

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.19.008

绞股蓝总皂苷对光老化人皮肤成纤维细胞凋亡及 Caspase-3 信号通路的影响

王 洁¹ 何振兴² 赵菊花¹ 李 达¹ 李 燃¹ 杨 羽¹

(1 南充市中心医院皮肤科 四川 南充 637000; 2 南充市中心医院肝胆外科 四川 南充 637000)

摘要 目的:探讨绞股蓝总皂苷(Gyp)对光老化人皮肤成纤维细胞(HSF 细胞)凋亡以及 Caspase-3 信号通路的影响。方法:分别以 80、160、320 mg/d 剂量的 Gyp 生理盐水溶液灌胃大鼠 7d 后取血并分离血清,长波紫外线(UVA)照射方法(照射剂量 36 J/cm³)构建光老化 HSF 细胞模型以得到低剂量组、中剂量组、高剂量组,同时以空白对照组(未照射细胞)、UVA 模型组、正常组为对照。UVA 诱导的细胞活性氧表达采用二氯荧光素(DCF)法测定,细胞凋亡情况采用 TUNEL 法测定,HSF 细胞活性采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)测定,Bax、Bcl-2、Caspase-3 基因和蛋白表达分别采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和 Western-blotting 方法进行测定。结果:与空白对照组比较,其余 5 组的 OD 值、HSF 细胞凋亡数、活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平、Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平差异具有统计学意义($P<0.05$);与 UVA 模型组和正常组比较,低、中、高剂量组 OD 值、HSF 细胞凋亡数、活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平、Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 及蛋白表达水平差异具有统计学意义($P<0.05$);低、中、高剂量组随着剂量增加 OD 值、Bcl-2mRNA 和蛋白表达水平逐渐升高,细胞凋亡数、活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平、Bax、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平逐渐降低($P<0.05$)。结论:Gyp 通过抑制细胞内活性氧的产生以及 Bax 的表达,以及激活 Bcl-2、Caspase-3 信号通路而逆转 UVA 诱导的 HSF 细胞凋亡,进而延缓 HSF 细胞的光老化现象。

关键词:绞股蓝总皂苷;光老化;皮肤成纤维细胞;凋亡;Caspase-3;信号通路

中图分类号:R-33;R322.99;R758.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)19-3632-04

The Effect of Gypenosides on Cell Apoptosis and Caspase-3 Signaling Pathway in Human Skin Fibroblasts

WANG Jie¹, HE Zhen-xing², ZHAO Ju-hua¹, LI Da¹, LI Ran¹, YANG Yu¹

(1 Department of Dermatology, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan, 637000, China;

2 Department of Hepatobiliary Surgery, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan, 637000, China)

ABSTRACT Objective: To explore the influence of gypenosides (Gyp) on cell apoptosis and Caspase-3 signaling pathway in photo-aging human skin fibroblasts (HSF cell). **Methods:** Blood samples of rats gavaged to Gyp saline solution with 80, 160, 320 mg/d respectively after 7 days were taken, and the serum was isolated. The photo-aging HSF cell model were established by the long-wave ultraviolet(UVA)(irradiation dose 36 J/cm³), which were divided into Low-dose group, Middle-dose group and High-dose group, and the blank control group (without irradiated cells), UVA model group, Normal group were selected as control group. The activity of reactive oxygen species induced by UVA was determined by the dichlorofluorescein (DCF) method, the cell apoptosis was measured by the TUNEL method, the activity of HSF cells was determined by the MTT method, the gene and protein expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 were detected by the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western-blotting respectively. **Results:** The OD value, HSF cell apoptosis number, the reactive oxygen species(average fluorescence intensity), reactive oxygen species levels, mRNA and protein expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in the other 5 groups compared with blank control group, the differences were statistically significant ($P<0.05$); The OD value, HSF cell apoptosis number, the reactive oxygen species (average fluorescence intensity), reactive oxygen species levels, mRNA and protein expression of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in Low, Middle, High-dose group compared with UVA model group and Normal group, the differences were statistically significant ($P<0.05$); Low, medium and high -dose group increased with the dose of OD value, mRNA and protein expression of Bcl-2 increased gradually, HSF cell apoptosis number, the reactive oxygen species (average fluorescence intensity), reactive oxygen species levels, mRNA and protein expression of Bax and Caspase-3 decreased gradually ($P<0.05$). **Conclusion:** Gyp can delay the aging of HSF cell by reversing HSF cell apoptosis induced by UVA, the possible mechanism is inhibition of the production of intracellular reactive oxygen species and expression of Bax, and activation of Bcl-2, Caspase-3 signaling pathway.

