皮肤病学 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001409

糖基化终末产物对小鼠皮肤成纤维细胞衰老的影响

刘 露[1],龙媛媛[1],郭宗雨[1],唐 维[2],果 磊[1]
(重庆医科大学附属第一医院 1. 烧伤整形外科;2. 神经外科,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:建立糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGEs)诱导小鼠皮肤成纤维细胞(NCTC clone 929,L929)衰老模型,并探讨其相关生物学变化机制。**方法**:实验选用 L929 细胞株为实验对象,随机分为 5 组:空白对照组(L929+完全培养基)、实验组 A(L929+0.05 g/L AGEs)、实验组 B(L929+0.1 g/L AGEs)、实验组 C(L929+0.2 g/L AGEs)、阳性对照组(L929+10 g/L D-半乳糖)。通过 CCK-8 检测 24、48、72 h 各组细胞增殖情况;作用 48 h 后检测 β-半乳糖苷酶染色、细胞周期分析及衰老相关蛋白 p16、CyclinD1 表达水平验证 L929 衰老模型成立;活性氧和超氧化物歧化酶(superoxide dismutate,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、过氧化氢酶(catalase,CAT)检测细胞内氧化应激水平。**结果**:CCK-8 提示 AGEs 可抑制细胞增殖,刺激 48 h 细胞活力明显下降。与空白对照组相比,AGEs 呈浓度梯度性增高 β-半乳糖苷酶活性(B:24 ± 3.4,C:43 ± 10.0,均 P=0.000)和 G1 期阻滞率(A:69.90 ± 2.13,B:74.74 ± 1.49,C:79.29 ± 3.38,均 P=0.000),p16 蛋白表达上调(B:0.53 ± 0.20,C:0.63 ± 0.11,P=0.001,P=0.000),CyclinD1 蛋白表达下调(B:1.07 ± 0.14,C:0.63 ± 0.11,P=0.01,P=0.000),SOD 及 CAT 活性降低(B:29.19 ± 6.67,C:15.13 ± 5.21,P=0.001,P=0.000;A:3.73 ± 0.42,B:1.59 ± 0.16,C:1.20 ± 0.20,均 P=0.000),MDA 和活性氧水平增高(A:1.19 ± 0.08,B:2.02 ± 0.12,C:2.49 ± 0.03,均 P=0.000;A:1.49 ± 0.04,B:1.81 ± 0.34,C:1.92 ± 0.04,P=0.006,P=0.000,P=0.000);与阳性对照组相比,实验组 A β-半乳糖苷酶阳染细胞数和 G1 期细胞数降低[(12.0 ± 3.6) vs. (45.0 ± 8.2),P=0.004;(69.90 ± 2.13) vs. (76.59 ± 0.61),P=0.001],p16 蛋白表达下调[(0.34 ± 0.12) vs. (0.64 ± 0.04),P=0.001],CyclinD1 蛋白表达上调[(1.32 ± 0.09) vs. (0.51 ± 0.16),P=0.000],SOD 及 CAT 活性增高[(39.53 ± 4.24) vs. (27.09 ± 6.25),P=0.018;(3.73 ± 0.42) vs. (1.64 ± 0.09),P=0.000],MDA 和活性氧水平降低[(1.19 ± 0.08) vs. (2.39 ± 0.07),P=0.000;(1.47 ± 0.04) vs. (1.84 ± 0.09),P=0.020];上述实验结果提示实验组 B、C 与阳性对照组比较差异没有统计学意义(P>0.05)。**结论**:0.1 g/L 和 0.2 g/L AGEs 作用 48 h 均可建立 L929 体外衰老模型,这可能与细胞发生氧化应激及胞内衰老相关蛋白 p16、CyclinD1 表达改变有关。

【关键词】D-半乳糖;晚期糖基化终末产物;衰老;氧化应激
【中图分类号】R965.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2017-05-31

Effects of advanced glycation end products on aging of L929

Liu Lu[1], Long Yuanyuan[1], Guo Zongyu[1], Tang Wei[2], Guo Lei[1]
(1. Department of Burn and Plastic Surgery; 2. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To establish the aging model of NCTC clone 929(L929) induced by advanced glycation end products(AGEs) and to explore its biological mechanism. ***Methods***: In this study, L929 was randomly divided into five groups: blank control group (cultivated L929 with common incubation media), experimental group A(L929+AGEs, 0.05 g/L), experimental group B(L929+AGEs, 0.1 g/L), experimental group C(L929+AGEs, 0.2 g/L), positive control group(L929+D-galactose, 10 g/L). Cell proliferation was detected by CCK-8 at 24, 48, 72 hours. The establishment of aging model in L929 was evaluated by senescence aging β-galactosidase (SA-β-gal) staining and cell cycle assay, and the expressions of p16 and CyclinD1 were detected by Western blot. The levels of reactive oxygen species associated with oxidative stress in the cells, and aging indicators such as superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA) and catalase(CAT) were examined. ***Results***: CCK8 showed that AGEs could inhibit L929 proliferation and cell viability was decreased significantly after being cultivated for 48 hours. Compared with blank control group, AGEs increased the activity of β-galactosidase (B: 24.0 ± 3.4, C: 43.0 ± 10.0, P=0.000) and the blocking rate of phase G1 (A: 69.90 ± 2.13, B: 74.74 ± 1.49, C: 79.29 ± 3.38, P=0.000) and protein expression of p16 (B: 0.53 ± 0.20, C: 0.63 ± 0.11, P=0.001, P=0.000) in a dose-dependent manner, while AGEs decreased CyclinD1 expression [(1.32 ± 0.09) vs. (0.51 ± 0.16), P=0.000]. AGEs decreased the activity of SOD and CAT (B: 29.19 ± 6.67, C: 15.13 ± 5.21, P =0.001, P =0.000; A: 3.73 ± 0.42, B: 1.59 ± 0.16, C: 1.20 ±

