

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.16.005

文章编号: 1005-8982(2016)16-0023-06

论著

五味子甲素衍生物联苯双酯的 紫外防护作用及机制研究*

曹波¹, 王娟娟², 陈诗雅¹, 路婷婷¹, 陈虹¹, 齐莉¹

(1. 武警后勤学院, 天津 300309; 2. 天津医科大学, 天津 300070)

摘要: **目的** 探讨联苯双酯(DDB)对中波紫外线(UVB)的防护作用及其相关机制研究, 为临床应用提供理论依据。 **方法** DDB和维生素C对照检测五味子甲素衍生物DDB对超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)的清除率。MTT法测定DDB、UVB对人永生角质形成细胞(HaCaT)、人真皮成纤维细胞(FB)生长的影响及DDB对UVB的防护作用。通过Giemsa染色, 从形态学上观察DDB对UVB损伤的防护作用。激光共聚焦观察活性氧簇(ROS)及检测其荧光强度。 **结果** 实验结果表明, 相同浓度DDB具有强的清除 $O_2^{\cdot-}$ 的能力; DDB对HaCaT、Fb细胞无毒性且可防护UVB损伤。Giemsa染色后, 形态学上发现DDB可以明显抑制细胞的凋亡。DDB可抑制HaCaT细胞外ROS的生成。 **结论** 五味子甲素衍生物DDB对UVB有明显的防护作用, DDB作用机制是通过其抗氧化活性抑制UVB辐射引起的氧化应激及细胞凋亡等, 起到紫外线防护作用, 有望开发成为有效的抗氧化剂和紫外防护产品。

关键词: 五味子甲素衍生物联苯双酯; 机制研究; UVB

中图分类号: R932

文献标识码: A

Protective effect of SchA derivant Dimethyl dicarboxylate biphenyl against damage of UVB irradiation and its mechanism*

Bo Cao¹, Juan-juan Wang², Shi-ya Chen¹, Ting-ting Lu¹, Hong Chen¹, Li-Qi¹

(1. Logistics University of People's Armed Police Force, TianJin 300309, China;

2. Medical University Of Tianjin, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the protective activity of SchA derivant DDB on the UVB-induced skin damage and explore its mechanism. **Methods** The Anti-oxidation activity against reactive oxygen species (ROS) including superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) was investigated. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to examine the effect of DDB or UVB on HaCaT and Fb cells' viability and its protective effect from UVB's damage. UVB-induced cells apoptosis was visualized with Giemsa stain. Anti-oxidative capacity of the drugs was evaluated by dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) assay. **Results** In this study, the topical application of DDB after UVB irradiation was found to decrease UVB-induced oxidation damage, the drug had a highly activity of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$). Through MTT assay, we found that DDB was found had no damage to cells. Meanwhile, we also find that DDB can decrease human melanoma cell's production. Through Giemsa stain, we visualized that the drug can inhibit UVB induced HaCaT cell death. **Conclusions** In a word, DDB may be useful in anti-photoaging agents in the treatment of UVB irradiation.

Keywords: SchA derivant dimethyl dicarboxylate biphenyl; mechanism; UVB

收稿日期: 2015-12-20

* 基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划(青年项目)(No: 14JCQNFC10300); 武警后勤学院院级科学基金(No: WHM201308); 国家自然科学基金资助项目(No: 81072964)

[通信作者] 齐莉, E-mail: qili3017@sina.com, Tel: 13920146924

联苯双酯 (dimethyl dicarboxylate biphenyl, DDB) 是研究五味子过程中发现的一种重要的医药中间体^[1], 它是一种单一木脂素化合物, 可治疗病毒性肝炎和药物性肝损伤引起转氨酶升高, 具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、保肝及抑制血小板活化因子等生理功能^[2]。