Key words: Gypenosides; Photo-aging; Human skin fibroblasts cell; Apoptosis; Caspase-3; Signaling pathway

作者简介:王洁(1983-),女,本科,主治医师,从事皮肤美容方面的研究,E-mail:hsywhid@163.com

(收稿日期:2017-03-16 接受日期:2017-04-05)

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R322.99; R758.1 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2017)19-3632-04

前言

皮肤光老化是指皮肤因急性大剂量或者长期日光照射而出现的损伤和衰老,其发病机制中主要涉及细胞遗传基因的调控^[1,2]。研究表明^[3],细胞凋亡在皮肤生理稳态的维持以及皮肤的发育过程中起关键作用,同时细胞凋亡过多也是一些皮肤性疾病的重要特征。长波紫外线(ultraviolet, UVA)照射皮肤后可在人体细胞内形成大量的活性氧,引起皮肤的光损伤,而活性氧过量会激活细胞的氧化应激反应,并产生细胞凋亡转录因子而导致细胞凋亡^[4]。人皮肤成纤维细胞(human skin fibroblasts, HSF)是组成皮肤真皮层的关键成分,研究显示^[5],UVA可诱导HSF细胞凋亡,当人体皮肤细胞受到严重的UVA照射,会出现明显的氧化应激反应和细胞凋亡。修复经UVA辐射的受损细胞,可抑制细胞的凋亡,进而延缓光老化现象^[6]。我国中医学博大精深,在延缓皮肤的光老化方面具有独特优势。研究发现^[7],绞股蓝明显影响细胞凋亡,而绞股蓝总皂苷(Gypenosides, Gyp)则具有自由基清除作用和抗氧化效果。本研究旨在探讨Gyp对光老化HSF细胞凋亡以及Caspase-3信号通路的影响,以揭示其对光老化现象的作用机制。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

1.1.1 实验动物 中国医科大学实验动物中心提供20只健康雄性SPF级SD大鼠(许可证号:SCXK(辽)2008-0005),大鼠体重均匀,平均(210.8±15.5)g,喂养常规颗粒饲料并自由饮水。

1.1.2 主要设备 常州国华仪器设备厂提供SHA-B型电热恒温振荡器,美国Alphainnotech Chemi Imager提供ChemiImager5500型凝胶成像分析系统,奥地利Anthos公司提供antho2010型酶标仪,北京六一仪器设备厂提供EPS300电泳仪、DYY40B转印电泳槽、PCR仪和WD-9405B型水平摇床,南京华强电子有限公司提供20W的UVA光源,美国Bio-Rad公司提供Mini-Protein III型垂直板电泳装置。

1.1.3 实验试剂 成都曼斯特生物科技有限公司提供Gyp(生产批号:MUST-11031401),上海艾研生物科技有限公司提供HSF细胞,碧云天生物科技有限公司提供BCA法蛋白定量试剂盒(生产批号:P0012S)、细胞蛋白提取试剂(生产批号:P0013)和ECL发光液(生产批号:P0018);南京凯基生物科技发展有限公司提供TUNEL细胞凋亡原位检测试剂盒(生产批号:KGA7071),北京博奥森生物技术有限公司提供兔抗人Bax、Bcl-2抗体、HRP标记羊抗兔二抗以及内参β-actin抗体,北京三博远志生物科技有限公司合成Bax、Bcl-2和内参GAPDH引物,其中Bax上游的引物序列:5'-AAGCTGAGC-GAGTGTCTCAAG-3',Bax下游的引物序列:5'-CAAAGTA-GAAAAGGGCGACAAC-3',产物的大小为178bp;Bcl-2上游的引物序列:5'-ATGTGTGTGGAGAGCGTCAAC-3',Bcl-2下游的引物序列:5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAAC-3',产物的大小为180bp;内参GAPDH上游的引物序列:5'-GTCAGTG-

