

不同多糖配伍对 H₂O₂ 诱导的皮肤细胞老化的抑制作用

王冰心¹, 钟铭¹, 卢颖裕¹, 高洁¹, 侯少贞¹, 李世杰²

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006) (2. 广东省中药新药研发重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 本研究为明确混合多糖配伍使用抑制皮肤细胞衰老的作用是否优于单一多糖, 通过利用不同浓度的 H₂O₂ 诱导人皮肤成纤维细胞 (HSF)、人角质形成细胞 (HaCaT) 出现损伤老化, 在此基础上, 采用 MTT 法和生化试剂盒检测, 分别检测细胞的存活率及超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、羟脯氨酸 (HYP) 的含量。本实验所建立的 HaCaT 及 HSF 细胞过氧化模型的存活率分别约为 72.00% 和 65.00%, 研究发现四种单一多糖组对两种细胞老化模型的存活率与模型组相比差异没有统计学意义 ($p>0.05$); 其中 SOD、MDA、HYP 的含量与模型组相比, 除个别指标外, 差异没有统计学意义 ($p>0.05$)。在 HaCaT 细胞老化模型中, 混合多糖组的存活率在 74.93%~80.43% 之间, SOD 含量在 6.99 U/mg~7.56 U/mg 之间, MDA 含量在 7.44 μ mol/g~8.41 μ mol/g 之间, HYP 含量表达在 2.30 μ mol/g~2.43 μ mol/g 之间; 在 HSF 细胞老化模型中, 混合多糖组的存活率在 76.23%~78.14% 之间, SOD 含量在 6.30 U/mg~8.90 U/mg 之间, MDA 含量在 7.03 μ mol/g~8.93 μ mol/g 之间, HYP 含量在 2.19 μ mol/g~2.53 μ mol/g 之间; 以上指标与模型组相比差异均有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。因此, 混合多糖组的整体改善效果更为显著, 它能够提高衰老表皮细胞生存率, 提高模型细胞 SOD、HYP 含量, 使 MDA 含量降低。研究提示我们在对抗 H₂O₂ 诱导的 HSF、HaCaT 细胞氧化衰老实验中, 在相同干预浓度下, 不同多糖配伍后的混合多糖比组分单一多糖单独使用效果显著。

关键词: 多糖; 抗皮肤衰老; 角质形成细胞; 成纤维细胞

文章篇号: 1673-9078(2019)09-57-66

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.006

Inhibition of Different Polysaccharides on H₂O₂-induced Skin Cell Aging

WANG Bing-xin¹, ZHONG Ming¹, LU Ying-yu¹, GAO Jie¹, HOU Shao-zhen¹, LI Shi-jie²

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

(2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine and New Drug Research and Development, Guangzhou 510006, China)

Abstract: The purpose of this study was to determine whether the effect of mixed polysaccharides in inhibiting skin cell senescence is superior to that of single polysaccharides by using different concentrations of H₂O₂ to induce damage to human skin fibroblasts (HSF) and human keratinocytes (HaCaT), on this basis, MTT assay and biochemical kit were used to detect cell viability and superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (HYP). The survival rates of HaCaT and HSF cell peroxidation models established in this experiment were about 72.00% and 65.00%, respectively. The study found that the survival rate of the two single aging models was not statistically different from that of the model group ($p>0.05$). The contents of SOD, MDA and HYP were not significantly different from those of the model group except for individual indicators ($p>0.05$). In the HaCaT cell aging model, the survival rate of the mixed polysaccharide group was between 74.93% and 80.43%, the content of SOD was between 6.99 U/mg and 7.56 U/mg, the content of MDA was between 7.44 μ mol/g and 8.41 μ mol/g, and the content of HYP was between 2.30 μ mol/g and 2.43 μ mol/g. In the HSF cell aging model, the survival rate of the mixed polysaccharide group was between 76.23% and 78.14%, the content of SOD was between 6.30 U/mg and 8.90 U/mg, the content of MDA was between 7.03 μ mol/g and 8.93 μ mol/g, and the content of HYP was between 2.19 μ mol/g and 2.53 μ mol/g. The above indicators were statistically significant compared with the model group ($p<0.01$ or $p<0.05$). Therefore, the overall improvement effect of the mixed polysaccharide group was more significant, which can improve the survival rate of senescent epidermal cells, increase the SOD, HYP content and reduce the MDA content of model cells. The study suggested that in the anti-H₂O₂-induced HSF and HaCaT cell oxidative senescence

收稿日期: 2019-04-15

基金项目: 国家中医药管理局第四批全国中医优秀人才研修项目 (国中医药人教发[2017]24 号); 广东省中药新药研发重点实验室 (2017B030314096); 广东省省级科技计划科技基础条件建设领域项目 (2014A030304059); 广东省省级科技计划科技应用型科技研发专项资金项目 (2015B020234008)

作者简介: 王冰心 (1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药活性成分的开发与研究

通讯作者: 高洁 (1971-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 中药及复方药理药效研究, 方剂配伍规律研究

experiments, the mixed polysaccharides of different polysaccharides were significantly more effective than the single polysaccharides alone, at the same intervention concentration.

Key words: polysaccharide; anti-skin aging; keratinocytes; fibroblasts

衰老是生物体生命周期中的自然生命历程, 细胞衰老是机体整体衰老的基础^[1]。对抗皮肤衰老, 传统中药具有明显优势。而传统中药的生物活性多糖主要来源于植物、动物或微生物等天然生物, 具保湿、微血管美容、抗粉刺、美白、修复皮肤组织、调节机体免疫、抗肿瘤、抗病毒、抗凝血、抗辐射、抗氧化和延缓衰老等多种美容功能^[2]。故通过科学研究, 创新性开发出一种以多糖为核心成分、以延衰为主要功效的皮肤护理产品^[3]也变得尤其有意义。本实验目的在于筛选出具有显著延缓皮肤衰老功效的天然多糖, 并验证其功效, 为现有延衰护肤系列产品升级提供支撑。

角质形成细胞 (HaCaT) 是表皮中的主体细胞, 从婴幼儿或者成人皮肤中原代分离培养人表皮角质形成细胞, 经多种特征蛋白表达等鉴定后, 即可传代备用。目前 HaCaT 细胞株已被广泛应用于化妆品的抗衰老及透皮性的研究中。真皮中成纤维细胞(HSF)它的活力会影响胶原蛋白的分泌、胶原蛋白纤维的数量和质量, 成纤维细胞受损会导致胶原蛋白的降解与合成失调、胶原纤维构造紊乱, 进而导致皮肤失去弹性并形成皱纹。皮肤的老化研究中, 成纤维细胞体外培养技术已经成为研究皮肤老化的重要工具。

褐藻多糖主要来自海带、巨藻等海藻, 由于其具有清除自由基的作用, 因此它可以作为食品抗氧化剂以及细胞保护剂, 有望可以用于食品工业、制药工业和化妆品^[4-6]。灵芝多糖来自中药灵芝, 研究发现灵芝多糖具有抗氧化的作用以及清除羟自由基和超氧阴离子自由基的能力, 而且其清除能力与它的浓度存在明显的量效关系^[7-11]。铁皮石斛多糖来自中药铁皮石斛, 有研究^[12-16]报道铁皮石斛多糖具有抗氧化活性且抗氧化能力与多糖相对分子量大小有关。铁皮石斛能调节胶原蛋白生成降解平衡, 对光老化人皮肤成纤维细胞起到保护作用^[17], 所以铁皮石斛多糖是有效的天然抗氧化剂, 且抗氧化范围广泛。竹荪多糖来自中药竹荪, 有研究^[18-23]表明了竹荪多糖对 DPPH 自由基和 ABTS 自由基都具有一定的清除作用, 具有较好抗氧化活性。但是石斛、褐藻、灵芝、竹荪多糖组合成混合多糖抑制过氧化皮肤衰老的论文却未见报道。所以本实验主要比较混合多糖和单一多糖在抗过氧化皮肤衰老效果方面的差异。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人永生表皮成纤维细胞 (HSF)、人永生角质形成细胞 (HaCaT), 购于中国科学院上海生科院细胞资源中心。