作者介绍:刘 露,Email:395019936@qq.com,
研究方向:中医药延缓皮肤衰老。
通信作者:果 磊,Email:841602937@qq.com。
基金项目:重庆市卫生局中医药科技资助项目(编号:ZY20132123)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1647.002.html (2017-11-28)

0.20, P=0.000) and increased the level of MDA and reactive oxygen species [(1.19 ± 0.08) vs. (2.39±0.07), P=0.000; (1.47 ± 0.04) vs. (1.84 ± 0.09), P=0.020]. The number of cells in phase G1 and β-galactosidase positive staining cells was significantly lower in experimental group A than in positive control group [(12.0 ± 3.6) vs. (45.0 ± 8.2), P=0.004; (69.90 ± 2.13) vs. (76.59 ± 0.61), P=0.001]. The expression of p16 protein was significantly decreased in experimental group A than in positive control group[(0.34 ± 0.12) vs. (0.64 ± 0.04), P=0.001], while the expression of CyclinD1 protein was higher than that in positive control group[(1.32 ± 0.09) vs. (0.51 ± 0.16), P=0.000]. The activities of SOD and CAT were significantly higher than those of positive control group[(39.53 ± 4.24) vs. (27.09 ± 6.25), P=0.018; (3.73 ± 0.42) vs. (1.64 ± 0.09), P=0.000], while the levels of MDA and reactive oxygen species were significantly lower than those in positive control group[(1.19 ± 0.08) vs. (2.39 ± 0.07), P=0.000; (1.47 ± 0.04) vs. (1.84 ± 0.09), P=0.02]. There was no significant difference between experimental B and C and positive control group in these respects (P>0.05). ***Conclusion***: 0.1 g/L and 0.2 g/L AGEs can establish aging L929 in vitro model, which may be related to the changes of oxidative stress and *senescence-associated protein expression of p16 and CyclinD1*.

【Key words】D-galactose; advanced glycation end products; aging; oxidative stress

机体衰老以皮肤的衰老最为直观，皮肤衰老反映在细胞水平即为细胞衰老，皮肤成纤维细胞是真皮内主要的构成细胞，在皮肤老化的过程中扮演重要角色。当皮肤衰老时，成纤维细胞出现不可逆生长抑制、活力降低、细胞自身修复能力下降等改变[1]。

目前国内外学者根据众多衰老学说发现多种衰老模型诱导剂，其中较为公认的诱导剂为 D-半乳糖[2-5]，其体外最佳诱导浓度为 10 g/L[6]，能成功诱导成纤维细胞、神经元细胞、骨髓间充质干细胞及心肌细胞衰老[7-8]。D-半乳糖可与机体内大分子物质如蛋白质、核酸及脂质等发生一系列复杂氧化加成反应[9]，最终生成糖基化终末产物（advanced glycation end products，AGEs）。AGEs 本身可能就是一种衰老诱导剂。研究发现 AGEs 参与氧化应激、炎症反应等病理变化，还参与慢性肾脏病、糖尿病肾病、动脉粥样硬化等疾病的方式及发展过程，证明 AGEs 与人体组织器官的衰老密切相关[10-11]。而外源性 AGEs 能否具有与 D-半乳糖一样诱导皮肤成纤维细胞衰老的作用，目前尚未见相关研究证实。本实验以小鼠皮肤成纤维细胞（NCTC clone 929，L929）为实验对象，探讨不同浓度 AGEs 对成纤维细胞的致衰老作用及相关分子机制，建立一种更接近人体衰老过程的体外细胞衰老模型，为皮肤衰老的研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

D-半乳糖、D-甘油醛、苯甲磺酰氟均购于 Sigma 公司；PD-G25 色谱透析柱购于 GE Healthcare Life Sciences 公司；Gemini 胎牛血清、Gibco MEM 培养基、日本同仁 CCK-8 试剂盒、超氧化物歧化酶（superoxide dismutate，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）和过氧化氢酶（catalase，CAT）商业试剂盒均购于南京建成生物工程研究所；β-半乳糖苷酶细胞化学染色试剂盒、DCFH-DA 活性氧检测试剂盒和 BCA 增强型蛋白分析试剂盒均购自碧云天生物科技有限公司；p16、CyclinD1、β-actin 一抗均购于沈阳万类生物科技有限公司；鼠和兔二抗购自 CST 公司；Vimentin 一抗购自美国 Sigma 公司；Alexa Flour®594 标记山羊抗兔（H+L）购自中杉金桥公司。

1.2 AGEs 的制备与鉴定

参照文献[12]制备 AGEs：50 mg/mL 胎牛血清，100 mmol/L D-甘油醛，1 mmol/L 苯甲磺酰氟在 37 ℃下 PBS（pH 7.4）中超声波促溶混匀，0.22 μm 滤器过滤，于无菌条件下放置在 37 ℃恒温孵育箱中避光反应 7 d。以 PD-G25 脱盐柱去除色谱，条件如下：4 ℃缓慢上样，保持上样速度为 0.5 mL/min，上样范围为 0.1~0.5 mL/次，使用 PBS（pH 7.4，0.02 mol/L）洗脱，收集上清液，重复脱盐 2 次，确保充分去除未结合物质。