GTGGACCTGACCT-3',内参GAPDH下游的引物序列:5'-AG-GGGTCTACATGGCAACTG-3',产物的大小为420bp。

1.2 实验方法

1.2.1 制备含药血清 按照随机数字表法将20只SD大鼠分为正常血清组、低剂量含药血清组、中剂量含药血清组、高剂量含药血清组各5只,并依据Meeh-Rubner公式^[8]推算每只大鼠给药量80mg/d左右,并以80mg/d定义为低剂量大鼠给药,即80mg/d、160mg/d、320mg/d分别为低剂量、中剂量、高剂量含药血清组大鼠给药剂量。在0.9%的氯化钠溶液中混合溶解Gyp,对大鼠进行灌胃,一天1次,连续灌胃七天后收集大鼠主动脉血液置于促凝管中,并在27℃环境下静置1h,以1200r/min的速度离心10min后留取上清液,将各组收集得到的上清液置于50mL的离心管中,并置于56℃的水浴中进行灭活,然后0.22μm进行过滤灭菌,将得到的样品冻存备用。

1.2.2 复制光老化模型、实验分组及含药血清干预 在DMEM培养基中加入1%的双抗和含10%的胎牛血清,在体积分数为5%二氧化碳、37℃的环境中进行HSF培养,第二天采用2.5g/L的胰酶消化传代。以2.5g/L的胰酶消化对数生长期的细胞后加入到新鲜的培养液中制作成为细胞悬液,再以1×10⁴/mL接种到25cm²的培养瓶中,5mL/瓶,合计接种30瓶,从中随机选取5瓶作为空白对照组,不施加任何干预。其余的25瓶在体积分数为5%二氧化碳、37℃的培养箱中培养48h,将旧培养液舍去,以磷酸盐缓冲液(PBS)连续清洗,直至PBS无色,然后加入PBS共计2000μL,并以光源为UVA 365nm的灯管照射,紫外线辐照计测量照射强度,照射剂量(J/cm²)=照射时间(s)×照射强度(W/cm²),照射剂量最终为36J/cm²。将25瓶根据不同的干预方法随机分为UVA模型组、正常组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组5瓶。所有组HSF细胞在UVA照射后弃去PBS,在UVA模型组中加入5mL的新鲜培养液连续培养12h,正常组加入5mL含有10%正常大鼠血清的新鲜培养液连续培养12h,低剂量、中剂量、高剂量组则分别加入含有10%低、中、高剂量大鼠含药血清的新鲜培养液5mL培养12h。

1.3 检测指标

1.3.1 MTT法测定HSF细胞活性 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)对HSF细胞活性进行测定,波长为490nm处,在酶联免疫检测仪中测定光密度值(OD值)。

1.3.2 TUNEL法检测细胞凋亡 采用TUNEL法检测各组的细胞凋亡情况,操作过程严格按照TUNEL法检测试剂盒上说明进行,采用FITC标记细胞后在荧光显微镜下观察形态,每张爬片均选取5个染色良好的视野计数凋亡细胞数量,凋亡细胞数为5个视野细胞凋亡均数。

1.3.3 二氯荧光素(DCF)法检测UVA诱导的细胞活性氧表达 采用DCF法对UVA诱导的细胞活性氧表达进行检测,以96孔板接种细胞,每孔接种的细胞数为1.5万,接种24h后采用含糖Earle's液清洗,共洗2遍,在浓度为25μmol/L的二氯二氢荧光素-乙醚乙酸酯(DCFH-DA)培养箱中孵育,30min后