1.2 试剂

1640 培养基培养基, 美国 Gibco 公司 (生产批号: 8117251); 胎牛血清, 美国 Gibco 公司 (生产批号: 1507D); 青霉素-链霉素双抗液, 广州瑞舒生物有限公司 (生产批号: 1491907); 二甲基亚砜, 广州瑞舒生物有限公司 (生产批号: 20170401); 四甲基偶氮唑蓝 (MTT), 广州瑞舒生物有限公司 (生产批号: 20180501); 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒, 南京建成生物科技有限公司 (生产批号: 20180105); 微量丙二醛 (MDA) 测试盒, 南京建成生物科技有限公司 (生产批号: 20180106); 羟脯氨酸 (HYP) 测试盒, 南京建成生物科技有限公司 (生产批号: 20180105)。

1.3 供试品

本实验所用供试品, 均由 (广州中医药大学) 广东省中药新药研发重点实验室制备。采用“水提醇沉”方法反复纯化各单一多糖, 采用苯酚-浓硫酸比色法测定四种多糖样品中多糖的含量。并以无水葡萄糖 ($C_6H_{12}O_6$) 计, 各多糖的含量如下: 褐藻多糖组 70% (A)、灵芝多糖组 80% (B)、铁皮石斛多糖组 92% (C)、竹荪多糖组 86% (D)。

1.4 仪器

全波长酶标仪, 1510 Thermo fisher scientific; 光学显微镜 ECLIPSE CI, 尼康仪器 (上海) 有限公司; 超净工作台 YJ-VS-2, 无锡一净净化设备有限公司; 二氧化碳培养箱 MCO-20AIC, 日本三洋公司。

1.5 实验方法

1.5.1 四种单一多糖分别对 H_2O_2 诱导的氧化衰老皮肤细胞的影响

1.5.1.1 细胞培养与处理

当细胞融合度达 70%~80%时, 用胰蛋白酶消化细胞, 用含 15%胎牛血清的 DMEM (dulbecco's modified

eagle medium) 培养液制成浓度为 1×10^5 个/mL 的细胞悬液, 以每孔加 100 μ L 的培养液即每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 将培养板移入孵育箱, 在 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养。24 h 后吸除培养细胞的培养基, 根据预实验的“浓度-效果”关系曲线, 分别给予含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 单一多糖血清继续培养 24 h。

24 h 后吸除培养细胞的培养基, PBS 洗 3 遍, 建立细胞过氧化模型。

1.5.1.2 建立细胞过氧化模型

根据 1.5.1.1 方法将细胞以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中, 将培养板移入孵育箱, 在 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 条件下培养。细胞培养 24 h 后, 吸除培养液, PBS 洗 3 遍, 分别使用含 250 $\mu\text{mol/L}$ [24] 和 500 $\mu\text{mol/L}$ [25] H_2O_2 的培养液培养 HaCaT 细胞和 HSF 细胞 2 h, 2 h 后吸除培养液, PBS 洗 3 遍, 换上含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液继续培养 24 h。

24 h 后每孔加入 20 μL 的 MTT (5 mg/mL) 溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h, 4 h 后终止培养小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μL DMSO 溶液振荡 10 min, 而使结晶充分溶解。用全功能酶标仪, 波长在 490 nm 处, 测定各孔的吸光值(A 值), 以示细胞增殖情况。按照下列公式计算细胞存活率:

细胞存活率(%) = 处理组的 A 值 / 对照组的 A 值 $\times 100\%$ 。

1.5.1.3 单一多糖配药

根据前期预实验研究发现, 各多糖的有效浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 因此以多糖的有效浓度作为统一标准, 分别取褐藻、灵芝、石斛、竹荪多糖, 用细胞培养基溶解, 配成质量为 1 g/L 的药液, 以孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 再以培养基稀释成 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度 [26]。注意现配现用。

1.5.1.4 单一多糖分组及给药

细胞种板培养 24 h 后, 吸除培养细胞的培养基, 分为对照组, 过氧化模型组, 过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ 褐藻多糖组、过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ 灵芝多糖、过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ 石斛多糖、过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ 竹荪多糖组, 各组均具 5 个样本, 按 2.1.2 的方法建立过氧化模型。

对照组: PBS 洗 3 遍, 不用 H_2O_2 处理, 给予无药培养液培养 24 h。

模型组: 分别使用含 H_2O_2 (250 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液处理 HaCaT 细胞和 H_2O_2 (500 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液处理 HSF 细胞 2 h, 建立相应模型后 PBS 洗 3 遍, 给予无药培养液培养 24 h。

各单一多糖给药组: 造模后 PBS 洗 3 遍, 分别使用 50 $\mu\text{g/mL}$ 的单一多糖培养液培养 24 h。

1.5.2 不同配比的混合多糖分别对 H_2O_2 诱导的氧化衰老皮肤细胞的影响

1.5.2.1 不同配比的混合多糖配药

混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 的组成分别按以下混合比例混合成浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的药液, 石斛多糖: 褐藻多糖: 灵芝多糖: 竹荪多糖 = (A1) 1:1:1:1、(A2) 2:1:1:1、(A3) 1:2:1:1、(A4) 1:1:2:1、(A5) 1:1:1:2, 以孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌, 再以培养基稀释最终配成 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度。现配现用。

1.5.2.2 不同配比的混合多糖分组及给药

细胞种板培养 24 h 后, 吸除培养细胞的培养基, 分为对照组, 过氧化模型组, 过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ A1、过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ A2、过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ A3、过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ A4, 过氧化+50 $\mu\text{g/mL}$ A5, 各组均具 5 个样本。

对照组: PBS 洗 3 遍, 不用 H_2O_2 处理, 给予无药培养液培养 24 h。

模型组: 含 250 $\mu\text{mol/L}$ 和 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的培养液处理 HaCaT 细胞和 HSF 细胞 2 h, 建立相应模型后 PBS 洗 3 遍, 给予无药培养液培养 24 h。

各混合多糖给药组: 造模后 PBS 洗 3 遍, 分别使用 50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 培养液培养 24 h。

1.6 主要观察指标

1.6.1 检测 HaCaT 细胞和 HSF 细胞生存率

给药培养 24 h 后, 每孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL 溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 继续培养 4 h, 终止培养, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 而使结晶充分溶解。用全功能酶标仪, 波长在 490 nm 处, 测定各组的吸光值(A 值), 以示细胞增殖情况。按照下列公式计算细胞存活率(%) = 处理组的值 / 对照组的值 $\times 100\%$ 。

1.6.2 检测 HaCaT 细胞和 HSF 细胞 SOD、MDA 和 HYP 水平

给药培养 24 h 后, 收集每孔中的培养基上清液于离心管中, -20 $^\circ\text{C}$ 保存用以生化指标的检测。按照试剂盒说明书, 检测细胞培养基上清液中的 SOD、MDA 和 HYP 含量。