参照文献[13]鉴定 AGEs：以同样方法处理胎牛血清作为对照组，采用荧光分光光度计鉴定，PBS（pH 7.4）调零，于激发波长 360 nm，狭缝 3 nm，发射波长 430 nm，狭缝 3 nm，测定荧光值并荧光光谱扫描，测得底物中 AGEs 含量为 89.01 U/mg，-20 ℃保存备用。根据国际酶活性单位换算：1 U=0.5 ng，计算得到底物质量分数为 4.45%，使用完全培养基稀释为本实验所用终浓度：0.05、0.1、0.2 g/L。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫荧光标记 Vimentin 鉴定 L929 小鼠皮肤成纤维细胞株（NCTC clone 929，L929）购于上海江林生物科技公司（货号为 JL10293，由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心引进）。用 PBS 洗涤细胞 3 min×2 次，多聚甲醛室温固定 30 min，PBS 洗涤 10 min×3 次，0.5% Triton-X100 37 ℃透膜 30 min，PBS 洗涤 10 min×3 次，正常山羊血清 37 ℃封闭 1 h，Vimentin 一抗（1:200）4 ℃孵育过夜，复温 1 h，PBS 洗

涤 10 min × 3 次，羊抗兔 IgG（绿色荧光，1:200）室温孵育 1 h，PBS 漂洗 10 min × 3 次，DAPI（蓝色荧光）避光染核 10 min，PBS 漂洗 10 min × 3 次，50%甘油封片，荧光显微镜下采集图片。对照组使用 PBS 作为一抗，处理方法同上。

1.3.2 细胞培养与分组 L929 使用含有 10%胎牛血清、1%抗生素的 MEM 培养液，置于含 5% CO_2 生化孵育箱中 37 ℃培养，无血清培养液同步 24 h 后，随机分为 5 组：空白对照组（L929+完全培养基）、实验组 A（L929+0.05 g/L AGEs）、实验组 B（L929+0.1 g/L AGEs）、实验组 C（L929+0.2 g/L AGEs）、阳性对照组（L929+10 g/L D-半乳糖），实验中所用药物均用完全培养基作为稀释剂。

1.3.3 CCK-8 检测细胞活力 以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板，每组设 5 个复孔，空白对照组加入完全培养液，实验组分别加入不同浓度 AGEs（0.05、0.1、0.2 g/L），阳性对照组加入 D-半乳糖（10 g/L）。分别培养 24、48、72 h 后取出 96 孔板，各孔加入 100 μL（10%）CCK-8 培养液，于 450 nm 处测得吸光度值，以无细胞 CCK-8 培养液作空白比色，以（用药组-空白组）/（对照组-空白组）计算细胞活力，使用 Graphpad Prism 5 制图。各组实验重复 3 次。

1.3.4 衰老相关 β-半乳糖苷酶细胞染色 参照 β-半乳糖苷酶染色试剂盒说明书步骤进行。普通光学显微镜下呈蓝染即衰老细胞，各组随机选取 4 个高倍镜视野计数每 100 个细胞中阳染细胞数量[6]。各组实验重复 3 次。

1.3.5 流式细胞周期 收集各组细胞，PBS（pH 7.4）重悬至 1×10^6 个/mL，用预冷的 70 %乙醇 4 ℃固定过夜，碘化丙啶 37 ℃避光染色，流式细胞仪检测细胞周期，使用多周期软件进行分析。各组实验重复 3 次。

1.3.6 Western blot 分析衰老相关蛋白表达 干预 48 h 后 RIPA 裂解液抽提各组细胞总蛋白，BCA 试剂盒检测蛋白浓度，各组以 30 μg 为上样浓度，十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，然后转至 PVDF 膜上电转，室温下封闭 2 h 后滤纸吸干条带，加入 p16、CyclinD1 和 β-actin 一抗（均 1:500）4 ℃孵育过夜，次日 PBS（pH 7.4）洗膜，滤纸吸干条带，加入兔二抗（1:10 000）/鼠二抗（1:19 000）37 ℃孵育 1 h，洗膜，辣根过氧化物酶标记的增强型化学发光液显色，凝胶成像仪采集图像，采用 Image Lab 以目的蛋白/β-actin 作半定量分析。各组实验重复 3 次。

1.3.7 DCFH-DA 检测细胞内活性氧水平 参照 DCFH-DA 试剂盒说明书，收集各组细胞，使用流式细胞仪检测荧光参数。以测定组/空白组计算各组相对平均荧光强度。各组实验重复 3 次。

1.3.8 抗氧化酶活性分析 收集各组细胞，冰浴下超声破碎为细胞裂解液，裂解液中的 SOD、MDA 和 CAT 含量测定均参照说明书步骤进行。各组实验重复 3 次。

1.4 统计学分析

使用软件 SPSS 19.0，实验数据采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间处理采用单因素方差分析和析因方差分析，各组间两两比较采用 LSD-t 法，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 免疫荧光标记 Vimentin 鉴定结果

用绿色荧光标记 Vimentin 蛋白，蓝色荧光（DAPI）标记细胞核。荧光显微镜下观察到成纤维细胞的标志物 Vimentin 为阳性，证明该 L929 为成纤维细胞（图 1）。