随着环境污染日渐加重, 进而臭氧层破坏导致的紫外线损伤越来越严重, 皮肤长期暴露在紫外线下可以引起皮肤损伤, 出现皮肤光老化甚至出现皮肤癌变和其他皮肤病变^[3]。皮肤接受过多的紫外线辐射, 皮肤组织细胞会产生氧化应激, 产生过量的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS), 破坏细胞膜的完整性和细胞内的抗氧化系统, 进一步引起细胞炎症、细胞凋亡及肿瘤的形成^[4-5]。紫外线分为 3 个波段: 长波紫外线 (ultraviolet radiation A, UVA) 320 ~ 400 nm; 中波紫外线 (ultraviolet radiation B, UVB) 275 ~ 320 nm; 短波紫外线 (ultraviolet radiation C, UVC) 230 ~ 275 nm。其中 UVB 又称作晒斑紫外线, 其对皮肤的损伤最大^[6-7]。预防紫外线光老化及有紫外线引起的皮肤病是重要措施, 因此本实验对 DDB 的抗 UVB 作用进行了体外实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人永生化角质形成细胞 (HaCaT human keratinocyte cell line, HaCaT) 和人黑色素细胞为四军医大学赠与, 人真皮成纤维细胞 (Human dermal fibroblasts, Fb) 购自北京协和细胞库。

1.1.2 主要试剂 DDB 由中国人民武装警察部队后勤学院生药学教研室提供, 体外实验用 DMSO 配制。DMEM、RPMI1640 购自天润善达公司, 胎牛血清 (FBS) 为中国医学科学院血研所科技公司产品, 二甲基亚砷 (DMSO)、牛血清白蛋白 (BSA)、溴化四氮唑蓝 (MTT) 均购自 Sigma 公司, 胰酶 (Trypsin)、Tris、Tris Base 购自 GIBCO 公司, Triton X-100 由香港 FARCO 公司提供, Giemsa 染液为 Serva 公司产品。HE 染液、一抗稀释液购自碧云天生物技术研究, 其他常规试剂及溶剂均由北京化学试剂研究所、北京化工厂及北京双环化学试剂厂提供。

1.1.3 主要仪器 MCO-AC 型二氧化碳细胞培养箱购于 SANYO 公司, JJT-900/1300 超净工作台购于北京半导体设备一厂, TS100 型倒置显微镜购于 NiKon 公司, CHK 型光学显微镜和 C-4040ZOOM

型 Olympus 数码相机购于 Olympus 公司, SZ-93 自动双重纯水蒸馏器购于上海亚荣生化仪器厂, HU-6150T 型超声波清洗器购于上海爱朗仪器有限公司, Adventurer 万分之一电子天平购于 O-HAUS 公司, BIO-RAD MODEL680 型酶标仪购于 BIO-RAD 公司, LD5-2A 常温离心机购于北京医用离心机厂, UV-260 型紫外 - 可见分光光度计购于 Shimadzu 公司, LDZX 型立式压力蒸汽灭菌器购于上海申安医疗器械厂, TL-2000MM-1 型微量振荡仪购于江苏天力医疗器械有限公司, SS01-01 型紫外线治疗仪购于上海西格玛技术有限公司, 紫外辐照计购于北京师范大学光电仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 DDB 对超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 的体外清除作用

试验原理: 邻苯三酚自氧化速率测定法即邻苯三酚本身无色, 其在碱性条件下, 可以自氧化成桔酚 (桔色), 加入抗氧化剂后可抑制其自氧化。在 320 nm 处检测邻苯三酚的吸光度值, 从而得到 DDB 对邻苯三酚自氧化的抑制率^[8]。

本实验采用维生素 C (VC) 作为阳性对照。DDB 和 VC 用 70% 乙醇分别配成浓度 0.4 mg/ml、0.8 mg/ml、1.2 mg/ml、1.6 mg/ml、2.0 mg/ml 和 2.4 mg/ml。

以 70% 乙醇校正零点, 在 320 nm 处测定吸光度值, 每个样品测 3 次, 按公式①计算超氧阴离子的清除率。 $Q(\%) = [A_0 - (A_s - A_i)] / A_0 \times 100\%$ ①。