1.7 数据处理

所有数据均用均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 SPSS 17.0 软件对本研究的数据进行统计学分析, 两组间比较采用独立样本 t 检验。多组间差异比较用 one-way ANOVA 进行分析, $p < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 H_2O_2 诱导的 HaCaT、HSF 细胞氧化衰老

损伤模型

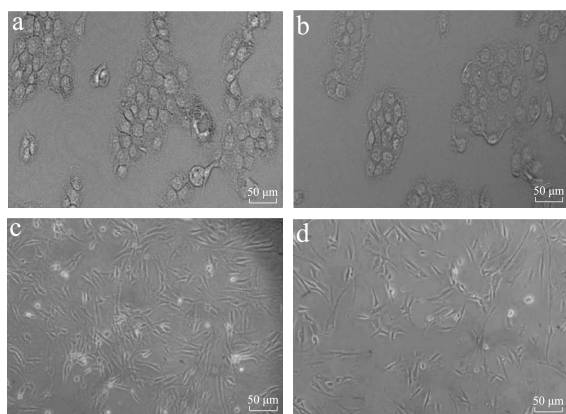


图1 H_2O_2 对 HaCaT、HSF 细胞生长形态的影响

Fig.1 Effects of H_2O_2 on the growth morphology of HaCaT and HSF cells

一般在正常情况下, HaCaT 细胞为牢固的贴壁生长的不规则细胞, 多为椭圆形和多角形(如图 1a, 正常 HaCaT 组); 随着 H_2O_2 作用时间的延长, HaCaT 细胞数量逐渐减少, 形态也发生变化(如图 1b, H_2O_2 氧化衰老 HaCaT 细胞组)。而正常皮肤成纤维细胞一般是贴壁生长的, 且成束状或纤维状, 数量较多(如图 1c, 正常 HSF 组)。随着 H_2O_2 作用时间的延长, HSF 细胞数量减少, 形态也逐渐变得不规则(如图 1d, H_2O_2 氧化衰老 HSF 细胞组)。无论是 HSF 细胞、HaCaT 细胞, 当 H_2O_2 氧化作用时间过长时, 会导致大部分细胞死亡, 且形态难以分辨。根据文献报道和前期的预实验结果, 本实验分别采用含 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 培养液处理 HaCaT 细胞和含 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 培养液处理 HSF 细胞 2 h, 建立角质形成细胞过氧化模型和成纤维细胞过氧化模型, HaCaT、HSF 细胞细胞的存活率分别约为 72.00% 和 62.00%。

表 1 单一多糖对 H_2O_2 老化 HaCaT 细胞存活率及生化指标的影响

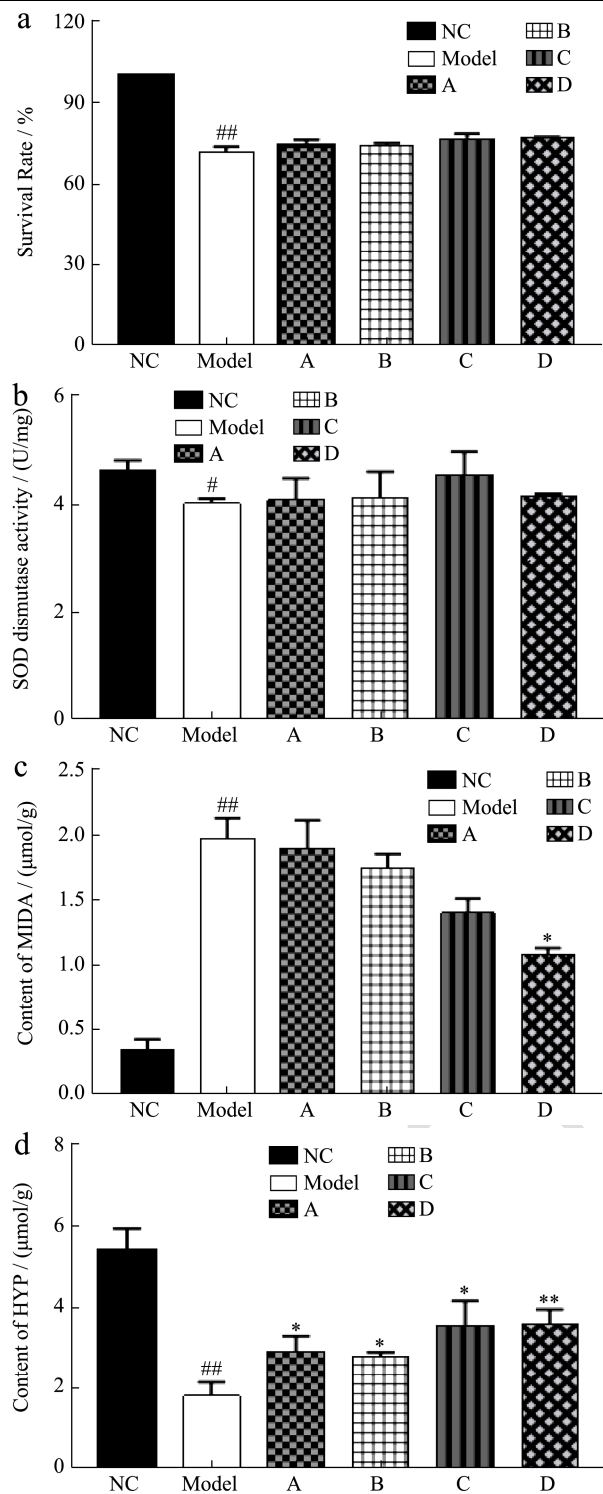
Table 1 Effect of single polysaccharide on survival rate and biochemical index of HaCaT cells induced by H_2O_2 (n=5)

组别	细胞存活率/%	SOD/(U/mg)	MDA/($\mu\text{mol/g}$)	HYP/($\mu\text{mol/g}$)
空白组	100 $\pm$ 0.51	4.63 $\pm$ 0.17	0.35 $\pm$ 0.18	5.41 $\pm$ 0.55
模型组	72.03 $\pm$ 1.96 ^{###}	4.01 $\pm$ 0.09 [#]	1.98 $\pm$ 0.35 ^{###}	1.82 $\pm$ 0.34 ^{###}
褐藻多糖	74.63 $\pm$ 2.01	4.07 $\pm$ 0.40	1.90 $\pm$ 0.48	2.94 $\pm$ 0.37 [*]
灵芝多糖	74.52 $\pm$ 1.05	4.12 $\pm$ 0.47	1.75 $\pm$ 0.25	2.82 $\pm$ 0.09 [*]
石斛多糖	76.98 $\pm$ 1.76	4.53 $\pm$ 0.43	1.41 $\pm$ 0.24	3.56 $\pm$ 0.62 [*]
竹荪多糖	77.15 $\pm$ 0.52	4.13 $\pm$ 0.06	1.09 $\pm$ 0.11 [*]	3.58 $\pm$ 0.38 ^{**}

注: 与空白组比较, [#] $p<0.05$, ^{###} $p<0.01$; 与模型组比较, ^{*} $p<0.05$, ^{**} $p<0.01$ 。下表同。