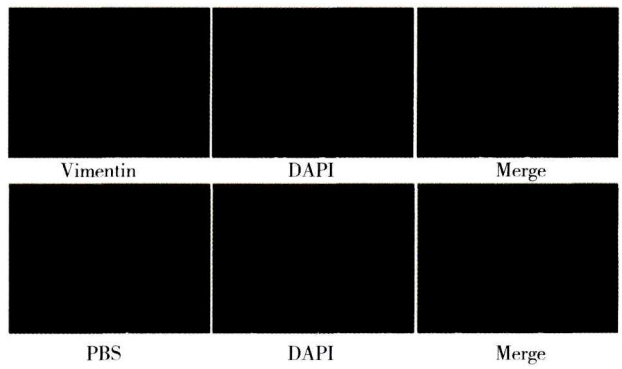
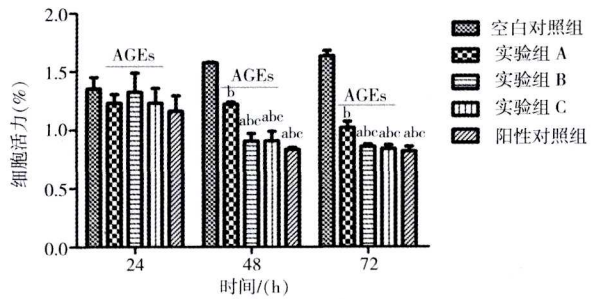


图 1 L929 中 Vimentin 的免疫荧光表达（200 × ）

Fig.1 Immunofluorescence expression of Vimentin in L929 (200 ×)

2.2 CCK-8 检测细胞生长活力

应用 CCK-8 法检测细胞活力，各组细胞于 24 h 内进入对数生长期，之后各组生长趋势开始呈现不同变化，空白对照组继续快速增殖，实验组与阳性对照组出现增殖抑制（图 2）。经过析因设计方差分析比较，不同组别处理对 CCK-8 的效应有统计学意义（F=26.265，P=0.000），不同时间点处理对 CCK-8 的效应有统计学意义（F=11.234，P=0.000），组别和时间对 CCK-8 的影响存在交互作用（F=4.480，P=0.001，表 1），因此 48 h 时细胞活力下降最明显，细胞数量下降约 31%。由此推断 AGEs（0.1、0.2 g/L）能够抑制 L929 细胞增殖，其诱导 L929 衰老的最佳作用时间为 48 h。



a：与同一组别的 24 h 比较，P<0.05；b：与同一时间处理的空白对照组比较，P<0.05；c：与同一时间处理的实验组 A 比较，P<0.05

图 2 CCK-8 检测各组细胞活力

Fig.2 The viability of each group was detected by CCK-8

表 1 不同浓度 AGEs 对 L929 活力的影响

Tab.1 Effect of IBFTF at various concentrations on the activity of L929

组别	作用时间		
	24 h	48 h	72 h
空白对照组	1.36 ± 0.16	1.58 ± 0.01	1.63 ± 0.08
实验组 A	1.23 ± 0.13	1.22 ± 0.03[b]	1.02 ± 0.09[b]
实验组 B	1.33 ± 0.28	0.91 ± 0.11[abc]	0.86 ± 0.03[abc]
实验组 C	1.23 ± 0.22	0.91 ± 0.14[abc]	0.84 ± 0.06[abc]
阳性对照组	1.16 ± 0.23	0.84 ± 0.03[abc]	0.82 ± 0.07[abc]

注：a，与同一组别的 24 h 比较，$P<0.05$；b：与同一时间处理的空白对照组比较，$P<0.05$；c：与同一时间处理的实验组 A 比较，$P<0.05$

2.3 β-半乳糖苷酶染色结果

与空白对照组相比，实验组 A β-半乳糖苷酶阳性细胞数量无统计学意义（P=0.063，图 3），实验组 B、C 和阳性对照组的 β-半乳糖苷酶阳染细胞数量则明显增多（均 P=0.000，图 4）；与阳性对照组相比，实验组 B、C 阳性细胞数量无统计学意义（P=0.735，P=0.865）；实验组比较，显示实验组 B、C 阳性细胞数量明显高于实验组 A（P=0.008，P=0.003，P=0.004，表 2）。

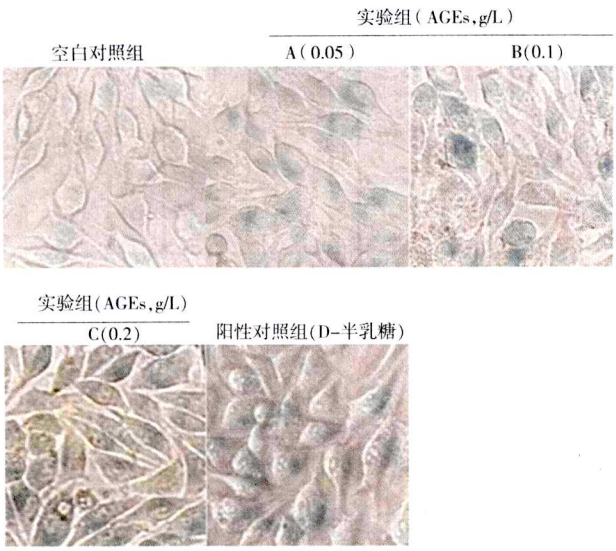
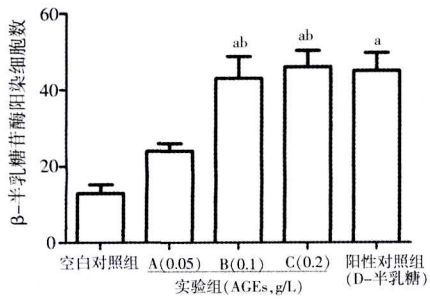


图 3 AGEs 对衰老 L929 β- 半乳糖苷酶活性的影响(400×)

