

- Stroke, 2007, 38(8): 2241-2246.
- [12] Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action[J]. Am J Physiol, 1992, 263: C1-C16.
- [13] 李娟, 刘敬霞, 吴鹏, 等. 扎里奴思方对急性脑梗死患者血清 NSE 水平的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(7): 1750-1751.
- [14] 李娟, 吴鹏, 刘敬霞, 等. 扎里奴思方对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠 P-糖蛋白的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5): 1319-1321.
- [15] 刘抒雯, 刘敬霞, 刘超, 等. 扎里奴思方对痰瘀互结型脑缺血再灌注大鼠血液流变学、血脂及自由基代谢的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(5): 884-890.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

滚针结合左旋维 C 对小鼠老化皮肤超微结构的影响

金红梅, 柏亚萍

浙江中医药大学附属第三医院, 浙江 杭州 310009

[摘要] 目的: 观察分析滚针疗法结合左旋维生素 C 对于小鼠老化皮肤超微结构影响, 探讨滚针疗法结合外用药物治疗皮肤老化的可能作用机制。方法: 3 月龄昆明种雌性小鼠 50 只, 采用随机数字法将小鼠分为正常对照组、模型组、滚针治疗组、滚针加维 C 治疗组、维 C 治疗组, 各 10 只。除正常对照组外, 其余各组颈背部连续皮下注射 D-半乳糖, 短波紫外线灯、金属钨灯照射背部皮肤, 建立亚急性皮肤老化模型。观察分析老化皮肤超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA) 以及皮肤总羟脯氨酸含量等与衰老相关的生化指标及组织病理学变化。结果: 治疗前, 与正常对照组比较, 其他各组的 SOD 含量和总羟脯氨酸水平显著降低, MDA 显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与同组治疗前比较, 滚针治疗组、维 C 治疗组、滚针加维 C 组的 SOD 和总羟脯氨酸水平显著升高, MDA 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗后, 滚针治疗组、维 C 治疗组、滚针加维 C 组的 SOD 含量和总羟脯氨酸水平显著高于模型组, MDA 含量显著低于模型组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 滚针加维 C 组的 SOD 含量和总羟脯氨酸水平显著高于滚针治疗组和维 C 治疗组, MDA 含量显著低于滚针治疗组和维 C 治疗组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 滚针疗法结合外用抗氧化药物能够改善小鼠老化皮肤超微结构, 升高 SOD 和总羟脯氨酸水平, 降低 MDA 水平, 为滚针疗法联合外用药物防治皮肤老化提供了理论基础。

[关键词] 衰老皮肤; 滚针疗法; 左旋维 C; 超微结构; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R-33; R339.3+8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 02-0019-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.02.006

Effect of Needle Roller Combined with L-ascorbic Acid on Ultrastructure of Aging Skin of Mice

JIN Hongmei, BAI Yaping

Abstract: Objective: To observe the effect of needle roller combined with L-ascorbic acid on ultrastructure of aging skin of mice, and to explore possible mechanism of the therapy of needle roller combined with external drug for skin aging. Methods: Divided 50 cases of three-month old female Kunming mice into normal control group, model group, needle roller treatment group, needle roller plus vitamin C (VC) treatment group, and VC treatment group randomly, 10 cases in each group. Except normal control group, other groups were all given subcutaneous injection of D-galactose on the dorsal and cervical skin continuously, and were given irradiation of short wave ultraviolet lamp and tungsten lamp on the dorsal skin to establish the model of subacute skin aging. Observed and analyzed the activity of superoxide dismutase (SOD), the total content of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline, and some other

[收稿日期] 2016-08-12

[基金项目] 浙江省教育厅科研项目 (Y200907547)

[作者简介] 金红梅 (1981-), 女, 主治中医师, 研究方向: 皮肤病及性病的中医治疗。

[通讯作者] 柏亚萍, E-mail: 1132242878@qq.com。

aging-related biochemical indexes as well as histopathological changes of the tissue. Results: Before treatment, comparing with those in normal control group, SOD contents and hydroxyproline levels in other groups were obviously reduced, and MDA levels were increased, differences being significant ($P < 0.05$). Comparing with those before treatment in same groups, SOD contents and hydroxyproline levels in needle roller treatment group, VC treatment group, and needle roller plus VC treatment group were obviously raised, and MDA levels were decreased significantly ($P < 0.05$). After treatment, in needle roller treatment group, VC treatment group, and needle roller plus VC treatment group, SOD contents and hydroxyproline levels were evidently higher than those in model group, and MDA levels were significantly lower than those in model group, showing significance in differences ($P < 0.05$). In needle roller plus VC treatment group, SOD content and hydroxyproline levels were obviously higher than those in needle roller treatment group and VC treatment group, and MDA levels was evidently lower than those in needle roller treatment group and VC treatment group. Conclusion: Needle roller therapy combined with external antioxidants can improve ultrastructure of aging skin of mice, increase SOD content and hydroxyproline levels, and reduce MDA levels. It provide theoretical foundation for needle roller therapy combined with external drug for skin aging.