2.2 单一多糖对 H_2O_2 致氧化衰老的 HaCaT 细胞存活率及生化指标的影响

如图 2 以及表 1 结果所示, 用浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理 HaCaT 细胞, 模型组的成活率达 72% 左右, 与正常对照组相比差异有统计学意义($p<0.01$)。在相同浓度下 (50 $\mu\text{g/mL}$), 各个多糖对改善 HaCaT 细胞的存活率的影响各有不同, 四种单一多糖组 (褐藻多糖组 (A)、灵芝多糖组 (B)、石斛多糖组 (C)、竹荪多糖组 (D)) 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对 H_2O_2 致 HaCaT 细胞老化模型的抑制率分别为: 74.63%、74.52%、76.98%、77.15%, 与模型组相比差异没有统计学意义 ($p>0.05$)。其中 SOD 含量的表达正常组和模型组分别为 4.63 U/mg、4.01 U/mg, H_2O_2 致 HaCaT 老化模型组的 SOD 含量相较于正常组有显著性下降 ($p<0.05$), 而四种单一多糖 A、B、C、D 组分别为 4.07 U/mg、4.12 U/mg、4.53 U/mg、4.13 U/mg, 4 种不同多糖在相同浓度下对 H_2O_2 导致的 HaCaT 老化模型培养上清液中 SOD 的含量相较于模型组有所提高, 但与模型组相比并无统计学差异 ($p>0.05$)。其中 MDA 含量的表达正常组和模型组分别为 0.35 $\mu\text{mol/g}$ 、1.98 $\mu\text{mol/g}$, 模型组 MDA 含量相较于正常组有显著性升高 ($p<0.01$), 而四种单一多糖 A、B、C、D 组分别为 1.90、1.75、1.41、1.09 $\mu\text{mol/g}$, 4 种不同多糖在相同浓度下 (50 $\mu\text{g/mL}$) 对 H_2O_2 导致的 HaCaT 细胞老化模型培养上清液中 MDA 的含量相较于模型组均有所下调, 但除了 D 组 ($p<0.05$) 外, 其它组并无统计学差异 ($p>0.05$)。其中 HYP 含量的表达正常组和模型组分别为 5.41 $\mu\text{mol/g}$ 、1.82 $\mu\text{mol/g}$, 模型组 HYP 含量相较于正常组有显著性下降 ($p<0.01$), 而四种单一多糖 A、B、C、D 组分别为 2.94、2.82、3.56、3.58 $\mu\text{mol/g}$, 4 种不同多糖在相同浓度下对 H_2O_2 导致的 HaCaT 细胞模型培养上清液中 HYP 的含量相较于模型组均有所提高 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。

图2 单一多糖对 H_2O_2 老化HaCaT细胞存活率及生化指标的影响Fig.2 Effect of single polysaccharide on survival rate and biochemical parameters of HaCaT cells aged with H_2O_2

注: 各柱状图采用字母代表不同多糖组别: 褐藻多糖组

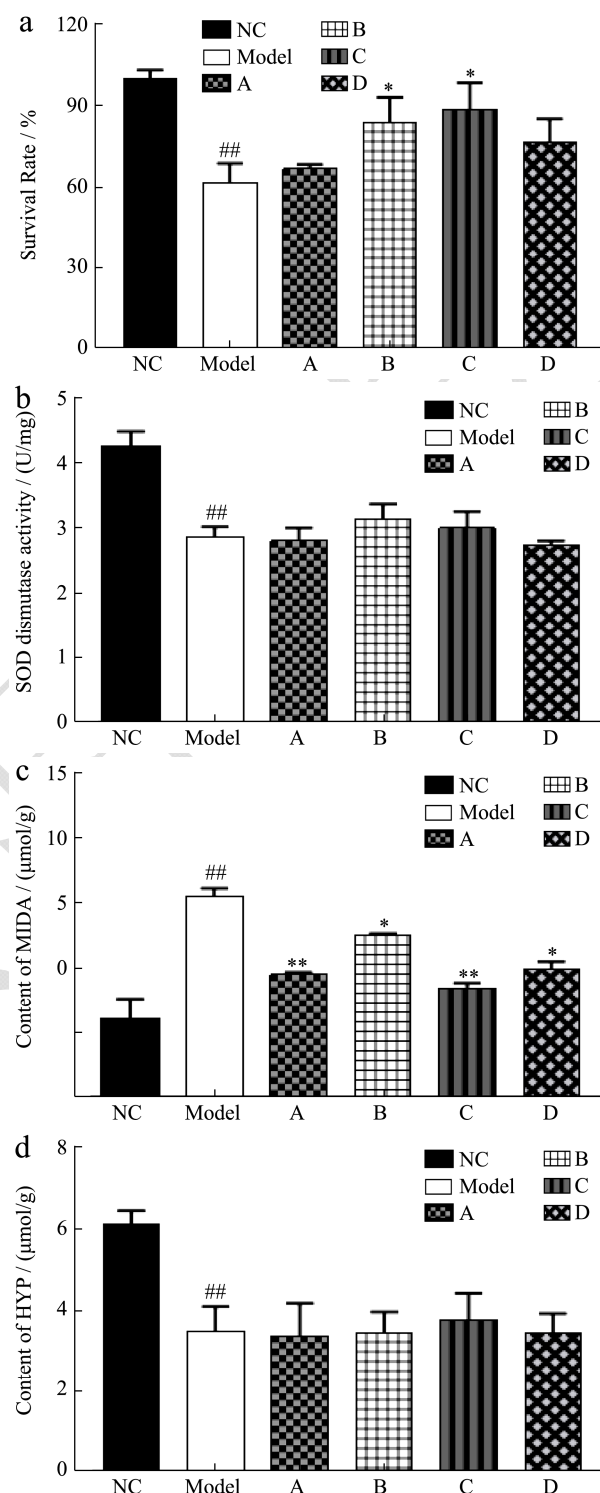
(A)、灵芝多糖组(B)、石斛多糖组(C)、竹荪多糖组(D)。

与空白组比较, [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$; 与模型组比较, ^{*} $p < 0.05$,

^{**} $p < 0.01$; $n = 5$ 。图3同。

2.3 单一多糖对 H_2O_2 致氧化衰老的HSF细胞

存活率及生化指标的影响

图3 单一多糖对 H_2O_2 致氧化衰老的HSF细胞存活率及生化指标的影响Fig.3 Effect of single polysaccharide on H_2O_2 oxidative senescence-induced HSF cell survival rate and biochemical parameters

如图3以及表2结果所示,用 $500 \mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 处理HSF细胞,模型组的成活率达62%左右,与正常

对照组相比差异有统计学意义 ($p<0.01$)。在相同浓度下 (50 $\mu\text{g/mL}$), 各个多糖对改善 HSF 细胞的存活率的影响各有不同, 四种单一多糖 A、B、C、D 组在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下对 H_2O_2 致 HSF 细胞老化模型的抑制率分别为: 67.22%、84.46%、89.04%、77.12%, 与模型组相比各给药组的存活率均有所提高, 但与模型组相比 A、D 组差异没有统计学意义 ($p>0.05$), B、C 组差异有统计学意义 ($p<0.05$)。其中 SOD 含量的表达正常组和模型组分别为 4.26 U/mg、2.88 U/mg, H_2O_2 致 HSF 老化模型组的 SOD 含量相较于正常组有显著性下降 ($p<0.01$), 而四种单一多糖 A、B、C、D 组分别为 2.82 U/mg、3.16 U/mg、3.02 U/mg、2.76 U/mg, 4 种不同多糖在相同浓度下对 H_2O_2 导致的 HSF 老化模型培养上清液中 SOD 的含量相较于模型组有所提高, 但与模型组相比并无统计学差异 ($p>0.05$)。

表 2 单一多糖对 H_2O_2 老化 HSF 细胞存活率及生化指标的影响Table 2 Effect of single polysaccharide on H_2O_2 aging HSF cell survival rate and biochemical index