Fig.3 Effect of Advanced glycation end products on activity of SA-β-gal staning in L929(400×)



a：与空白对照组比较，P<0.05；b：与实验组 A 比较，P<0.05

图 4 β- 半乳糖苷酶阳染细胞定量分析

Fig.4 Quantitative analysis of activity of SA-β-gal

表 2 不同浓度 AGEs 对细胞 β- 半乳糖苷酶活性的影响

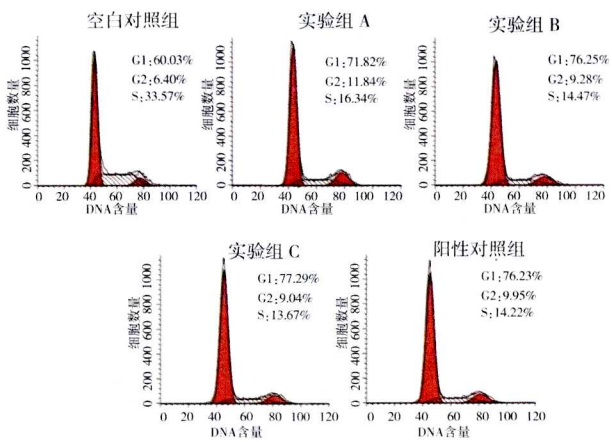
Tab.2 Effect of IBFTF at various concentrations on the activity of SA-β-gal in cells

组别	剂量（g/L）	SA-β-gal 阳染细胞数量
空白对照组	-	12.0 ± 3.6
实验组 A	0.05 AGEs	24.0 ± 3.4
实验组 B	0.10 AGEs	43.0 ± 10.0[ab]
实验组 C	0.20 AGEs	46.0 ± 7.5[ab]
阳性对照组	10 D- 半乳糖	45.0 ± 8.2[a]
F 值		14.060
P 值		0.000

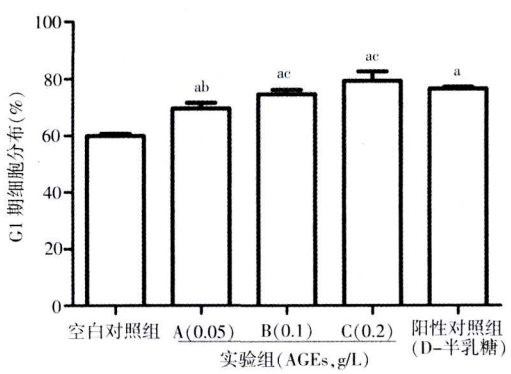
注：a，与空白对照组比较，P<0.05；b：与实验组 A 比较，P<0.05

2.4 不同浓度 AGEs 对 L929 G1 期细胞数量的影响

流式细胞术检测 G1 期细胞周期结果提示：实验组 A、B、C 与阳性对照组 G1 期细胞数量明显高于空白对照组，差异有统计学意义（均 P=0.000，图 5A）；与阳性对照组相比，实验组 A 的 G1 期细胞数量降低（P=0.001），实验组 B、C 的 G1 期细胞数量无统计学意义（P=0.275，P=0.124，图 5B）；实验组比较显示 B、C 组 G1 期细胞数量明显高于 A 组（P=0.009，P=0.000，表 3）。



A. G1 期细胞数量定量分析



B. G1 期细胞数量统计分析

a：与空白对照组比较，P<0.05；b：与阳性对照组比较，P<0.05；c：与实验组 A 比较，P<0.05

图 5 AGEs 对衰老 L929 G1 期细胞数量的影响

Fig.5 Effect of Advanced glycation end products on the number of L929 in G1 phase

表 3 各组 G1 期细胞数量

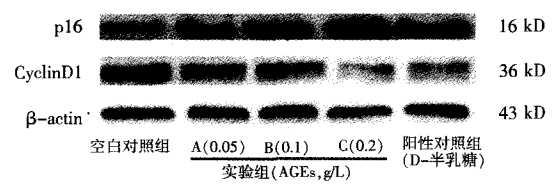
Tab.3 The number of L929 in G1 phase

组别	剂量（g/L）	G1期数量
空白对照组	-	59.96 ± 0.83
实验组 A	0.05 AGEs	69.90 ± 2.13[ab]
实验组 B	0.10 AGEs	74.74 ± 1.49[ac]
实验组 C	0.20 AGEs	79.27 ± 3.38[ac]
阳性对照组	10 D- 半乳糖	76.59 ± 0.61[a]
F 值		45.447
P 值		0.000

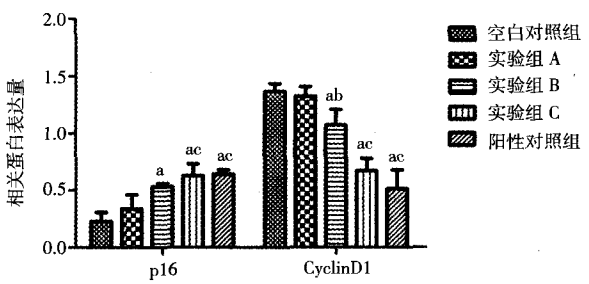
注：a，与空白对照组比较，*P*<0.05；b：与阳性对照组比较，*P*<0.05；c：与实验组 A 比较，*P*<0.05

2.5 Western blot 检测 p16、CyclinD1 蛋白表达

与空白对照组相比，实验组 A p16 和 CyclinD1 表达均无统计学意义（*P*=0.131，*P*=0.635），实验组 B、C 与阳性对照组 p16 表达明显升高（*P*=0.001，*P*=0.000，*P*=0.000，图 6A），CyclinD1 表达明显降低（*P*=0.01，*P*=0.000，*P*=0.000）；与阳性对照组相比，实验组 B、C p16 表达量无统计学意义（*P*=0.148，*P*=0.848），实验组 B CyclinD1 表达量升高（*P*=0.002），实验组 C CyclinD1 表达量无统计学意义（*P*=0.129，表 4）；实验组比较显示 B、C 组 p16 表达量高于 A 组（*P*=0.017，*P*=0.002），B、C 组 CyclinD1 表达量低于 A 组（*P*=0.024，*P*=0.000，图 6B）。