1.2.2 MTT 法测定 DDB、UVB 对 HaCaT、FB 细胞生长的影响及 DDB 对 UVB 的防护作用

取对数生长期细胞接种于 96 孔培养板内, 每孔 100 μ l (含 1×10^4 个细胞), 置于 37℃, 5% 二氧化碳温箱中培养。24 h 后, 移除培养液, 加入 50 μ l MTT 溶液 (1 mg/ml, PBS 配置), 37℃ 孵育 4 h, 移除上清, 每孔加入 150 μ l DMSO 溶解甲管颗粒, 震荡溶解后, 用酶标仪检测 550 nm 条件处测其光密度值 (OD 值), 分别以不同浓度的 DDB 或者不同辐射剂量的 UVB 为实验组, 以溶剂对照组的细胞为对照组, 用公式②计算药物对细胞的抑制率, 并计算细胞存活率: 细胞存活率 = $100 - (\text{对照组 OD 值} - \text{加药组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$ ②, 每次实验重复 3 次。

取对数生长期的细胞同以上操作, 后用中波紫外线 (UVB) 段紫外光疗仪辐射 96 孔板中细胞, 辐射剂量 132 mJ/cm² (辐射密度 5.5 mW/cm², 辐射时间

240 s),辐射完成后,模型组每孔加入 100 ml DDB,对照组加入等量无血清 DMEM,培养 24 h,然后测量其 OD 值,同以上操作。

1.2.3 Giemsa 染色 ①收集及固定细胞,按上述方法处理好模型组和对照组后,用 0.25%的胰酶消化 HaCaT 细胞,收集细胞,短时低速离心(1 000 r/min, 5 min),弃上清,用 pH7.4 的 PBS 洗 2 次,离心(1 000 r/min, 5 min) 弃上清,以除去细胞悬液中的细胞碎片,每管加冷 70%乙醇 1 ml 固定,将细胞轻吹成单个细胞, -20℃过夜。②然后离心收集 HaCaT 细胞,用 PBS 冲洗 HaCaT 细胞 3 次,室温避光, Giemsa 染色应用液染色 10 min。通过 CHK 型光学显微镜观察, Olympus 数码相机照相。

1.2.4 激光共聚焦观察活性氧簇(ROS)及检测其荧光强度 取对数生长期 HaCaT 细胞,接种于直径 60 mm 平皿中(每孔放入 1 张圆形盖玻片),每孔加入 1 ml(10 000 个细胞) HaCaT 细胞悬液。24 h 后,给药组加入 DDB,对照组加入含 0.1% DMSO 的空白培养基。2 h 后,用 PBS 洗 2 遍,加入少许冷 PBS (500 μ l),置于 UVB 辐射(132 mJ/cm²),辐射完成后,立即加入 DCFH-DA(10 μ mol/L,二氯二氢荧光素双醋酸盐,免疫荧光染色剂) PBS 溶液。放入 37℃,二氧化碳培养箱中培养 30 min,通过激光共聚焦显微镜照相,通过荧光分光光度计检测其荧光强度。

1.3 统计学方法

采用 EXCEL 软件和 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。实验数据均用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组之间均数的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 五味子甲素衍生物 DDB 对 O₂⁻ 的清除能力

图 1 为 DDB (0.4~2.4 mg/ml) 和 VC (0.4~2.4 mg/ml) 对 O₂⁻ 的清除率。结果表明相同浓度 DDB 具有清除 O₂⁻ 的能力,其清除能力弱于 VC。经统计学分析可得出两者比较标准差为 11.005, $t = -6.566$, 查表 $P < 0.05$, 因此 VC 和 DDB 清除能力不同。

2.2 UVB 对 HaCaT、Fb 细胞的影响

UVB 对细胞增殖的影响比较明显。如图 2A 所示, 和无 UVB 辐射对照比较, UVB 辐射量 115.5 mJ/cm²、132 mJ/cm² 和 148.5 mJ/cm² 分别降低 HaCaT 细胞存活率到 (93 $\pm$ 1.460)%、(45 $\pm$ 4.526)% 和

(32 $\pm$ 2.673)% ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。如图 2B 所示降低 Fb 细胞存活率到 (80 $\pm$ 2.680)%、(72 $\pm$ 4.020)% 和 (66 $\pm$ 3.550)% ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性。由于本实验细胞凋亡情况不可以太大, 以辐射剂量 132 mJ/cm² 作为 UVB 细胞损伤模型辐射剂量。