组别	细胞存活率/%	SOD/(U/mg)	MDA/($\mu\text{mol/g}$)	HYP/($\mu\text{mol/g}$)
空白组	100 $\pm$ 3.42	4.26 $\pm$ 0.24	3.60 $\pm$ 1.00	6.13 $\pm$ 0.33
模型组	62.41 $\pm$ 7.10 ^{###}	2.88 $\pm$ 0.15 ^{###}	9.38 $\pm$ 0.37 ^{###}	3.48 $\pm$ 0.61 ^{###}
褐藻多糖	67.22 $\pm$ 1.52	2.82 $\pm$ 0.20	5.77 $\pm$ 0.09 ^{**}	3.38 $\pm$ 0.80
灵芝多糖	84.46 $\pm$ 9.31 [*]	3.16 $\pm$ 0.22	7.54 $\pm$ 0.12 [*]	3.44 $\pm$ 0.52
石斛多糖	89.04 $\pm$ 9.71 [*]	3.02 $\pm$ 0.25	5.13 $\pm$ 0.22 ^{**}	3.76 $\pm$ 0.66
竹荪多糖	77.12 $\pm$ 8.38	2.76 $\pm$ 0.06	5.98 $\pm$ 0.38 [*]	3.44 $\pm$ 0.48

表 3 混合多糖对 H_2O_2 老化 HaCaT 细胞存活率及生化指标的影响 (n=5)Table 3 Effect of compound polysaccharide on survival rate and biochemical index of H_2O_2 aging HaCaT cells

组别	细胞存活率/%	SOD/(U/mg)	MDA/($\mu\text{mol/g}$)	HYP/($\mu\text{mol/g}$)
空白组	100 $\pm$ 5.6	10.03 $\pm$ 0.48	4.38 $\pm$ 0.28	2.60 $\pm$ 0.12
模型组	72.47 $\pm$ 0.38 ^{###}	3.73 $\pm$ 0.72 ^{###}	11.83 $\pm$ 0.50 ^{###}	1.69 $\pm$ 0.15 [#]
A1	78.25 $\pm$ 0.88 [*]	7.56 $\pm$ 0.06 ^{**}	7.55 $\pm$ 0.71 ^{**}	2.31 $\pm$ 0.10 [*]
A2	80.43 $\pm$ 0.86 ^{**}	7.55 $\pm$ 0.09 ^{**}	7.44 $\pm$ 0.05 ^{**}	2.43 $\pm$ 0.24 [*]
A3	75.61 $\pm$ 0.12 [*]	7.05 $\pm$ 0.47 ^{**}	8.41 $\pm$ 0.89 [*]	2.31 $\pm$ 0.12 [*]
A4	74.93 $\pm$ 0.48 [*]	6.99 $\pm$ 0.48 [*]	7.55 $\pm$ 0.82 ^{**}	2.30 $\pm$ 0.22 [*]
A5	76.29 $\pm$ 0.79 [*]	7.14 $\pm$ 0.46 [*]	7.65 $\pm$ 0.74 ^{**}	2.30 $\pm$ 0.18 [*]

2.4 混合多糖 H_2O_2 老化 HaCaT 细胞存活率及生化指标的影响

如图 4 以及表 3 结果所示, 与正常组比较, 模型组过氧化 HaCaT 细胞存活率具有显著性下降 ($p<0.01$); 混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 组在 H_2O_2 致 HaCaT 细胞老化模型的抑制率分别为: 78.25%、80.43%、75.61%、74.93%、76.29%, 混合多糖提高过氧化 HaCaT 细胞存活率的作用与模型组相比较有所提高 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。在相同剂量下 (50 $\mu\text{g/mL}$),

其中 MDA 含量的表达正常组和模型组分别为 3.60 $\mu\text{mol/g}$ 、9.38 $\mu\text{mol/g}$, 模型组 MDA 含量相较于正常组有显著性升高 ($p<0.01$), 而四种单一多糖 A、B、C、D 组分别为 5.77 $\mu\text{mol/g}$ 、7.54 $\mu\text{mol/g}$ 、5.13 $\mu\text{mol/g}$ 、5.98 $\mu\text{mol/g}$, 4 种不同多糖在相同浓度下对 H_2O_2 导致的 HSF 细胞老化模型培养上清液中 MDA 的含量相较于模型组均有所下调, 且效果显著 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。其中 HYP 含量的表达正常组和模型组分别为 6.13 $\mu\text{mol/g}$ 、3.48 $\mu\text{mol/g}$, 模型组 HYP 含量相较于正常组有显著性下降 ($p<0.01$), 而四种单一多糖 A、B、C、D 组分别为 3.38 $\mu\text{mol/g}$ 、3.44 $\mu\text{mol/g}$ 、3.76 $\mu\text{mol/g}$ 、3.44 $\mu\text{mol/g}$, 4 种不同多糖在相同浓度下对 H_2O_2 导致的 HSF 细胞老化模型培养上清液中 HYP 的含量相较于模型组下降, 效果无统计学差异 ($p>0.05$)。

混合多糖 A2 组提高过氧化 HaCaT 存活率略暂优势。其中 SOD 含量的表达正常组和模型组分别为 10.03 U/mg、3.73 U/mg, 而混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 组分别为 7.56 U/mg、7.55 U/mg、7.05 U/mg、6.99 U/mg、7.14 U/mg, 与模型组相比差异均有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$), 其中 MDA 含量的表达正常组和模型组分别为 4.38 $\mu\text{mol/g}$ 、11.83 $\mu\text{mol/g}$, 而混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 组分别为 7.55 $\mu\text{mol/g}$ 、7.44 $\mu\text{mol/g}$ 、8.41 $\mu\text{mol/g}$ 、7.55 $\mu\text{mol/g}$ 、7.65 $\mu\text{mol/g}$, 与模型组相比差异均有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$), 其中 HYP 含量的表达正常组和模型组分别为 2.60

$\mu\text{mol/g}$ 、 $1.69 \mu\text{mol/g}$ ，而混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 组分别为 $2.31 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.43 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.31 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.30 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.30 \mu\text{mol/g}$ ，与模型组相比差异均有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)；与正常组比较，模型组的 SOD 和 HYP 显著下降 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)、MDA 显著升高 ($p<0.01$)；与模型组比较，对于不同配伍比例的混合多糖，均能不同程度提高 H_2O_2 致老化 HaCaT 细胞 SOD 和 HYP 的水平和抑制 MDA 的生成；其中混合多糖 A2 组整体改善效果更佳。