A. 蛋白免疫印迹法检测 p16 和 CyclinD1 蛋白表达水平



B. p16 和 CyclinD1 蛋白相对表达水平定量分析

a：与空白对照组比较，*P*<0.05；b：与阳性对照组比较，*P*<0.05；c：与实验组 A 比较，*P*<0.05

图 6 AGEs 对 p16 和 CyclinD1 蛋白表达水平的影响

Fig.6 The advanced glycation end products influenced the expression of p16 and CyclinD1

2.6 AGEs 对活性氧水平的影响

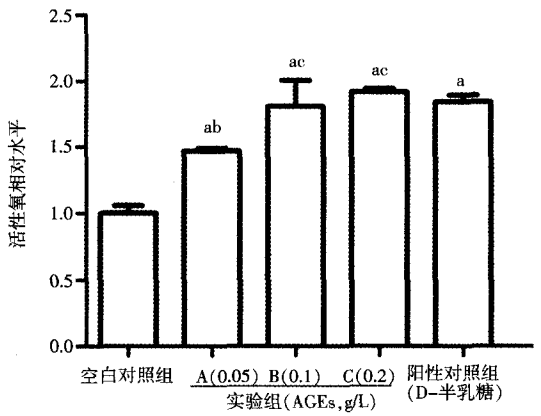
实验组 A、B、C 与阳性对照组活性氧水平明显高于空白对照组，差异有统计学意义（*P*=0.006，*P*=0.000，*P*=0.000，*P*=0.000，图 7）；与阳性对照组相比，实验组 A 活性氧水平降低（*P*=0.020），实验组 B、C 活性氧水平无明显改变（*P*=0.810，*P*=0.582）；实验组比较显示 B、C 组活性氧水平明显高于 A 组，差异有统计学意义（*P*=0.03，*P*=0.008，表 5）。

表 4 AGEs 对 p16 和 CyclinD1 蛋白表达水平的影响

Tab.4 The advanced glycation end products influenced the expression of p16 and CyclinD1

组别	剂量（g/L）	p16/β-actin	CyclinD1/β-actin
空白对照组	-	0.23 ± 0.08	1.37 ± 0.06
实验组 A	0.05 AGEs	0.34 ± 0.12	1.32 ± 0.09
实验组 B	0.10 AGEs	0.53 ± 0.20[ac]	1.07 ± 0.14[abc]
实验组 C	0.20 AGEs	0.63 ± 0.11[ac]	0.67 ± 0.11[ac]
阳性对照组	10 D- 半乳糖	0.64 ± 0.04[a]	0.51 ± 0.16[a]
F 值		14.455	32.461
P 值		0.000	0.000

注：a，与空白对照组比较，*P*<0.05；b：*P*<0.05，与阳性对照组比较；c：与实验组 A 比较，*P*<0.05



a：与空白对照组比较，*P*<0.05；b：与阳性对照组比较，*P*<0.05；c：与实验组 A 比较，*P*<0.05

图 7 AGEs 诱导活性氧自由基的产生

Fig.7 AGEs induced in the generation of reactive oxygen species

表 5 细胞内活性氧水平

Tab.5 The ROS level in cells

组别	剂量（g/L）	活性氧水平
空白对照组	-	1.00 ± 1.00
实验组 A	0.05 AGEs	1.47 ± 0.04[ab]
实验组 B	0.10 AGEs	1.81 ± 0.34[ac]
实验组 C	0.20 AGEs	1.92 ± 0.04[ac]
阳性对照组	10 D- 半乳糖	0.51 ± 0.16[a]
F 值		16.015
P 值		0.000

注：a，与空白对照组相比，*P*<0.05；b：与阳性对照组相比，*P*<0.05；c：与实验组 A 相比，*P*<0.05

2.7 AGEs 对 L929 细胞中抗氧化酶活性的影响

实验结果见表 6。

表 6 AGEs 对细胞中 SOD、MDA 及 CAT 含量的影响

Tab.6 Effect of Advanced glycation end productson the content of SOD, MDA and CAT in cells

组别	剂量（g/L）	SOD（U/mL）	MDA（nmol/mL）	CAT（U/mL）
空白对照组	-	48.24 ± 3.92	0.76 ± 0.15	4.81 ± 0.20
实验组 A	0.05 AGEs	39.53 ± 4.24	1.19 ± 0.08[ab]	3.73 ± 0.42[ab]
实验组 B	0.10 AGEs	29.19 ± 6.67[ac]	2.02 ± 0.12[abc]	1.59 ± 0.16[ac]
实验组 C	0.20 AGEs	15.13 ± 5.21[abc]	2.49 ± 0.03[abc]	1.20 ± 0.20[ac]
阳性对照组	10 D- 半乳糖	27.09 ± 6.25[a]	2.37 ± 0.07[a]	1.64 ± 0.09[a]
F 值		16.582	175.457	130.074
P 值		0.000	0.000	0.000

注：a，与空白对照组相比，$P<0.05$；b：与阳性对照组相比，$P<0.05$；c：与实验组 A 相比，$P<0.05$

与空白对照组比较，实验组 A 细胞 SOD 活性无明显改变（$P=0.075$），实验组 B、C 和阳性对照组细胞 SOD 活性则明显降低（$P=0.001$，$P=0.000$，$P=0.001$）；与阳性对照组相比，实验组 B 细胞 SOD 活性无统计学意义（$P=0.642$）；实验组 C 细胞 SOD 活性明显低于阳性对照组（$P=0.021$）；实验组比较显示 B、C 组 SOD 活性明显低于 A 组（$P=0.040$，$P=0.000$）。结果说明 SOD 活性随 AGEs 浓度增高而降低。