采用含糖 Earle's 液清洗,共洗 2 遍。最后采用酶标仪对荧光强度进行测定。

1.3.4 RT-PCR 法检测细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 和蛋白的表达 采用反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 对细胞中的 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达情况进行检测,在凝胶成像系统中采集 PCR 产物经凝胶电泳后的图像,目的基因与内参基因的条带积分光密度值比值表示 mRNA 表达水平;采用 Western blot 法对 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达水平进行检测,对兔抗人 Bax、Bcl-2 一抗稀释 50 倍,对 HRP 标记的羊抗兔二抗稀释 200 倍,ECL 发光试剂盒检测,图像分析系统分析,目的蛋白与内参条带灰度值比值表示蛋白表达水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS19.0 软件录入数据及统计分析,定量资料的描述以($\bar{x} \pm s$)表示,多组独立样本采用方差分析进行比较,LSD-t

检验进行两两比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HSF 细胞增殖活性、活性氧水平比较

6 组 HSF 细胞的 OD 值、细胞凋亡数、活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$);与空白对照组比较,其余 5 组的 OD 值、细胞凋亡数、活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 UVA 模型组和正常组比较,低、中、高剂量组 OD 值、细胞凋亡数、活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平差异具有统计学意义($P < 0.05$);低、中、高剂量组随着剂量增加 OD 值逐渐升高,细胞凋亡数、活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平逐渐降低($P < 0.05$),见表 1。

表 1 比较各组 HSF 细胞的增殖活性、活性氧水平

Table 1 Comparisons of HSF cells proliferation activity and reactive oxygen species between groups

Groups	n	OD value	Number of apoptotic cells	Reactive oxygen species (average fluorescence intensity)	Reactive oxygen species(mg/mL)
Blank control group	5	0.93± 0.08	2.38± 0.75	97.22± 12.36	8.37± 1.22
UVA model group	5	0.51± 0.10 [°]	72.27± 0.89 [°]	215.08± 13.75 [°]	17.62± 1.51 [°]
Normal group	5	0.49± 0.12 [°]	69.16± 0.82 [°]	206.34± 12.02 [°]	18.28± 1.36 [°]
Low-dose group	5	0.60± 0.09 ^{° °}	45.20± 0.87 ^{° °}	169.73± 12.91 ^{° °}	14.53± 1.30 ^{° °}
Middle-dose group	5	0.68± 0.11 ^{° ° °}	36.39± 0.79 ^{° ° °}	146.06± 14.15 ^{° ° °}	12.92± 1.24 ^{° ° °}
High-dose group	5	0.76± 0.11 ^{° ° ° °}	30.22± 0.90 ^{° ° ° °}	122.03± 13.37 ^{° ° ° °}	11.20± 1.05 ^{° ° ° °}
F	-	362.791	338.297	229.760	298.069
P	-	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with blank control group, [°] $P < 0.05$; Compared with UVA model group and Normal group, [°] $P < 0.05$; Compared with Low-dose group, [°] $P < 0.05$; Compared with Middle-dose group, [°] $P < 0.05$.

2.2 各组细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 及其蛋白表达水平比较

6 组细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$),与空白对照组比较,其余 5 组 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平差异均

有统计学意义($P < 0.05$);与 UVA 模型组和正常组比较,低、中、高剂量组 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);低、中、高剂量组随着剂量的增加 Bax、Caspase-3 mRNA 和蛋白表达水平逐渐降低,Bcl-2mRNA 和蛋白表达水平逐渐升高($P < 0.05$),见表 2。

表 2 比较各组细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 及其蛋白表达水平

Table 2 Comparisons of Bax, Bcl-2, Caspase-3 mRNA and protein levels expression between groups

