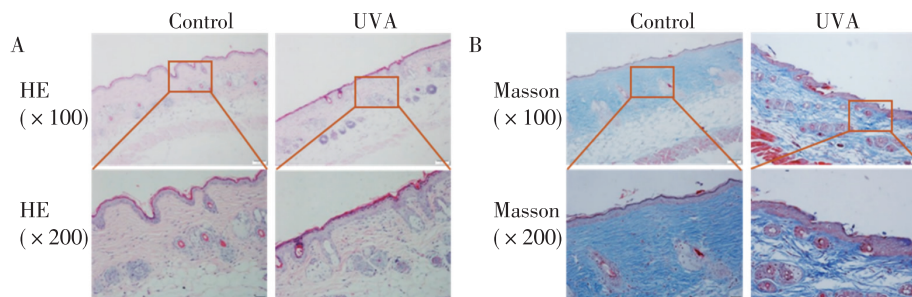
图 6 两组小鼠背部皮肤的大体特点

Fig. 6 Gross appearance of the dorsal skin in two groups of mice

2.2.2 小鼠背部皮肤组织的 HE 和 Masson 染色

通过 HE 染色发现, Control 组小鼠表皮完整, 真皮致密, 而 UVA 照射组小鼠表皮增厚, 真皮变薄, 真皮胶原纤维疏松、排列紊乱, 见图 7A。Masson

染色结果显示, Control 组小鼠真皮内可见胶原纤维分布均匀, 排列紧密、整齐, 而 UVA 照射组小鼠真皮内胶原沉积减少, 胶原纤维排列松散、结构紊乱, 见图 7B。



注: A 为 HE 染色, B 为 Masson 染色。

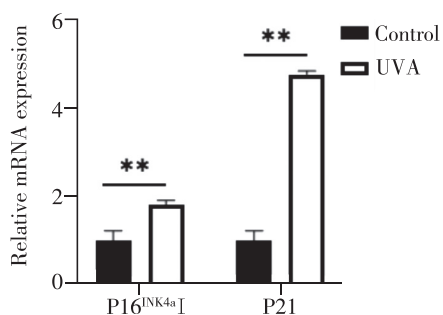
图 7 两组小鼠背部皮肤组织的 HE 和 Masson 染色

Fig. 7 HE and Masson staining of the dorsal skin tissues in two groups of mice

2.2.3 小鼠背部皮肤组织中 P16^{INK4a} 和 P21 mRNA 的表达

利用 RT-qPCR 技术检测两组小鼠背部皮肤组织中 P16^{INK4a} 和 P21 mRNA 的表达水平, 结果

显示, UVA 照射组小鼠背部皮肤组织中 P16^{INK4a} 和 P21 mRNA 的表达水平均显著高于 Control 组 ($P < 0.01$), 见图 8。



注: 与 Control 组比较 ** $P < 0.01$ 。

图 8 RT-qPCR 检测两组小鼠背部皮肤组织中 P16^{INK4a} 和 P21 mRNA 的表达水平

Fig. 8 RT-qPCR detection of mRNA expression levels of P16^{INK4a} and P21 in the dorsal skin tissues of two groups of mice

2.2.4 小鼠背部皮肤组织中 Collagen-I 和 MMP1 的表达 Western blot 检测结果显示, 与 Control 组比较, UVA 照射组小鼠 Collagen-I 的表达水平下调 ($P < 0.05$), 而 MMP1 的表达水平明显上调

($P < 0.01$), 见图 9。通过免疫组织化学染色发现, 与 Control 组比较, UVA 照射组小鼠 Collagen-I 表达减弱, 而 MMP1 表达增强, 见图 10。

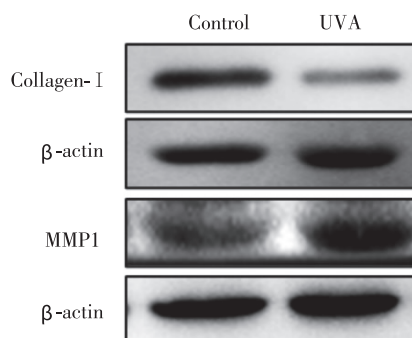


图 9 Western blot 检测两组小鼠背部皮肤组织中 Collagen-I 和 MMP1 的表达

Fig. 9 Western blot detection of Collagen-I and MMP1 expression in the dorsal skin tissues of two groups of mice