Keywords: Aging skin; Needle roller therapy; L-ascorbic acid; Ultrastructure; Animal experiment; Mice

滚针疗法是针灸疗法的改良与延伸,在皮肤老化的非创伤性临床治疗中有较为广泛的应用,且证实其对皮肤衰老症状的改善效果良好,操作简单,但是滚针疗法对衰老皮肤可能的作用机制的研究国内外的相关报道甚少,在国内的研究尚属空白^[1-2]。本文通过观察滚针疗法结合外用左旋维生素C对于老化皮肤超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)以及皮肤总羟脯氨酸含量等与衰老相关的生化指标及组织病理学变化的影响,探讨滚针疗法结合外用药物治疗皮肤老化可能的作用机制,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物分组与模型建立 3月龄昆明种雌性小鼠50只,清洁级,平均体质量(30.4 ± 2.8)g,由浙江中医药大学动物实验室提供,实验动物合格证号:2008001615745,标准饲料饲养。动物实验通过了本院医学伦理委员会的审批。采用随机数字法将小鼠分为正常对照组、模型组、滚针治疗组、滚针加维C治疗组、维C治疗组,各10只。除正常对照组外,其余各组给与颈背部D-半乳糖连续皮下注射,短波紫外线灯、金属钨灯照射背部皮肤,建立亚急性皮肤老化模型^[3]。老化皮肤在外观上表现为皮肤松弛,出现了细小的皱纹,同时皮肤干燥、脱屑,脆性增加;在毛发方面表现为毛发数量减少,毛发变细,呈灰白色;在组织学方面,可表现为表皮变薄,真皮连接处变平,弹性纤维增多,增粗,排列紊乱,而胶原纤维减少,血管屈曲扩张、管壁增厚,可伴有毛囊扩张、皮脂腺萎缩等。

1.2 仪器和试剂 微针滚轮、短波紫外线灯和金属钨灯、密封罐、固定架、手动匀浆器、离心机、光学显微镜、电子显微镜。左旋维生素C(美国伊珊);HE染色剂(购自南京凯基生物有限公司);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所);丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所);

15% Na₂S 水溶液(上海凌峰化学试剂有限公司);D-半乳糖(上海试剂二厂);羟脯氨酸(中国科学院上海生物化学研究所);甲醛、蒸馏水由浙江中医药大学附属第三医院提供。

1.3 治疗方法 滚针治疗组在小鼠背部正中选取2 cm × 2 cm皮肤剪毛,在密封罐中用乙醚麻醉,昏迷后取出在小鼠固定架上捆绑,选用台湾美康生物科技公司生产的微针滚轮,规格为0.2 mm × 0.2 mm,在剪毛区域滚动直刺深约0.1 mm左右,刺入层次在真皮上,至局部潮红充血为度,然后放开令其自由活动,每天1次,10天为1个疗程,疗程间休息1天,共进行2个疗程,第2疗程结束后继续饲养5天,不加任何处理。滚针加维C治疗组在滚针治疗前于小鼠背部皮肤涂抹左旋维生素C(L-Vitc)约0.1 mL,余治疗同滚针治疗组。维C治疗组直接于小鼠背部皮肤涂抹L-Vitc约0.1 mL,每天1次,10天为1个疗程,疗程间休息1天,共进行2个疗程,第2疗程结束后继续饲养5天,不加任何处理。模型组、正常对照组同区域剪毛,麻醉和捆绑2~3 min每天。

1.4 取材方法 经治疗后,用15% Na₂S在所有小鼠背部剪毛区脱毛,取皮肤全层,约0.5 mm × 0.5 mm大小,迅速放入10%中性甲醛液固定做组织切片,进行组织形态学观察分析;另取剩余实验部位皮肤迅速-20℃冰冻保存,匀浆测皮肤SOD、MDA和总羟脯氨酸含量。

1.5 观察指标 治疗前、治疗2疗程后分别对5组小鼠皮肤组织匀浆测定超氧化物歧化酶(SOD)活力(用黄嘌呤氧化酶法测定)、丙二醛(MDA)(硫代巴比妥比色法测定)以及皮肤总羟脯氨酸含量(分光光度法),电镜下观察比较各组小鼠皮肤治疗前后表皮、真皮厚度,弹力纤维面积等组织形态学的变化