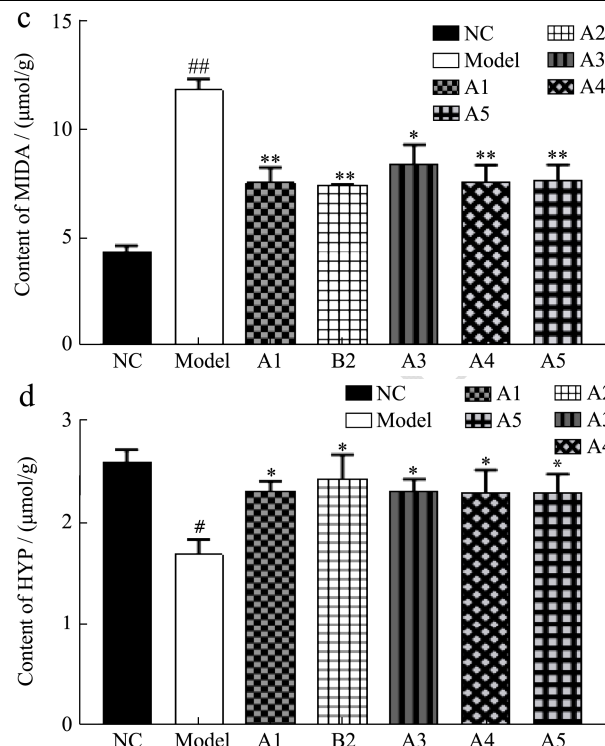
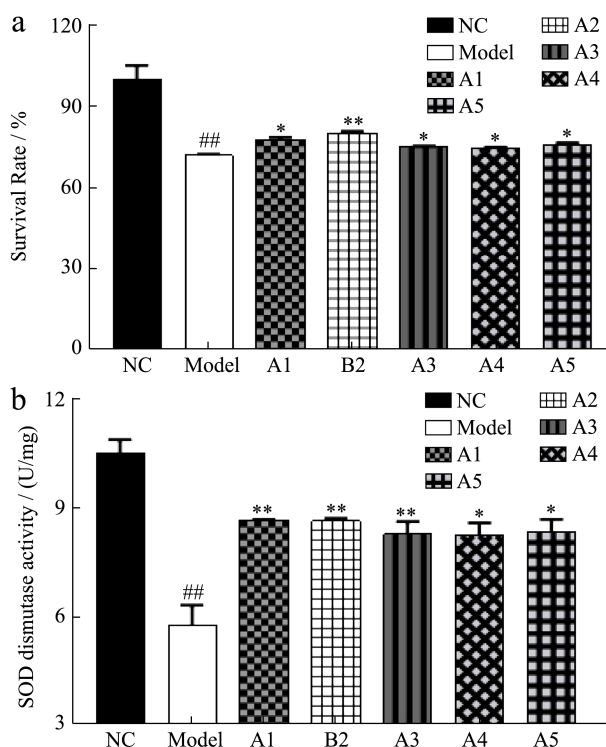


图4 混合多糖对 H_2O_2 老化 HaCaT 细胞存活率及生化指标的影响

Fig.4 Effect of mixed polysaccharides on survival rate and biochemical indexes of H_2O_2 aging HaCaT cells

注：与空白组比较， $\#p<0.05$ ， $\#\#p<0.01$ ；与模型组比较， $*p<0.05$ ， $**p<0.01$ ； $n=5$ 。图 5 同。

2.5 混合多糖对 H_2O_2 老化 HSF 细胞存活率及生化指标的影响

表 4 混合多糖对 H_2O_2 老化 HSF 细胞存活率及生化指标的影响

Table 4 Effect of compound polysaccharide on H_2O_2 aging HSF cell survival rate and biochemical index ($n=5$)

组别	细胞存活率/%	SOD/(U/mg)	MDA/($\mu\text{mol/g}$)	HYP/($\mu\text{mol/g}$)
空白组	100 ± 6.02	9.83 ± 0.18	2.82 ± 0.44	2.84 ± 0.13
模型组	$67.45\pm3.67^{\#\#}$	$3.53\pm0.32^{\#\#}$	$10.62\pm0.38^{\#\#}$	$0.97\pm0.02^{\#\#}$
A1	$78.05\pm5.33^*$	$6.63\pm0.28^{**}$	$8.93\pm0.54^*$	$2.19\pm0.09^{**}$
A2	$77.94\pm3.38^{**}$	$6.47\pm0.59^{**}$	$8.76\pm0.49^{**}$	$2.33\pm0.07^{**}$
A3	$76.23\pm3.72^{**}$	$8.74\pm0.73^{**}$	$8.92\pm0.61^*$	$2.35\pm0.08^{**}$
A4	$76.98\pm4.41^*$	$6.30\pm1.79^*$	$8.63\pm0.52^{**}$	$2.53\pm0.21^{**}$
A5	$78.14\pm2.39^{**}$	$8.90\pm0.23^{**}$	$7.03\pm0.10^{**}$	$2.20\pm0.15^{**}$

如图 5 以及表 4 结果所示，与正常组比较，模型组过氧化 HSF 细胞存活率具有显著性下降 ($p<0.01$)；各混合多糖均能够改善 HSF 细胞的存活率，相同浓度下 ($50 \mu\text{g/mL}$)，不同多糖配伍的混合多糖组 (A1、A2、A3、A4、A5) 在 H_2O_2 致 HSF 细胞老化模型的抑制率分别为：78.05%、77.94%、76.23%、76.98%、

78.14%，与模型组相比差异有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)，混合多糖能够提高模型细胞 SOD、HYP 含量，使其 MDA 含量降低，其中 SOD 含量的表达正常组和模型组分别为 9.83 U/mg 、 3.53 U/mg ，而混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 组分别为 6.63 U/mg 、 6.47 U/mg 、 8.74 U/mg 、 6.30 U/mg 、 8.90 U/mg ，与模型组

相比差异均有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$), 其中 MDA 含量的表达正常组和模型组分别为 $2.82 \mu\text{mol/g}$ 、 $10.62 \mu\text{mol/g}$, 而混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 组分别为 $8.93 \mu\text{mol/g}$ 、 $8.76 \mu\text{mol/g}$ 、 $8.92 \mu\text{mol/g}$ 、 $8.63 \mu\text{mol/g}$ 、 $7.03 \mu\text{mol/g}$, 与模型组相比差异均有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$), 其中 HYP 含量的表达正常组和模型组分别为 $2.84 \mu\text{mol/g}$ 、 $0.97 \mu\text{mol/g}$, 而混合多糖 A1、A2、A3、A4、A5 组分别为 $2.19 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.33 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.35 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.53 \mu\text{mol/g}$ 、 $2.20 \mu\text{mol/g}$, 与模型组相比差异均有统计学意义 ($p<0.01$ 或 $p<0.05$)。与正常组比较, 模型组 (过氧化 HSF 细胞) 的 SOD 和 HYP 含量显著下降 ($p<0.01$)、MDA 含量显著升高 ($p<0.01$); 与模型组比较, 对于不同配伍比例的混合多糖, 均能不同程度提高 H_2O_2 老化的 HSF 细胞 SOD 和 HYP 的水平和抑制 MDA 的生成; 其中混合多糖 A5 组整体改善效果更佳。