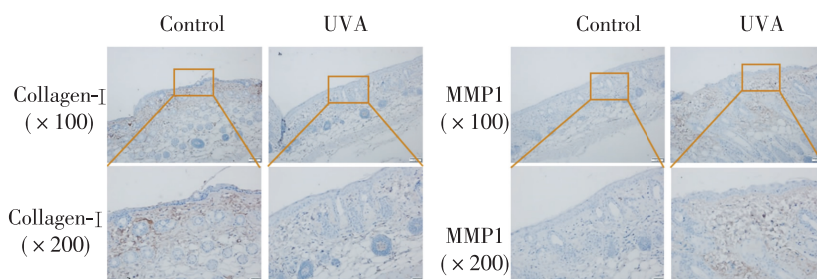


图 10 免疫组化染色检测两组小鼠背部皮肤组织中 Collagen-I 和 MMP1 的表达

Fig. 10 Detection of Collagen-I and MMP1 expression by immunohistochemical staining in the dorsal skin tissues of two groups of mice

3 讨论

皮肤光老化是一个漫长的过程, 为了避免对人体皮肤造成较大损伤, 通常情况下人活体皮肤不能作为研究对象。目前皮肤光老化研究主要以体外细胞或动物为研究对象^[5]。衰老疾病实验动物模型和细胞衰老模型是研究衰老机制和开发抗衰老药物的重要手段^[8]。因此, 光老化细胞模型和光老化动物模型的构建对于探究皮肤光老化的机制及防治皮肤光老化至关重要。由于鼠类与人类皮肤组织结构相似, 现已成为皮肤光老化研究的首选动物, 尤其是小鼠常被用于制备光老化模型^[9-10]。在构建皮肤光老化动物模型中, 目前多选用单一的雌性动物, 而选用雄性动物或雌雄各半的动物相对较少, 考虑原因是雌性动物具有高水平的雌激素, 更易发生色素沉着等光老化损伤^[11]。众所周知, 皮肤是雌激素最重要的非生殖靶器官之一^[12]。雄性小鼠可能因激素水平的差异而导致光老化实验结果的偏差, 故在制备皮肤光老化动物模型的过程中, 应尽可能排除性别差异的影响,

以确保实验结果的可靠性。此外, 雌性小鼠在内分泌和免疫系统方面与人类更为接近, 故更适用于人类皮肤光老化研究。考虑到小鼠毛发和皮肤色泽对光老化建模的影响, 本研究选用雌性昆明小鼠来构建皮肤光老化动物模型。

UVR 是引起皮肤光老化损伤的主要原因。除长波 UVA 外, 紫外线还包括中波紫外线和短波紫外线^[13]。中波紫外线仅能穿透表皮层, 而短波紫外线不能穿透臭氧层, 只有 UVA 具有穿透真皮层的能力^[5]。皮肤真皮中富含成纤维细胞, 能够产生大量的胶原蛋白和细胞因子, 是皮肤光老化的主要影响靶标^[14]。因此本研究以 HDFs 为研究对象构建了 HDFs 光老化模型。当 UVA 穿过真皮致使皮肤光老化时, HDFs 受到损伤后能产生大量基质金属蛋白酶, 从而降解细胞外基质成分, 同时 HDFs 胶原合成能力下降, 导致组织结构破坏, 最终使皮肤弹性降低, 真皮层变薄形成皱纹^[15-16]。此外, UVA 能够促进活性氧的产生和 DNA 损伤, 进一步激活下游信号通路, 释放炎性细胞因子, 从而造

成皮肤损伤^[5,17]。因此,本研究选用 UVA 作为光老化模型的辐照光源。

以往研究多关注于单一的光老化细胞模型或皮肤光老化动物模型的制备,本研究同时构建了细胞和动物光老化模型,并对模型进行了系统全面的评价,为光老化的体内外研究提供了适宜的建模方案。在构建 HDFs 光老化模型的制备过程中,本研究采用 5 J/cm² 剂量、每日 UVA 照射 15 min 对 HDFs 进行连续 3 d 的照射。结果发现,UVA 照射不仅能诱导 HDFs 发生形态学变化,还能抑制 HDFs 细胞增殖,同时伴有衰老相关指标上调, Collagen-I 表达降低而 MMP1 表达升高,上述结果与 Chen 等^[15] 研究一致。以上表明 UVA 诱导的体外 HDFs 光老化模型构建成功,为探究皮肤光老化的机制提供了稳定的细胞模型。本研究采用每日 UVA 照射剂量 20 J/cm²、照射时间 1 h,5 次/周,持续 8 周进行小鼠造模,获得了较好的造模效果^[9,15]。UVA 照射后,小鼠背部皮肤粗糙、有色素沉积及轻微破损,呈现光老化特点。组织病理学染色发现,UVA 组小鼠表皮增厚,真皮变薄,胶原纤维排列紊乱。不仅如此,UVA 照射组小鼠皮肤组织中衰老相关因子的表达水平显著增高, Collagen-I 表达下调,而 MMP1 表达上调。说明本研究成功构建了 UVA 诱导的小鼠皮肤光老化模型,为光老化的机制探究和药物研发提供了良好的体内动物模型。联合应用细胞光老化模型和皮肤光老化动物模型,能够更好地发挥协同优势。利用细胞模型探究光老化的机制,通过动物模型验证抗衰老药物的有效性,从细胞、组织和整体水平进行探究,使研究层面更加丰富,研究结果更为可靠^[5]。然而,本研究采用 8 周 UVA 照射建立小鼠皮肤光老化模型,造模时间较长,小鼠饲养成本高、感染风险增加,今后可以尝试通过提高单次照射剂量或增加每周照射次数来缩短造模周期。此外,由于光老化 HDFs 中衰老相关因子 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达水平有所上调,未来可以通过基因编辑技术对 P16^{INK4a} 和 P21 的 mRNA 表达进行调控,进一步探究其对光老化的作用及机制,开发其靶向药物,最终实现延缓或抵御皮肤光老化的目标。