2.3 五味子甲素衍生物 DDB 对 HaCaT、Fb 细胞生长的影响及其对 UVB 的防护作用

MTT 法结果显示, DDB (1 $\times 10^{-7}$ ~1 $\times 10^{-4}$ mol/L) HaCaT 细胞存活率分别为 (99 $\pm$ 8.219)%、(103 $\pm$ 3.550)%、(111 $\pm$ 7.496)% 和 (108 $\pm$ 4.020)%, 与正常

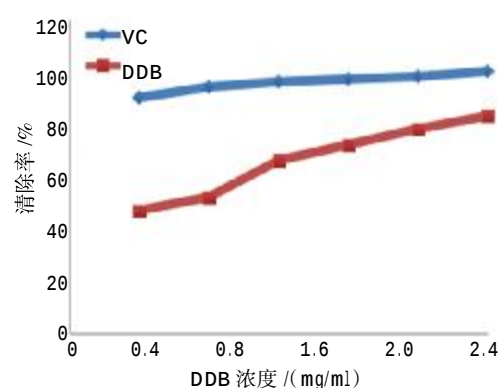
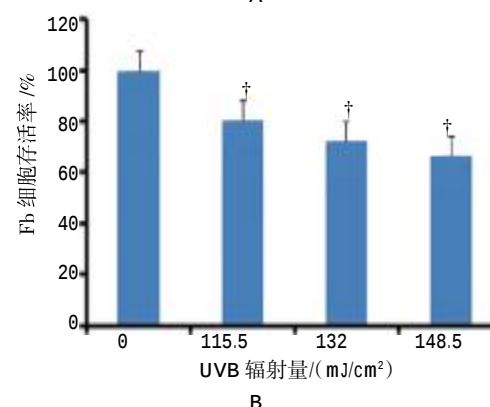
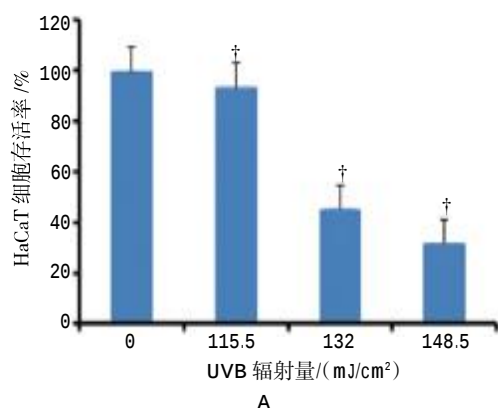
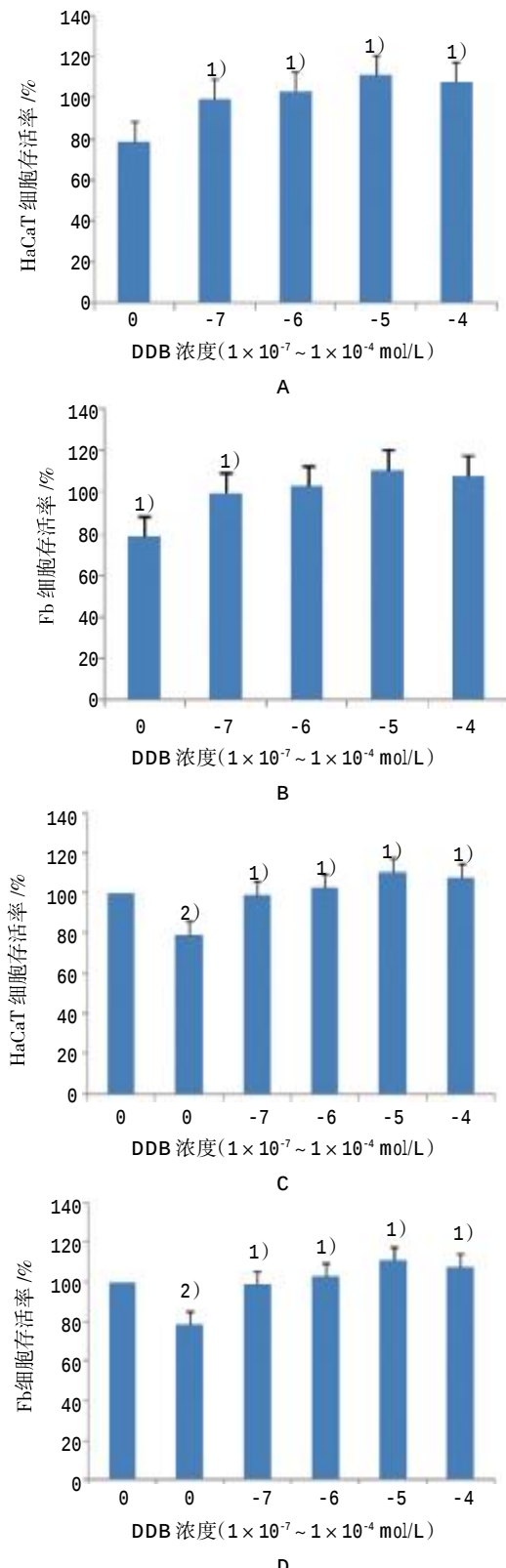