Groups	n	Bax mRNA	Bcl-2 mRNA	Caspase-3 mRNA	Bax protein	Bcl-2 protein	Caspase-3 protein
Blank control group	5	0.21± 0.12	0.69± 0.21	0.22± 0.03	0.29± 0.03	0.75± 0.09	0.37± 0.05
UVA model group	5	0.69± 0.11 [°]	0.18± 0.20 [°]	0.62± 0.02 [°]	0.78± 0.02 [°]	0.21± 0.08 [°]	0.96± 0.05 [°]
Normal group	5	0.67± 0.13 [°]	0.22± 0.19 [°]	0.63± 0.03 [°]	0.77± 0.02 [°]	0.23± 0.11 [°]	0.99± 0.04 [°]
Low-dose group	5	0.56± 0.09 ^{° °}	0.34± 0.22 ^{° °}	0.51± 0.03 ^{° °}	0.59± 0.03 ^{° °}	0.32± 0.10 ^{° °}	0.68± 0.04 ^{° °}
Middle-dose group	5	0.49± 0.11 ^{° ° °}	0.41± 0.20 ^{° ° °}	0.44± 0.04 ^{° ° °}	0.51± 0.02 ^{° ° °}	0.45± 0.09 ^{° ° °}	0.57± 0.05 ^{° ° °}
High-dose group	5	0.41± 0.09 ^{° ° ° °}	0.50± 0.19 ^{° ° ° °}	0.35± 0.03 ^{° ° ° °}	0.43± 0.02 ^{° ° ° °}	0.53± 0.11 ^{° ° ° °}	0.49± 0.04 ^{° ° ° °}
F	-	321.605	387.226	359.087	298.337	339.875	319.682
P	-	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with blank control group, [°] $P < 0.05$; Compared with UVA model group and Normal group, [°] $P < 0.05$; Compared with Low-dose group, [°] $P < 0.05$; Compared with Middle-dose group, [°] $P < 0.05$.

3 讨论

传统中医学认为,过度的日光对皮肤进行照射可诱发皮肤损伤,长期照射则可能导致皮肤老化^[9]。研究表明^[10,11],长期的紫外线辐射会减少 HSF 细胞胶原蛋白的合成,进而导致皮肤的弹力和紧致消失而形成皮肤皱纹,同时诱导皮肤的光老化现象。绞股蓝是具有健脾胃、益气养阴以及清肺解热等功效的中药,甘微苦性寒,体内实验表明^[12,13],绞股蓝对皮肤光老化具有抵抗作用。Gyp 是绞股蓝中药理作用与绞股蓝相似的药理成分,动物实验表明^[14,15],Gyp 具有抗疲劳、抗氧化,以及镇痛、镇静的功效,并具有抗皮肤光老化的效果。本研究通过分析 Gyp 对光老化 HSF 细胞凋亡以及 Caspase-3 信号通路的影响,旨在探讨 Gyp 对抗皮肤光老化的内在机制。

本研究结果发现,UVA 模型组 HSF 细胞增殖活性最弱,细胞凋亡数最多,说明经 UVA 诱导的 HSF 细胞凋亡数最多,光老化现象最明显。Gyp 含药血清干预后,HSF 细胞增殖活性明显增强,细胞凋亡数明显减少,并随着 Gyp 剂量的增加,HSF 细胞增殖活性呈逐渐增强趋势,细胞凋亡数呈明显减少趋势,提示 Gyp 可以促进 HSF 细胞的增殖,抑制 HSF 细胞的凋亡,从而在一定程度上延缓了皮肤的光老化现象。

机体在正常的生理代谢过程中,细胞会产生各种活性氧,但是在抗氧化物质的作用下,活性氧会被及时清除,当细胞受到紫外线照射的过度刺激时,会产生过度的活性氧簇,从而诱发细胞的凋亡^[16]。本研究结果显示,经 UVA 诱导的 HSF 细胞明显产生过量的活性氧,即活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平明显升高,与有关研究结果一致^[17],提示 UVA 光老化过程中,活性氧具有重要作用。结果进一步表明,Gyp 含药血清干预后,HSF 细胞中活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平降低,并且随着 Gyp 剂量的增加,活性氧(平均荧光强度)、活性氧水平逐渐降低,提示 Gyp 可以抑制 UVA 诱导的光老化 HSF 细胞毒性,修复损伤细胞,保护细胞活性。