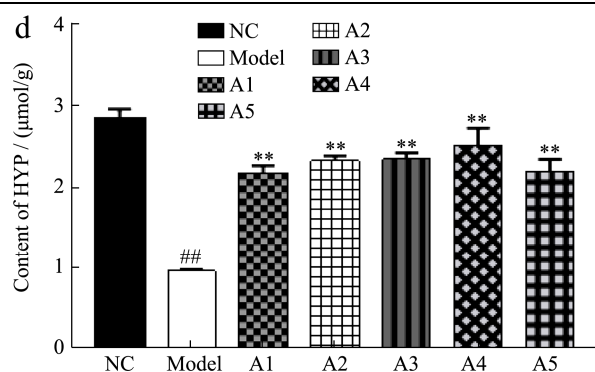
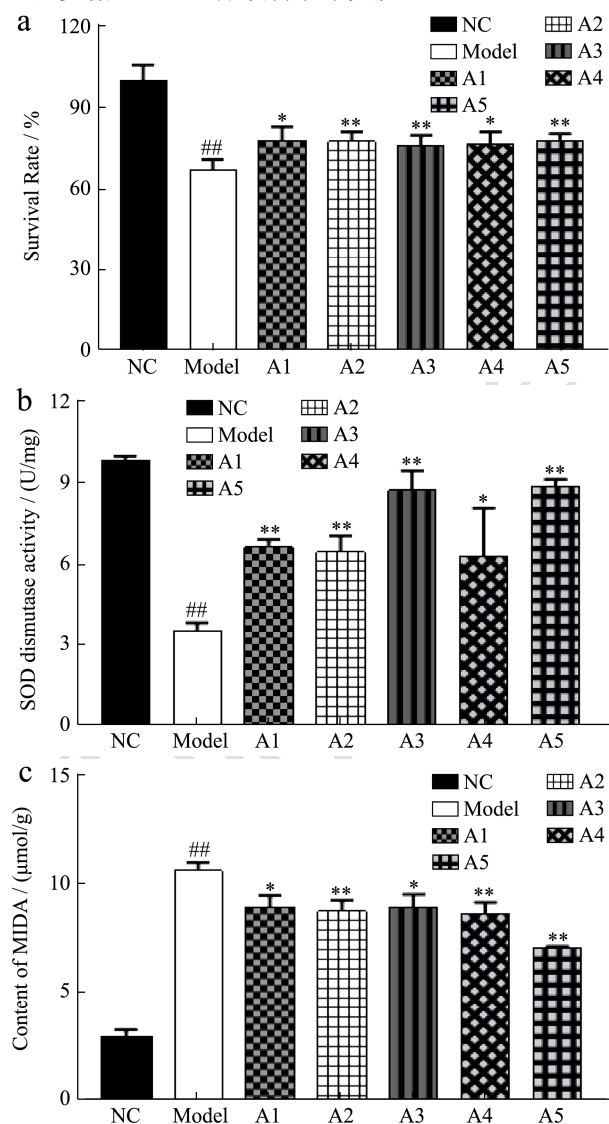


图5 混合多糖对 H_2O_2 老化 HSF 细胞存活率及生化指标的影响

Fig.5 Effect of mixed polysaccharides on H_2O_2 aging HSF cell survival rate and biochemical parameters

3 结论

3.1 皮肤老化可分为内源和外源性老化。内源性老化指随着年龄的增长, 由于机体功能的下降, 皮肤组织呈现的老化。内源性氧化便有活性氧家族中的一员 H_2O_2 。衰老自由基学说认为自由基累积导致的氧化损伤是皮肤衰老的重要原因。 H_2O_2 分子量小, 可以跨膜扩散方式进入细胞内, 进而参与调节细胞信号转导和细胞的增殖、老化、凋亡、坏死等一系列生理病理过程。

3.2 本实验通过系统分析国内外对中药天然植物等多糖提取物的研究和应用情况, 并筛选出 4 个代表性多糖, 分别为褐藻、灵芝、石斛、竹荪多糖。考虑到不同多糖的活性特点有所不同, 本研究拟在比较各单一多糖抗 H_2O_2 诱导的皮肤老化基础上, 进一步对四个多糖混合成混合多糖的抗氧化活性进行评价。在参考文献方法的基础上, 采用 H_2O_2 诱导的人皮肤成纤维细胞和人皮肤角质形成细胞氧化衰老模型, 考察四种单一多糖 (石斛多糖; 褐藻多糖; 灵芝多糖; 竹荪多糖) 以及配伍后的混合多糖抑制皮肤细胞氧化衰老的作用。细胞存活率, 可以直接反映出细胞的活性高低。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶, 它作为清楚生物体内自由基的首要物质, 也可以及时修复因氧自由基对细胞造成的损伤, 它的表达高低可以看做是细胞衰老与死亡的指标之一。而 MDA 能够导致膜脂过氧化, 从而使得细胞膜的结构和功能受到损伤, 生物膜的通透性遭到改变, 是导致机体衰老的重要因素之一, 通过检测它的含量可间接反映出因自由基而对细胞产生的损伤程度。HYP 是胶原蛋白中特征性氨基酸, 通过检测细胞培养基中 HYP 的含量, 可以了解胶原蛋白在细胞中的分解代谢情况。因此, 本实验采用 MTT

法考察细胞存活率, SOD、MDA 和 HYP 试剂盒检测相关指标的水平, 以期为客观评价供试品抗皮肤氧化衰老的作用提供实验依据。

3.3 本实验的前期研究中, 我们选用纯度较高四种多糖: 褐藻多糖 (70%)、灵芝多糖 (80%)、石斛多糖 (92%)、竹荪多糖 (86%)。为了验证 4 个单一多糖中对抗细胞衰老的效果, 我们选定了细胞生存率变化比较大的三个浓度梯度, 即: 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$, 分别测定两种细胞的衰老模型在三个浓度下的生化指标, 通过与正常组、模型组的生存指标的比较, 我们得到铁皮石斛多糖的药效最稳定, 其次为灵芝多糖, 再次为竹荪多糖、褐藻多糖。由于各多糖抗氧化量的量效曲线不同, 因此, 我们根据各多糖量效曲线的特点, 选择合理的同一浓度 (即 50 $\mu\text{g/mL}$), 考察了单一多糖以及混合多糖 (竹荪多糖+石斛多糖+灵芝多糖+褐藻多糖) 对表皮细胞的生存率和生化指标的影响。

3.4 在 50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下, 无论是对于 H_2O_2 老化 HSF 细胞或 HaCaT 细胞, 混合多糖整体改善效果优于单一多糖。与模型组比较, 不同单一多糖在细胞生存率以及三项生化指标检测方面显示的显著性差异不明显; 与模型组相比, 混合多糖组的 HaCaT 和 HSF 细胞生存率显著性差异明显, 并且 SOD 含量显著性提高, MDA 含量显著下降, HYP 含量显著提高。此外, 我们通过比较混合多糖不同配比方法对于细胞生化指标的影响情况, 发现混合多糖 A5 抗 HSF 皮肤细胞 H_2O_2 老化的整体效果相对最稳定; 而对于 H_2O_2 老化 HaCaT 细胞, 混合多糖 A2 的效果更为稳定; 但 A2 与 A5 整体之间的药效差异显著性不突出。

3.5 综上所述, 在对抗皮肤角质细胞和成纤维细胞 H_2O_2 老化实验中, 混合多糖 (石斛多糖+褐藻多糖+灵芝多糖+竹荪多糖) 较其各组分单一多糖单独使用效果好, 推荐采用混合多糖防治 H_2O_2 致皮肤老化。