图 1 DDB 对 O₂⁻ 的清除率



† 与未使用 UVB 照射组比较, $P < 0.05$; A: UVB 辐射对 HaCaT 细胞增殖的影响; B: UVB 辐射对 Fb 细胞增殖的影响

图 2 UVB 对细胞增殖的影响



1) 给药组与 UVB 辐射组比较, $P < 0.05$; 2) UVB 辐射组与正常对照组比较, $P < 0.05$; A: DDB ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 对 HaCaT 细胞的影响; B: DDB ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 对 Fb 细胞的影响; C: DDB 对 UVB 辐射造成 HaCaT 细胞凋亡的影响; D: DDB 对 UVB 辐射造成 Fb 细胞凋亡的影响

图 3 DDB 对细胞生长的影响及其对 UVB 的防护作用

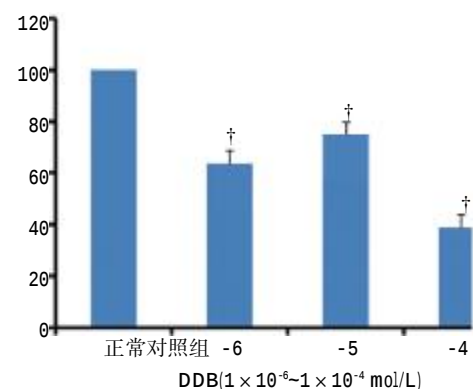
对照组 (79 ± 1.770)% 比较均有明显地增加, 如图 3A 示; DDB 浓度为 1×10^{-4} mol/L 时, Fb 细胞存活率为 (98 ± 4.640)%, 存活率有所降低但不明显, DDB 在 ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L) 浓度范围时, Fb 细胞存活率为 (110 ± 9.319)%、(104 ± 2.615)%、(104 ± 7.810)%, 与正常对照组比较有所增加, 结果如图 3B 所示。实验结果表明 DDB ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 对 HaCaT、Fb 细胞无毒性, 本次研究选择这个范围进行实验。DDB 对 UVB 的防护作用如图 3C 所示, UVB 辐射组 (77 ± 1.638)% 与正常对照组比较, UVB 辐射组显著性抑制了 HaCaT 细胞的活性; 给药组 DDB ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 给药后, 细胞存活率分别为 (90 ± 3.740)%、(102 ± 1.990)%、(104 ± 9.750)% 和 (118 ± 3.090)%, 与 UVB 辐射组比较显著提高。图 3D 所示, UVB 辐射组 (80 ± 2.100)% 与正常对照组比较, UVB 辐射显著地抑制了 Fb 细胞的活性; 给药组 DDB ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 给药后, 细胞存活率分别为 (100 ± 10.220)%、(102 ± 6.715)%、(110 ± 5.437)% 和 (101 ± 5.771)%, 与 UVB 辐射组比较显著提高。

2.4 五味子甲素衍生物 DDB 对人黑色素细胞黑色素生产的影响

采用酶标仪在 405 nm 测定其吸光度值, 间接反应出人黑色素细胞中黑色素生成量。从图 4 可以观察到 DDB ($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 给药组黑色素生成量分别为 (62 ± 1.870)%、(77 ± 0.981)% 和 (39 ± 1.090)%, 与正常人黑色素细胞组比较明显降低。