在细胞凋亡过程中,Bax 和 Bcl-2 基因家族起调控作用,Bax 是促凋亡蛋白,可使线粒体膜的通透性增加,使细胞凋亡的线粒体途径开启,Bcl-2 可抑制细胞凋亡,在线粒体信号通路中,能够放大死亡受体通路信号,抑制细胞凋亡^[18]。人体在正常的生理状态下,Bax 与 Bcl-2 形成动态的平衡。本研究结果发现,UVA 模型组 Bax mRNA 和蛋白均呈高表达水平,Bcl-2 mRNA 和蛋白均呈低表达水平,说明 UVA 照射使 HSF 细胞的凋亡通道激活,在凋亡早期,通过诱导线粒体中的细胞色素 C 释放至细胞质,达到上调 Bax 表达和下调 Bcl-2 表达目的而促进细胞凋亡。在 Gyp 含药血清干预后,Bax mRNA 和蛋白表达下降,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达上升,并且随着 Gyp 剂量的增加,这种下降和上升趋势仍然存在,提示 Gyp 通过下调 Bax 表达和上调 Bcl-2 表达而使细胞凋亡的线粒体通路受到抑制,减轻细胞凋亡而延缓光老化现象。另有研究证实^[19],在凋亡发生过程中,Caspase 激活起关键作用,在死亡受体非依赖性刺激细胞时,Caspase 激活的生物化学通路具有放大死亡受体通路信号的功能。正常的生理状态下,Caspase 家族以酶原的形式存在于细胞质中,当受到 UVA 的照射时,Caspase 可与促凋亡因子结合而形成凋亡小体,导致 Caspase-9 的激活,进而使 Cas-

pase-3 激活而诱导细胞的凋亡^[20]。本研究结果显示,UVA 诱导 HSF 细胞光老化后,Caspase-3 mRNA 和蛋白表达明显增加,而当 Gyp 含药血清干预后,Caspase-3 mRNA 和蛋白表达下降,并且 Gyp 剂量越高,Caspase-3 表达呈逐渐下降趋势。提示 UVA 诱导 HSF 细胞可使 Caspase-3 激活,进而促进细胞的凋亡,而 Gyp 可以抑制 Caspase-3 信号通路的活性,使其表达下调,最终缓解 UVA 诱导的 HSF 细胞光老化现象。

综上所述,Gyp 通过抑制 HSF 细胞中活性氧的产生以及 Bax 的表达,以及激活 Bcl-2、Caspase-3 信号通路而使 UVA 诱导的 HSF 细胞凋亡发生逆转,最终缓解或者减轻 HSF 细胞的光老化现象。

参考文献(References)