参考文献

- [1] 宣敏, 程飏. 皮肤衰老的分子机制[J]. 中国老年学杂志, 2015, 15: 4375-4380
XUAN Min, CHENG Biao. Molecular mechanism of skin aging [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2015, 15: 4375-4380
- [2] 翁丽丽. 中医药抗皮肤衰老研究进展[J]. 光明中医, 2009, 24(12): 2400-2401
WONG Li-li. Research progress in anti-aging of traditional Chinese medicine [J]. Bright Chinese Medicine, 2009, 24 (12): 2400-2401
- [3] 吕辰鹏, 熊智, 何泉泉, 等. 中药多糖在功效化妆品中的应用前景[J]. 香料香精化妆品, 2016, 3: 67-71
LYU Chen-peng, XIONG Zhi, HE Quan-quan, et al. Application prospect of traditional chinese medicine polysaccharide in efficient cosmetics [J]. Spice and Fragrance Cosmetics, 2016, 3: 67-71
- [4] Ananthi S, Raghavendran H R B, Sunil A G, et al. *In vitro* antioxidant and *in vivo* anti-inflammatory potential of crude polysaccharide from *Turbinaria ornata* (marine brown alga) [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(1): 187-192
- [5] Vo T S, Kim S K. Fucoidans as a natural bioactive ingredient for functional foods [J]. J Funct foods, 2013, 5(1): 16-27
- [6] Guerra Dore C M P, Faustino Alves M G D C, Pofrio Will L S E, et al. A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, anti-thrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects [J]. Carbohydr Polym, 2013, 91(1): 467-475
- [7] 邹玉莲, 甘陈灵, 李鹏. 灵芝多糖现代药理学研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(8): 28-30
ZOU Yu-lian, GAN Chen-ling, LI Peng. Advances in modern pharmacology of *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2018, 30(8): 28-30
- [8] 张志军, 李淑芳, 魏雪生. 灵芝多糖清除自由基活性的研究[J]. 食品研究与开发, 2012, 33(3): 167-170
ZHANG Zhi-jun, LI Shu-fang, WEI Xue-sheng. Study on scavenging free radical activity of *Ganoderma lucidum* polysaccharide [J]. Food Research and Development, 2012, 33(3): 167-170
- [9] 晏涛, 陈世保, 徐蕾, 等. 灵芝多糖对阿尔茨海默病大鼠学习记忆和氧化应激的影响[J]. 陕西医学杂志, 2011, 40(4): 387-389
YAN Tao, CHEN Shi-bao, XU Lei, et al. Effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on learning and memory and oxidative stress in rats with Alzheimer's disease [J]. Shaanxi Journal of Medical Sciences, 2011, 40(4): 387-389
- [10] 史亚丽, 刘运祥, 韩立明, 等. 灵芝多糖对力竭小鼠抗脂质过氧化作用研究[J]. 现代预防医学, 2006, 33(6): 889-890
SHI Ya-li, LIU Yun-xiang, HAN Li-ming, et al. Anti-lipid peroxidation of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in exhausted mice [J]. Modern Preventive Medicine, 2006, 33(6): 889-890
- [11] 陈洁, 杨红梅, 裴瑞, 等. 灵芝多糖对肝缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(4): 700-701
CHEN Jie, YANG Hong-mei, PEI Rui, et al. Protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on hepatic

- ischemia-reperfusion injury [J]. Journal of Practical Medicine, 2010, 26(4): 700-701
- [12] 查学强,王军辉,潘丽华,等.石斛多糖体外抗氧化活性的研究[J].食品科学,2007,28(10):90-93
CHA Xue-qiang, WANG Jun-hui, PAN Li-hua, et al. Study on antioxidant activity of dendrobium polysaccharide *in vitro* [J]. Food Science, 2007, 28(10): 90-93
- [13] 郝杰,查学强,鲍素华,等.霍山石斛不同分子量多糖体外抗氧化研究[J].食品科学,2009,30(15):94-98
HAO Jie, CHA Xue-qiang, BAO Su-hua, et al. Antioxidant activity of different molecular weight polysaccharides from dendrobium huoshanense [J]. Food Science, 2009, 30(15): 94-98
- [14] 鲍素华,查学强,郝杰,等.不同分子量铁皮石斛多糖体外抗氧化活性研究[J].食品科学,2009,30(21): 123-127
BAO Su-hua, CHA Xue-qiang, HAO Jie, et al. Study on antioxidant activity of different molecular weights of *Dendrobium dendrobii* polysaccharide *in vitro* [J]. Food Science, 2009, 30(21): 123-127
- [15] 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等.铁皮石斛原球茎多糖 DCP1a-1 对氧自由基和脂质过氧化的影响[J].天然产物研究与开发,2007,19(3): 410-414
HE Tie-guang, YANG Li-tao, LI Yang-rui, et al. Effects of protocorm polysaccharide DCP1a -1 from *Dendrobium candidum* on oxygen free radicals and lipid peroxidation [J]. Natural Product Research and Development, 2007, 19(3): 410-414
- [16] 何铁光,杨丽涛,李杨瑞,等.铁皮石斛原球茎多糖粗品与纯品的体外抗氧化活性研究[J].中成药,2007,29(9):1265-1269
HE Tie-guang, YANG Li-tao, LI Yang-rui, et al. *In vitro* antioxidant activity of crude and pure polysaccharides from *Dendrobium candidum* [J]. Chinese Patent Medicine, 2007, 29(9): 1265-1269
- [17] 熊丽萍,万屏南,衷友泉.几种石斛多糖的提取分离及其抗氧化性能研究[J].江西中医学院学报,2006,18(4): 55-56
XIONG Li-ping, WAN Ping-nan, ZHONG You-quan. Extraction and separation of several *dendrobium* polysaccharides and their antioxidant activities [J]. Journal of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, 2006, 18(4): 55-56
- [18] The protective effect of *Dendrobium officinale* polysaccharides on photoaging fibroblasts by scavenging reactive oxygen species and promoting the expression of TGF- β 1 [J]. Traditional Medicine Research, 2018, (3): 131-139
- [19] HUA YL, YANG B, TANG J, et al. Structural analysis of water soluble polysaccharides in the fruiting body of *Dictyophora indusiata* and their *in vivo* antioxidant activities [J]. Carbohydr Polym, 2012, 87(1): 343-347
- [20] 王宏雨,江玉姬,谢宝贵,等.竹荪提取物体内抗氧化活性[J].热带作物学报,2011,32(1):76-78
WANG Hong-yu, JIANG Yu-ji, XIE Bao-gui, et al. Antioxidant activity in extracts from bamboo stalks [J]. Journal of Tropical Crops, 2011, 32(1): 76-78
- [21] 王蓓蓓,段玉峰,邵红军,等.红托竹荪多糖抗氧化活性的研究[J].天然产物研究与开发,2012,24(8):1122-1125
WANG Bei-bei, DUAN Yu-feng, SHAO Hong-jun, et al. Study on antioxidant activity of polysaccharides from *Radix scutellariae* [J]. Natural Product Research and Development, 2012, 24(8): 1122-1125
- [22] 王彦辉,林陈强,邱宏端,等.棘托竹荪孢子粉抗氧化活性研究[J].天然产物研究与开发,2013,25(11):1576-1581.
WANG Yan-hui, LIN Chen-qiang, QIU Hong-duan, et al. Antioxidant activity of the spore powder of *R. serrata* [J]. Natural Product Research and Development, 2013, 25(11): 1576-1581
- [23] 刘沙沙.竹荪研究现状及应用进展探讨[A].中国香料香精化妆品工业协会.第十届中国化妆品学术研讨会论文集[C].中国香料香精化妆品工业协会:中国香料香精化妆品工业协会,2016:4
LIU Sha-sha. Research on the Status Quo and Application of Bamboo Rafts [A]. China Spice and Fragrance Cosmetics Industry Association. Proceedings of the 11th China Cosmetics Symposium [C]. China Spice and Fragrance Cosmetics Industry Association: China Spice and Fragrance Cosmetics Industry Association, 2016: 4
- [24] 王晓艳.过氧化氢对正常人角质形成细胞的氧化损伤研究[A].中华医学会、中华医学会皮肤性病学会:中华医学会第14次全国皮肤性病学术年会论文汇编[C].中华医学会、中华医学会皮肤性病学会:中华医学会,2008:1
WANG Xiao-yan. Oxidative Damage of Normal Human Keratinocytes by Hydrogen Peroxide[A]. Chinese Medical Association, Chinese Society of Dermatology and Sexual Diseases Branch: The 14th National Symposium on Dermatological Diseases of Chinese Medical Association [C]. Chinese Medical Association Chinese Society of Dermatology and Sexually Transmitted Diseases: Chinese Medical Association, 2008: 1

(下转第 146 页)