1.6 统计学方法 数据均用SPSS17.0统计分析软件包进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,两独立数据比较采用t检验,多组间样本均数的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 电镜观察 与正常对照组比较,模型组小鼠老化皮肤成纤维细胞线粒体出现明显的肿胀膜性结构,胶原纤维分布不均,内质网扩张,周期性横纹消失,横断面见胶原纤维排列交叉紊乱,直径不均。治疗2疗程后,滚针组与维C治疗组成纤维细胞增生明显,胶原纤维增多,粗面内质网丰富,周期性横纹较为清晰;滚针加维C组成纤维细胞增生活跃,趋于正常,粗面内质网减少,胶原纤维分布丰富,周期性横纹清晰。

2.2 各组小鼠皮肤 SOD 含量比较 见表1。治疗前,与正常对照组比较,其他各组的 SOD 显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与同组治疗前比较,滚针治疗组、维C治疗组、滚针加维C组的 SOD 显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后,滚针治疗组、维C治疗组、滚针加维C组的 SOD 含量显著高于模型组,滚针加维C组的 SOD 含量显著高于滚针治疗组和维C治疗组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠皮肤 MDA 含量比较 见表2。治疗前,与正常对照组比较,其他各组的 MDA 显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与同组治疗前比较,滚针治疗组、维C治疗组、滚针加维C组的 MDA 显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后,滚针治疗组、维C治疗组、滚针加维C组的 MDA 含量显著低于模型组,滚针加维C组的 MDA 含量显著低于滚针治疗组和维C治疗组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 各组小鼠皮肤 SOD 含量比较($\bar{x} \pm s$) u/mL

组别	n	治疗前	治疗后
正常对照组	10	190.1± 3.15	188.7± 3.38
模型组	10	93.8± 3.74 ^①	96.0± 3.89
滚针治疗组	10	92.5± 3.23 ^①	135.8± 2.99 ^{②⑤}
维C治疗组	10	92.4± 3.86 ^①	129.3± 3.21 ^{②⑤}
滚针加维C组	10	93.0± 3.73 ^①	167.3± 3.41 ^{②③④⑤}

与正常对照组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与滚针治疗组比较,③ $P < 0.05$;与维C治疗组比较,④ $P < 0.05$;与同组治疗前比较,⑤ $P < 0.05$

表2 各组小鼠皮肤 MDA含量比较($\bar{x} \pm s$) nmol/mL

组别	n	治疗前	治疗后
正常对照组	10	0.704± 0.068	0.713± 0.059
模型组	10	2.451± 0.120 ^①	2.436± 0.110
滚针治疗组	10	2.449± 0.150 ^①	1.208± 0.069 ^{②⑤}
维C治疗组	10	2.446± 0.170 ^①	1.158± 0.088 ^{②⑤}
滚针加维C组	10	2.435± 0.200 ^①	0.896± 0.065 ^{②③④⑤}

与正常对照组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与滚针治疗组比较,③ $P < 0.05$;与维C治疗组比较,④ $P < 0.05$;与同组治疗前比较,⑤ $P < 0.05$

2.4 各组小鼠皮肤总羟脯氨酸水平比较 见表3。治疗前,与正常对照组比较,其他各组的总羟脯氨酸水平显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与同组治疗前比较,滚针治疗组、维C治疗组、滚针加维C组的总羟脯氨酸水平显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后,滚针治疗组、维C治疗组、滚针加维C组的总羟脯氨酸水平显著高于模型组,滚针加维C组的总羟脯氨酸水平显著高于滚针治疗组和维C治疗组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表3 各组小鼠皮肤总羟脯氨酸水平比较($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g/mL}$

组别	n	治疗前	治疗后
正常对照组	10	7.235± 1.01	7.228± 1.03
模型组	10	6.581± 1.03 ^①	6.587± 1.12
滚针治疗组	10	6.604± 1.21 ^①	6.854± 1.18 ^{②⑤}
维C治疗组	10	6.611± 1.42 ^①	6.805± 1.44 ^{②⑤}
滚针加维C组	10	6.592± 1.43 ^①	7.110± 1.28 ^{②③④⑤}

与正常对照组比较,① $P < 0.05$;与模型组比较,② $P < 0.05$;与滚针治疗组比较,③ $P < 0.05$;与维C治疗组比较,④ $P < 0.05$;与同组治疗前比较,⑤ $P < 0.05$