与空白对照组相比，实验组 A、B、C 与阳性对照组 MDA 含量明显增高（均 $P=0.000$）；与阳性对照组相比，实验组 A、B 细胞 MDA 含量降低（$P=0.000$，$P=0.001$），实验组 C 细胞 MDA 含量无统计学意义（$P=0.169$）；实验组比较显示 B、C 组 MDA 含量高于 A 组（均 $P=0.000$）。结果说明细胞中 MDA 含量随 AGEs 浓度增高而增高。

与空白对照组相比，实验组 A、B、C 与阳性对照组的CAT 活性明显降低（均 $P=0.000$）；与阳性对照组相比，实验组 A 细胞 CAT 活性增高（$P=0.000$），实验组 B、C 细胞 CAT 活性无统计学意义（$P=0.804$，$P=0.075$）；实验组比较显示 B、C 组CAT 活性低于 A 组（均 $P=0.000$）。结果说明 CAT 活性随 AGEs 浓度增高而降低。

3 讨 论

AGEs 是还原糖与蛋白质、脂质、核酸等非酶反应过程中形成的复杂化合物。近年来，AGEs 与衰老过程之间的密切关系成为人们关注的焦点。有研究发现人皮肤组织内的 AGEs 随年龄呈进行性增加。AGEs 可能是致皮肤衰老的重要诱因之一。皮肤真皮的成纤维细胞是皮肤组织的重要结构功能细胞，皮肤的衰老首先表现为细胞的衰老。有研究证明[14]皮肤成纤维细胞增殖活力降低，生长抑制等均会导致皮肤真皮层中的弹力纤维、胶原纤维、网状纤维以及细胞外基质分泌减少，从而导致皮肤皱纹加深加长、色素沉着等衰老表现。因此延缓皮肤成纤维细胞的衰老是目前各个科研领域，美容界和化妆品公司等的研究热点。鉴于 AGEs 本身是皮肤衰老的重要诱因，且已有研究证实成纤维细胞可表达AGEs 的受体 RAGE[15]。因此，建立体外 AGEs 诱导的成纤维细胞衰老模型并探究其机制，具有重要临床意义。

研究证实当衰老细胞处于 pH 6.0 的环境时，胞内 β-半乳糖苷酶活性上升且呈高表达，因此与衰老相关的 β-半乳糖苷酶可作为细胞衰老的分子生物检测标记[16]。本研究以公认的衰老诱导剂 D-半乳糖作为阳性对照[2-5]，为证实 AGEs 具有与 D-半乳糖一样具有诱导皮肤成纤维细胞衰老的作用，我们观察了 AGEs 对成纤维细胞生长、细胞周期以及与衰老相关蛋白、酶的变化。结果显示：浓度为 0.1 g/L 和 0.2 g/L 的 AGEs 刺激 L929 细胞，β-半乳糖苷酶染色阳性细胞数量明显多于空白对照组，而与 D-半乳糖阳性对照组无明显差异。另一方面，通常衰老细胞周期阻滞在 G1 期。本研究结果也显示：0.1 g/L 和 0.2 g/L 的 AGEs 均能导致处于 G1 期的细胞数量明显多于空白对照组，而无异于阳性对照组，由此表明 AGEs 能诱导细胞停滞于 G1 期，细胞更新速度减缓，大多数细胞被阻滞于 G0/G1 期，不进行 DNA 复制与有丝分裂，从而诱发衰老现象[17]。进一步观察发现，0.1 g/L 和 0.2 g/L 的 AGEs 刺激细胞后，与细胞周期调控相关蛋白 p16 表达增高，而周期蛋白 CyclinD1 表达下降，p16[18]的主要作用是通过抑制 CyclinD-CDK4/6-RB 磷酸化负相调控细胞周期，使细胞生长被阻滞于 G1 期；相反，细胞周期蛋白 CyclinD1 是 G1/S 期重要的正向调控因子，促进细胞周期进展，促使细胞增殖。p16 表达水平上调可抑制 CyclinD1 的活性，使其表达下降，从而使细胞被阻滞于 G1 期而无法进入 S 期，导致细胞周期停滞。这在 CCK-8 的检测结果中也得以应证，0.2 g/L AGEs 作用细胞 48 h 后，细胞增殖受抑，证明 AGEs 能抑制成纤维细胞增殖，且呈浓度依赖性。但如果 AGEs 浓度过大，如 0.3 g/L 的 AGEs 可能导致成纤维细胞凋亡[19]。最终，本研究结果表明：AGEs 能成功诱导 L929 细胞

衰老模型，浓度为 0.1 g/L 和 0.2 g/L AGEs 即可达D-半乳糖诱导细胞衰老的效果。

大量活性氧的产生或累积是导致细胞/组织衰老的主要诱因。AGEs 诱导成纤维细胞衰老可能主要是通过与细胞表面的 AGEs 受体(RAGE)结合后产生大量的活性氧，引发细胞内的氧化应激。细胞抗氧化能力下降，表现为细胞内 SOD、CAT 等抗氧化酶活力降低，对活性氧和过氧化氢的清除能力减弱。SOD 是机体主要抗氧化酶，其活性水平可间接反映机体对活性氧自由基的清除能力，与机体衰老程度密切相关[20]。CAT 主要作用为清除机体内过多的过氧化氢，起到维持细胞与机体内生物大分子物质(如蛋白质、核酸，脂质)的正常结构的功能，也是抗衰老研究中的主力军[21]。活性氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸，引起脂质过氧化作用，并形成脂质过氧化物(如 MDA)以及新的活性氧自由基等，脂质过氧化作用可放大活性氧的作用，进一步加重机体氧化应激反应，形成恶性循环。故 MDA 的含量可反映机体内脂质过氧化的程度。本实验中，活性氧与抗氧化酶活性检测结果提示，与空白对照组相比，AGEs 作用 48 h 后，细胞内抗氧化酶 SOD、CAT 活力明显降低，而活性氧水平及 MDA 含量明显增高，说明 AGEs 可能通过刺激细胞内活性氧水平增加，致使细胞发生氧化应激，从而促使衰老。因此本研究组认为，促使细胞内发生氧化应激反应是 AGEs 诱导细胞衰老的可能机制。