综上所述,本研究利用 UVA 照射建立了体外 HDFs 光老化模型和小鼠皮肤光老化模型,为深入探究皮肤光老化的机制及光老化的防治策略提供了坚实的基础。

参考文献

- [1] Sun J, Xie X, Song Y, et al. Selenomethionine in gelatin methacryloyl hydrogels; modulating ferroptosis to attenuate skin aging[J]. *Bioact Mater*, 2024,35:495-516.
- [2] Wang Y, Wang J Q, Chen H, et al. Progress of skin aging-related biomarkers and their mechanisms[J]. *J Tissue Eng Reconstruct Surg*, 2023, 19(6) : 586-590.
- [3] Fan L, Luan X, Jia Y, et al. Protective effect and mechanism of lycium barbarum polysaccharide against UVB-induced skin photoaging [J]. *Photochem Photobiol Sci*, 2024,23(10) :1931-1943.
- [4] Auh J H, Madhavan J. Protective effect of a mixture of marigold and rosemary extracts on UV-induced photoaging in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021,135:111178.
- [5] Zhang C. The role and mechanism of miR-137-3p targeting mitophagy receptor FUNDC1 in regulating skin photoaging via P53 ubiquitination mediated by BAZ1B[D]. Jilin: Jilin University, 2024.
- [6] Raza A, Dreis C, Kircik L, et al. New formulations of acyclothyridine dinucleosides reduce damaging effects of ultraviolet radiation in an ex vivo skin model[J]. *J Drugs Dermatol*, 2024,23(11) :953-956.
- [7] Bai G L, Wang P, Huang X, et al. Rapamycin protects skin fibroblasts from UVA-induced photoaging by inhibition of p53 and phosphorylated HSP27 [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021,9:633331.
- [8] Wei H F, Pei Y Y, Cui J R, et al. Integrating AI technology in the development and application of animal models for aging disease research[J]. *Int J Geriatr*, 2025,46(2) :253-256.
- [9] Kong Y, Guo Y. Construction and evaluation of skin photoaging mouse model [J]. *Laborat Animal Comparat Med*, 2021,41(2) :116-121.
- [10] Deng Y S, Lin J, Gan C L, et al. Literature analysis of the preparation elements of animal models of skin photoaging and the data of subjects [J]. *Laborat Animal Comparat Med*, 2023, 43(4) :406-414.
- [11] Ruiz-larrea M B, Martín C, Martínez R, et al. Antioxidant activities of estrogens against aqueous and lipophilic radicals; differences between phenol and catechol estrogens[J]. *Chem Phys Lipids*, 2000,105(2) :179-188.
- [12] Meng F, Xi L H, Zhang J, et al. Estrogen effect and the mechanism of skin aging[J]. *J Tissue Eng Reconstruct Surg*, 2015,11(6) :404-408.
- [13] Zhang P C, Hong Y, Zong S Q, et al. Variation of ferroptosis-related markers in HaCaT Cell photoaging models induced by UVB [J]. *Clin Cosmet Investig Dermatol*, 2023,16:3147-3155.
- [14] Dilixiati D L D E, Jia L. Improvement effect of exosomes derived from human adipose-derived stem cells and human dermal fibroblasts on ultraviolet-induced photoaging skin wrinkles in nude mice[J]. *J Jilin Univ (Medicine Edition)*, 2025,51(3) :621-631.
- [15] Chen Q, Zhang H, Yang Y, et al. Metformin attenuates UVA-induced skin photoaging by suppressing mitophagy and the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 23(13) :6960.
- [16] Guan L L, Lim H W, Mohammad T F. Sunscreens and photoaging : a review of current literature[J]. *Am J Clin Dermatol*, 2021,22(6) :819-828.
- [17] Dong C, Li Z, Wang X, et al. SRT1720 attenuates UVA-induced corneal endothelial damage via inhibition of oxidative stress and cellular apoptosis[J]. *Exp Eye Res*, 2023,231 :109464.