2.5 形态学观察五味子甲素衍生物 DDB 对 Ha-CaT 细胞的 UVB 防护作用

Giemsa 染色如图 5 所示 UVB 辐射后, 细胞产生凋亡, 如箭头所指凋亡细胞。DDB (10^{-7} mol/L) 给药



† 与正常对照组比较, $P < 0.05$

图 4 DDB ($1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 对人黑色素细胞产生黑色素的影响

后,凋亡明显被抑制。

2.6 五味子甲素衍生物 DDB 抑制 HaCaT 细胞外 ROS 的生成

本实验通过检测 HaCaT 细胞外总 ROS 水平,

评价 DDB 的抗氧化作用。如图 6 结果表明,UVB 辐射组(7.8 ± 0.940)与正常对照组(14 ± 0.790)比较,UVB 辐射显著性升高了 HaCaT 细胞外总 ROS 水平;给药组与 UVB 对照组比较,DDB(1×10^{-4})给药

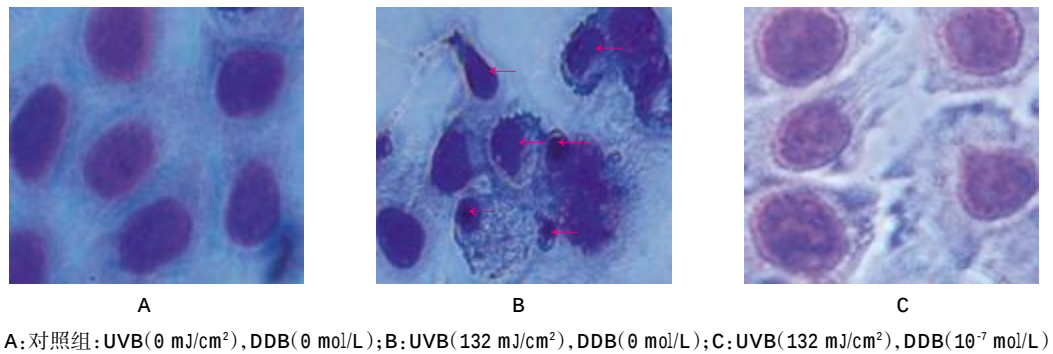


图 5 Giemsa 染色法观察 DDB 对 HaCaT 细胞的UVB 辐射的防护作用

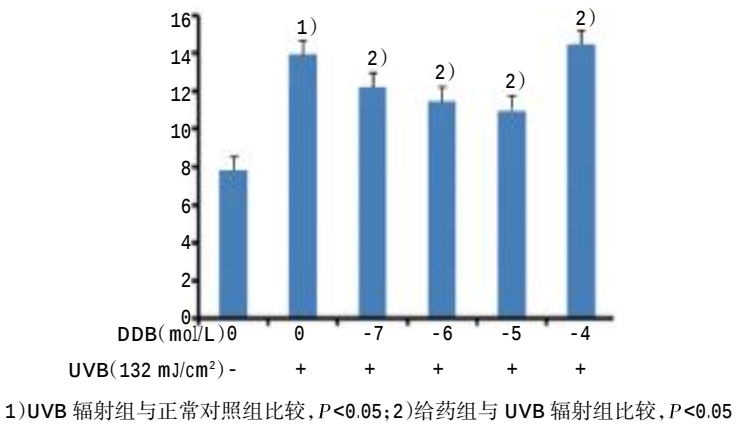
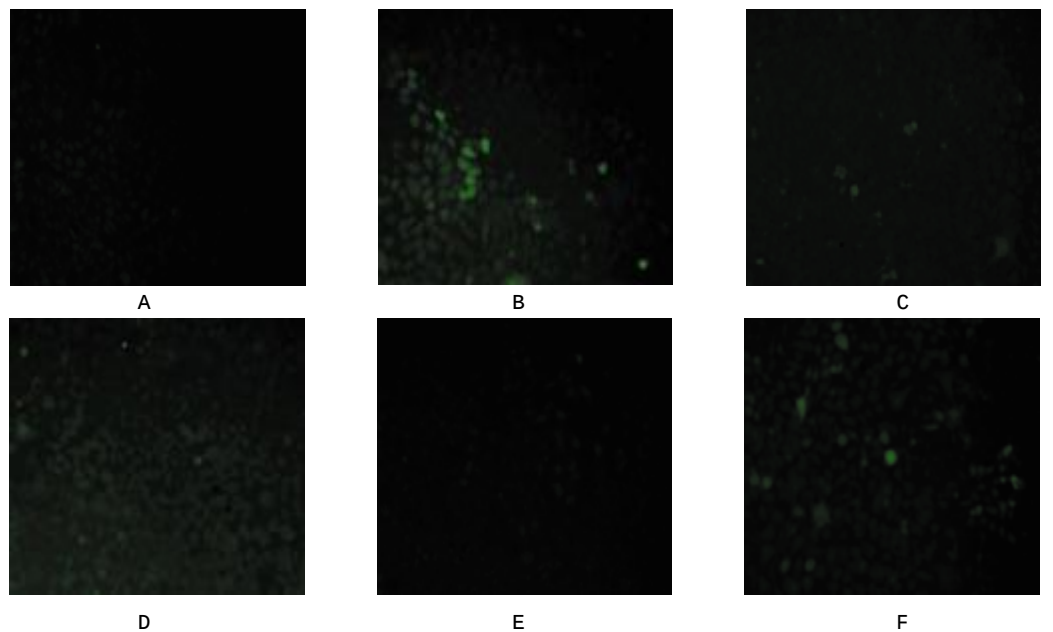