综上所述，本实验通过 AGEs 诱导 L929 发生生长增殖抑制、细胞周期停滞、老化相关蛋白 p16 表达上调、细胞周期蛋白 CyclinD1 表达下调以及细胞内的氧化应激状态等生物学特性变化，说明 AGEs可作为新的细胞衰老模型诱导剂，0.1 g/L 和 0.2 g/L 均可作为体外诱导 L929 衰老的作用浓度。实验进一步证实 AGEs 促使细胞衰老的可能机制是细胞内发生氧化应激反应所致。为临床上防治衰老的药物研究提供可靠的研究方向和实验依据。

参 考 文 献

[1] 王 曦，李 利. 成纤维细胞与皮肤老化[J]. 中国美容医学杂志，2005，14(2)：243-245.

[2] 陈 慧，龙媛媛，果 磊. 欧亚旋覆花总黄酮对 D-半乳糖衰老模型的小鼠的抗衰老作用[J]. 重庆医科大学学报，2016，41(10)：1010-1015.

[3] Chen H，Long Y，Guo L. Antiaging effect of inula britannica on aging mousemodel induced by D-galactose[J]. Evid Based Complement Alternat Med，2016，2016：6049083.

[4] Liang CY，Liang YM，Liu HZ，et al. Effect of dendrobium officinale，on D-galactose-induced aging mice[J]. Chin J Integr Med，2017 [Epub ahead of print].

[5] Garg G，Singh S，Singh AK，et al. Anti-aging effect of metformin on brain in naturally aged and accelerated senescence model of rat[J]. Rejuvenation Res，2017，20(3)：173-182.

[6] 颜冰希，余珊珊，冯 晓，等. D-半乳糖对大鼠骨髓间充质干细胞衰老的影响[J]. 浙江大学学报(医学版)，2013，42(6)：625-631.

[7] 崔 旭，李文彬，张炳烈，等. 自由基损伤与 D-半乳糖所致细胞老化关系[J]. 基础医学与临床，2000，20(1)：24-26.

[8] 李培峰，张炳烈，李文彬，等. 自由基对培养神经元拟衰老反应的观察[J]. 中国药理学与毒理学杂志，1992，7(1)：60-63.

[9] Wu CH，Huang SM，Lin JA，et al. Inhibition of Advanced glycation end product formation by foodstuffs[J]. Food Funct，2011，2(5)：224-234.

[10] Amano S，Kaji Y，Oshika T，et al. Advanced glycation endproducts in human optic nerve head[J]. Br J Ophthalmol，2001，85(1)：52-55.

[11] 陈 婷，马 刚. 非酶糖化与皮肤自然衰老的关系[J]. 皮肤性病诊疗学杂志，2013，20(5)：365-367.

[12] Park CH，Kim JW. Effect of advanced glycation end products on oxidative stress and senescence of trabecular meshwork cells[J]. Korean J Ophthalmol，2012，26(2)：123-131.

[13] Karumanchi DK，Karunaratne N，Lurio L，et al. Non-enzymatic glycation of α-crystallin as an in vitro model for aging，diabetes and degenerative diseases[J]. Amino Acids，2015，47(12)：2601-2608.

[14] 王敏骏，陆树良，盛昭园，等. 高糖环境中真皮成纤维细胞生物学行为的变化[J]. 中国糖尿病杂志，2006，14(2)：137-141.

[15] Vetter SW. Glycated serum albumin and AGE receptors[J]. Adv Clin Chem，2015，72：205-275.

[16] Debacq-Chainiaux F，Erusalimsky JD，Campisi J，et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase(SA-betagal) activity，a biomarker of senescent cells in culture and in vivo[J]. Nat Protoc，2009，4(12)：1798-1806.

[17] Ohtani N，Zebedee Z，Huot TJ，et al. Opposing effects of Ets and Id proteinson p16INK4a expression during cellular senescence[J]. Nature，2001，409(6823)：1067-1070.

[18] Park C，Lee I，Kang WK. E2F-1 is a critical modulator of cellular senescence in human cancer[J]. Int J Mol Med，2006，17(5)：715-720.

[19] 庞若宇，关美萍，郑宗基，等. 二甲双胍对糖基化终末产物诱导的成纤维细胞凋亡及相关蛋白 caspase-3、Bax 及 Bcl-2 表达的影响[J]. 南方医科大学学报，2015，35(6)：898-902.

[20] Giardino R，Giavaresi G，Fini M，et al. The role of differentchemicalmodifications of superoxide dismutase in preventing a prolonged muscularischemia/reperfusion injury[J]. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol，2002，30(3)：189-198.

[21] Jin SL，Yin YG. In vivo antioxidant activity of total flavonoids from indocalamus leaves in aging mice caused by D-galactose[J]. Food Chem Toxicol，2012，50(50)：3814-3818.

（责任编辑：张辉洁）