- [1] Sun Z, Park SY, Hwang E, et al. [J]. Photochem Photobiol, 2015, 91 (4): 879-886
- [2] Zeng Q, Zhou F, Lei L, et al. Ganoderma lucidum polysaccharides protect fibroblasts against UVB-induced photoaging [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(1): 111-116
- [3] Khavinson VKh, Linkova NS, Kukanova EO, et al. Molecular Mechanisms of Functional Activity Decreasing of the Skin Cells With Its Aging[J]. Usp Fiziol Nauk, 2016, 47(2): 62-76
- [4] Kong L, Wang S, Wu X, et al. Paeoniflorin attenuates ultraviolet B-induced apoptosis in human keratinocytes by inhibiting the ROS-p38-p53 pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3553-3558
- [5] Pernodet N, Dong K, Pelle E. Autophagy in human skin fibroblasts: Comparison between young and aged cells and evaluation of its cellular rhythm and response to Ultraviolet A radiation [J]. J Cosmet Sci, 2016, 67(1): 13-20
- [6] Wang B, Xie HF, Li WZ, et al. Asymmetrical dimethylarginine promotes the senescence of human skin fibroblasts via the activation of a reactive oxygen species-p38 MAPK-microRNA-138 pathway [J]. J Dermatol Sci, 2015, 78(2): 161-164
- [7] 刘丽,罗佐杰,卢杰,等.绞股蓝总皂苷对人肾上腺皮质癌 SW-13 细胞增殖及凋亡蛋白 Caspase-8 表达的影响[J].广西医学, 2015, 37(6): 801-803, 809
- [7] Liu Li, Luo Zuo-jie, Lu Jie, et al. Effect of gypenosides on proliferation and caspase-8 expression of SW-13 cells of human adrenocortical carcinoma[J]. Guangxi Medical Journal, 2015, 37(6): 801-803, 809
- [8] He Q, Li JK, Li F, et al. Mechanism of action of gypenosides on type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease in rats [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(7): 2058-2066
- [9] 陈巧云,王业秋,陈景华,等.桃叶珊瑚苷对光老化皮肤成纤维细胞 MMP-1 和 TIMP-1 表达的影响[J].中成药, 2014, 36(8): 1602-1606
- [9] Chen Qiao-yun, Wang Ye-qiu, Chen Jing-hua, et al. Effect of aucubin on expression of MMP1, TIMP-1 in photoaging ESF-1 [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2014, 36(8): 1602-1606
- [10] Kim DH, Kim HH, Kim HJ, et al. CopA3 peptide prevents ultraviolet-induced inhibition of type-I procollagen and induction of matrix metalloproteinase-1 in human skin fibroblasts[J]. Molecules, 2014, 19 (5): 6407-6414
- [11] Choi HS, Park ED, Park Y, et al. Topical application of spent coffee ground extracts protects skin from ultraviolet B-induced photoaging in hairless mice[J]. Photochem Photobiol Sci, 2016, 15(6): 779-790