图 6 DDB 对 UVB辐射 HaCaT 细胞产生的 ROS 清除作用



A: 对照组:UVB(0 mJ/cm²),DDB(0 mol/L);B:UVB(132 mJ/cm²),DDB(0 mol/L);C:UVB(132 mJ/cm²),DDB(10⁻⁷ mol/L);D:UVB(132 mJ/cm²),DDB(10⁻⁶mol/L);E:UVB(132 mJ/cm²),DDB(10⁻⁵ mol/L);F:UVB(132 mJ/cm²),DDB(10⁻⁴ mol/L)

图 7 荧光法观察 DDB 对 UVB 辐射 HaCaT 细胞产生的 ROS 清除作用

(14 ± 0.540) 后, HaCaT 细胞外总 ROS 水平没有显著降低, DDB($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5}$ mol/L) 给药后, HaCaT 细胞外总 ROS 水平分别为 (12.1 ± 0.380)、(11.4 ± 0.840) 和 (10.8 ± 2.570), 与 UVB 对照组比较均显著性降低。如图 7 所示, 荧光法显示 ROS 产生量, UVB 辐射组(图 7B)较正常对照组(图 7A)明显增多, 而给药组(图 7C、D、E、F)较 UVB 辐射组减少。

3 讨论

经研究表明, 不同波段的紫外线, 只有中波紫外线到达地面的量最大, 而且它对人体的危害也最大。因此, 针对中波紫外线对人体造成的危害的机制及该如何预防和治疗的研究是目前重点。联苯双酯是五味子甲素的一种衍生物, 也是一种新型的药物, 是治疗病毒性肝炎和药物性肝损伤引起转氨酶升高的常用药物, 具有保护肝细胞, 增加肝脏的解毒功能的药理作用。文献研究表明五味子甲素、乙素及丙素对 H_2O_2 对造成细胞的氧化损伤均具有一定的保护作用^[9]。因此, 在本次试验研究中, 本实验对五味子甲素衍生物联苯双酯的抗氧化损伤进行了探索, 实验结果发现, 联苯双酯可以清除 O_2^- , 具有一定的抗氧化作用, 从而起到防护 UVB 的作用。