3 讨论

在现代美容医学无创和微创技术的发展中,近年来出现的以滚针为原型的治疗手段——中胚层疗法(Mesotherapy)倍受世界同行的关注,并引起了求美者的注意^[4]。中胚层疗法是使用一种特殊、轻巧、快速、稳定的注射枪将某种药物或材料注入皮下,可以刺激胶原蛋白增生,使真皮层增厚,改善皮肤质量,使颜面皮肤活化、年轻化,并能预防皮肤老化^[5],其注射的深度多在真皮层,它并不要求按经络走行及穴位定位,而是根据患者具体情况将治疗药物埋入中胚层。中胚层疗法从其理论基础及操作方法上都可以说是传统中医针刺法的延伸和发展,不同的是传统针刺法注重经络的走行及穴位定位,但其具体深度及解剖位置含糊,由操作医生根据个人经验决定,以患者有酸、麻、胀感为度,通常刺入0.5~1.5寸,达真皮层或真皮下层,而滚针疗法是针刺的改良与延伸^[6],它集多种方法、多种效应于一体,尤其是在皮肤美容抗衰、体型塑造、脱发及一些皮肤病的治疗上有着广阔的发展前景,滚针疗法是针灸特色疗法之一,源于皮肤针疗法,也是由古代《内经》中半刺、毛刺等针法发展而来^[7]。

滚针疗法为多针浅刺,其刺激作用部位为皮部,具有操作简便、刺激面积较大、安全、治疗适应范围广、疗效较好的特点,其作用部位在人体皮部,通过皮部-络脉-经脉-腑-脏的途径有效调节人体脏腑的气血阴阳,防治疾病。维生素C是临床常用的抗氧化剂,有清除自由基、促进胶原蛋白合成、修复损伤细胞、中和毒素、减少色素形成、提高皮肤免疫力等作用,但维生素C理化性质极不稳定,易氧化变色,溶于水,且皮肤难以吸收,左旋维生素C(L-Ascorbic Acid)是唯一可直

接被人体肌肤所吸收的维生素 C 形式^④，具有很强的渗透力及抗氧化稳定性，具亲油性、亲脂性双重特性，能促进胶原蛋白合成、淡化黑色素、抗衰老，因此近年来被广泛的应用于皮肤美容领域。无论是滚针疗法还是维生素 C 的应用，临床上证实其能很好地改善皮肤衰老的症状，并且以其疗效好、操作简便、经济价廉而倍受欢迎，且迎合了现代美容医学对无创和微创的要求，但是，对于皮肤老化防治的疗效作用判定多仅限于外观形态观察，缺乏有力的证据说明其疗效。

自由基作为人体垃圾，能够促使某些疾病的发生和机体的衰老。SOD 具有特殊的生理活性，是生物体内清除自由基的首要物质，它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害，并及时修复受损细胞。另一方面，自由基可氧化细胞内脂质形成脂质过氧化物，分解产物 MDA 为交联剂，容易使真皮结构发生交联，使真皮纤维紊乱、增粗，从而使皮肤出现老化状态。总羟脯氨酸是胶原蛋白的成分之一，胶原蛋白减少可导致支撑皮肤的胶原肽链和弹力网断裂，其螺旋网状结构被破坏，皮肤组织出现萎缩、干燥、皱纹、松弛无弹性等老化现象。所以，SOD 减少，MDA 增加及总羟脯氨酸减少都能在一定程度上反应皮肤老化的状态。

采用滚针疗法联合外用左旋维生素 C 的治疗方法干预皮肤老化小鼠模型，结果显示治疗 20 天后，电镜下亚急性皮肤衰老的成纤维细胞、胶原纤维、内质网等维度有明显的改善，而生化指标也较模型对照组在 SOD、MDA、总羟脯氨酸等指标有明显恢复，且较单一应用效果更佳，为滚针疗法联合外用药物防治皮肤老化提供了理论基础。

[参考文献]

[1] 阴春霞, 贾云霄, 曹阳, 等. 绝经后应用激素替代疗法

延缓皮肤老化的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(2): 566-568.

[2] 周双琳, 张聪, 林殷, 等. 埋线疗法对衰老大鼠皮肤胶原组织作用效应的研究[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(7): 2185-2188.

[3] Hasegawa M, Matsushita Y, Horikawa M, et al. A novel inhibitor of Smad-dependent transcriptional activation suppresses tissue fibrosis in mouse models of systemic sclerosis [J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60 (11): 3465-3475.

[4] Jadotte YT, Schwartz RA. Melasma: insights and perspectives[J]. *Acta Dermatovenerol Croat*, 2010, 18(2): 124.

[5] 葛明盖, 党永岩, 顾军. IPL 照射对皮肤结构和胶原蛋白表达影响的实验研究[J]. 应用激光, 2012, 32(3): 261-264.

[6] Imokawa G. Recent advances in characterizing biological mechanisms underlying UV-induced wrinkles: A pivotal role of fibroblast-derived elastase[J]. *Arch Dermatol Res*, 2008, 300(1): S7-S20.

[7] 李林, 瞿小婷, 陆阳. 植物雌激素的筛选及抗皮肤老化的体外研究[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2011, 31(10): 1361-1365.

[8] 石潇, 陈炜. 反复紫外线照射建立皮肤光老化模型[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(20): 5046-5048.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

欢迎邮购 2012 年、2013 年、2014 年 《新中医》
合订本，每年 230 元，3 年 690 元