- (84): 197-199
- [15] Hou H, Yao Y, Zheng K, et al. Does intermittent pneumatic compression increase the risk of pulmonary embolism in deep venous thrombosis after joint surgery?[J]. *Blood Coagulation & Fibrinolysis An International Journal in Haemostasis & Thrombosis*, 2016, 27(3): 246
- [16] Fukuda W, Chiyoya M, Taniguchi S, et al. Management of deep vein thrombosis and pulmonary embolism (venous thromboembolism) during pregnancy [J]. *General Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2016, 64(6): 309-314
- [17] Suami T, Hough L, Machinami T, et al. Noninvasive Imaging of Early Venous Thrombosis by ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging With Targeted Perfluorocarbon Nanoemulsions[J]. *Circulation*, 2015, 131(16): 1405-1414
- [18] Polat A, Ketenciler S, Yücel C, et al. Accelerated catheter-directed thrombolytic treatment in deep venous thrombosis: mid-term results [J]. *Turkish Journal of Thoracic & Cardiovascular Surgery*, 2016, 23(3): 485-492
- [19] Streiff M B, Agnelli G, Connors J M, et al. Erratum to: Guidance for the treatment of deep vein thrombosis and pulmonary embolism[J]. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2016, 41(3): 548-548
- [20] Thaler J, Pabinger I, Ay C. Anticoagulant Treatment of Deep Vein Thrombosis and Pulmonary Embolism: The Present State of the Art [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2015, 2(4): 254-262
- [21] Dentali F, Di M G, Giorgi P M, et al. Rate and duration of hospitalization for deep vein thrombosis and pulmonary embolism in real-world clinical practice[J]. *Annals of Medicine*, 2015, 47(7): 1-9
- [22] Bevis P M, Smith F C. Deep vein thrombosis [J]. *Surgery*, 2016, 34(4): 159-164
- [23] Martin J, Cameron E. Diagnosis Of Deep Vein Thrombosis[J]. *Medical Journal of Australia*, 2015, 2(8412): 1152-1153
- [24] Nordstrom B L, Evans M A, Murphy B R, et al. Risk of recurrent venous thromboembolism among deep vein thrombosis and pulmonary embolism patients treated with warfarin[J]. *Curr Med Res Opin*, 2015, 31(3): 1-25
- [25] Ouvry P, Arnoult A C, Genty C, et al. Compression therapy and deep-vein thrombosis: a clinical practice survey [J]. *Journal Des Maladies Vasculaires*, 2012, 37(3): 140-145
- [26] Anvari A, Barr R G, Dhyani M, et al. Clinical application of sonoe-elastography in thyroid, prostate, kidney, pancreas, and deep venous thrombosis[J]. *Abdominal Radiology*, 2015, 40(4): 709-722
- [27] Funamoto K, Yamashita O, Hayase T. Poly (vinyl alcohol) gel ultrasound phantom with durability and visibility of internal flow[J]. *Journal of Medical Ultrasonics*, 2015, 42(1): 17-23
- [28] Rubin J M, Aglyamov S R, Wakefield T W, et al. Clinical Application of Sonographic Elasticity Imaging for Aging of Deep Venous Thrombosis[J]. *Journal of Ultrasound in Medicine Official Journal of the American Institute of Ultrasound in Medicine*, 2003, 22(5): 443-448
- [29] Swanson E. Doppler ultrasound imaging for detection of deep vein thrombosis in plastic surgery outpatients: a prospective controlled study[J]. *Aesthetic Surgery Journal*, 2015, 35(2): 204-214
- [30] Smith A, Parker P, Byass O, et al. Contrast sonovenography - Is this the answer to complex deep vein thrombosis imaging?[J]. *Ultrasound*, 2016, 24(1): 17
- (上接第 3635 页)
- [12] Niu Y, Shang P, Chen L, et al. Characterization of a novel alkali-soluble heteropolysaccharide from tetraploid *Gynostemma pentaphyllum* Makino and its potential anti-inflammatory and antioxidant properties [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(17): 3783-3790
- [13] Quan Y, Yang Y, Wang H, et al. Gypenosides attenuate cholesterol-induced DNA damage by inhibiting the production of reactive oxygen species in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2845-2851
- [14] Yu H, Guan Q, Guo L, et al. Gypenosides alleviate myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuation of oxidative stress and preservation of mitochondrial function in rat heart [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2016, 21(3): 429-437
- [15] Li K, Du Y, Fan Q, et al. Gypenosides might have neuroprotective and immunomodulatory effects on optic neuritis[J]. *Med Hypotheses*, 2014, 82(5): 636-638
- [16] 李莉,古正涛,刘志锋,等.活性氧调控 Bcl-2、Bax 表达参与热打击后人脐静脉内皮细胞凋亡的研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(7): 458-463
- Li Li, Gu Zheng-tao, Liu Zhi-feng, et al. The effect of reactive oxygen species regulation of expression of Bcl-2 and Bax in apoptosis of human umbilical vein endothelial cell induced by heat stress[J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2014, 26(7): 458-463
- [17] Zerrouh W, Nani A, Belarbi M, et al. Phenolic extract from oleaster (*Olea europaea* var. *Sylvestris*) leaves reduces colon cancer growth and induces caspase-dependent apoptosis in colon cancer cells via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0170823
- [18] Mohammadian J, Sabzichi M, Molavi O, et al. Combined treatment with statin and docetaxel alters the Bax/Bcl-2 gene expression ratio in human prostate cancer cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(11): 5031-5035
- [19] Duval C, Cohen C, Chagnoleau C, et al. Key regulatory role of dermal fibroblasts in pigmentation as demonstrated using a reconstructed skin model: impact of photo-aging [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114182
- [20] Lin'kova NS, Drobintseva AO, Orlova OA, et al. Peptide Regulation of Skin Fibroblast Functions during Their Aging In Vitro[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2016, 161(1): 175-178