波长短能量较高的 UVB 主要作用于表皮, HaCaT 细胞占表皮细胞的 90% 以上, 是构成表皮的主要细胞, 可吸收辐射到皮肤的 UVB 的绝大部分; Fb 细胞是皮肤真皮中的主体细胞; 黑色素细胞是皮肤里的一种特殊细胞, 它产生黑色素, 传递给周围的 HaCaT 细胞, 皮肤颜色的深浅根本取决于黑色素的含量^[10]。因此本实验以 HaCaT、Fb 细胞为研究对象, 同时对 DDB 抑制黑色素细胞的作用进行了研究, 探讨 DDB 的抗 UVB 损伤的作用和 DDB 的美白效果。当 UVB 辐射剂量为 30 mJ/cm^2 、 60 mJ/cm^2 及 90 mJ/cm^2 时, HaCaT 细胞的抑制率分别为 3.86%、7.47% 及 11.67%^[11]。本文通过 MTT 法得到细胞 UVB 损伤模型最佳 UVB 辐射剂量为 132 mJ/cm^2 , HaCaT、Fb 细胞细胞抑制率分别为 55% 和 45%。在 DDB ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 浓度范围内, UVB 辐射对 HaCaT、Fb 细胞的损伤可以得到明显的抑制, 并且 DDB 可以抑制黑色素的产生。通过 Giemsa 染色形态学实验, 观察对 HaCaT 细胞的 UVB 防护作用, 直观的观察到了 DDB 的 UVB 防护作用。

氧化应激是指活性氧簇(ROS)产生的细胞毒性

反应。生命中 ROS 的有害影响和积累, 一直被认为是导致机体衰老的重要原因之一, 研究表明, ROS 生成增加和脂质过氧化损伤使线粒体衰老, 从而引起生命的衰老^[12]。本文通过激光共聚焦观察 HaCaT 细胞外总活性氧簇(ROS)的水平及检测其荧光强度, 可以观察到, DDB($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L) 可以显著抑制 UVB 辐射引起的细胞凋亡。

综上所述, 联苯双酯对 UVB 的防护作用的机制可能是通过抑制由 UVB 辐射引起皮肤氧化应激产生的 ROS 所产生的细胞毒性反应, 并且可抑制 UVB 辐射引起的细胞损伤, 因此联苯双酯可用于紫外线防护剂或者化妆品的开发应用。而联苯双酯对 UVB 的防护作用其他有可能的机制以及其应用于临床的效果还需进一步的研究。

参 考 文 献:

- [1] 林炳旺, 殷树梅. 联苯双酯的合成及应用[J]. 化工中间体, 2008, 14(7): 20-23.
- [2] 张国良, 李娜, 林黎琳, 等. 木脂素类化合物生物活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(20): 2089-2094.
- [3] MUKHERJEE P K, MAITY N, NEMA N K, et al. Bioactive compounds from natural resources against skin aging[J]. Phytomedicine, 2011, 19(1): 64-73.
- [4] SHINDO Y, WTTT E, HAN D, et al. Enzymatic and non-enzymatic antioxidants in epidermis and dermis of human skin [J]. J Invest Dermatol, 1994, 10(2): 122-124.
- [5] BRIQANTI S, WLASCHEK M, HINRICHS C, et al. Small molecular antioxidants effectively protect from PUVA-induced oxidative stress responses underlying fibroblast senescence and photoaging[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45(5): 636-644.
- [6] 路婷婷, 陈亚泽, 卢涛, 等. 紫外线的皮肤损伤机制及具有紫外线防护作用的天然产物的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(12): 1655-1659.
- [7] 曹波, 牛聪, 卢涛, 等. 五味子乙素对 UVB 辐射诱导 HaCat 细胞凋亡的抑制作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 523-527.
- [8] 洪宗国, 易筠, 王东. 蕲艾总鞣酸对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除作用[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2010, 29(4): 50-53.
- [9] 艾军, 王振兴, 秦红艳, 等. 我国五味子研究现状及展望[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(10): 14-20.
- [10] NAKAJIMA M, SHINODA I, FUKUWATARI Y, et al. Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanisms other than the induction of tyrosinase activity[J]. Pigment Cell Res, 1998, 11(1): 12-17.
- [11] 王晶晶, 车雅敏, 刘原君, 等. 中波紫外线对角质形成细胞 MMP-1 及 TIMP-1 的影响[J]. 皮肤性病诊疗学杂志, 2012, 19(2): 61-64.
- [12] 王平远, 高丽, 许豪文. 运动及衰老过程中线粒体 ROS 机制的探讨. 山东体育学院学报, 2003, 19(2): 36-39.

(张蕾 编辑)