

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.06.012

艾灸“关元”穴对皮肤光老化模型大鼠皮肤组织氧化应激及自噬相关基因表达的影响

惠倩倩, 靖媛[✉], 欧阳思洁, 游世晶, 童伯瑛

福建中医药大学针灸推拿学院, 福建省福州市闽侯县上街镇邱阳西路1号, 350122

[摘要] **目的** 探讨艾灸关元穴延缓皮肤光老化衰老的潜在作用机制。**方法** 将32只雄性Wistar大鼠随机分为空白组、模型组、维生素E组和艾灸组, 每组8只。除空白组外, 其余各组大鼠进行紫外线光照背部皮肤建立皮肤光老化模型。造模结束1周后, 艾灸组大鼠艾灸“关元”穴, 每天1次, 每周灸5天; 维生素E组大鼠给予维生素E 25 mg/(kg·d)灌胃, 每天1次, 每周5天; 空白组、模型组和艾灸组大鼠给予等量的生理盐水灌胃; 各组干预连续7周。7周后取大鼠背部皮肤组织, 检测皮肤组织的含水量; 采用HE染色观察皮肤组织学形态; ELISA法检测皮肤组织胶原蛋白 I (Collagen I)、胶原蛋白 III (Collagen III) 含量; 检测皮肤组织中丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢 (H₂O₂) 和过氧化氢酶 (CAT) 活性; Western Blot法检测皮肤组织中自噬相关蛋白微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3 (LC3)、多聚泛素结合蛋白 (p62) 和自噬特异性基因 (Beclin-1) 蛋白水平; qRT-PCR法检测皮肤组织中 LC3、p62、Beclin-1 mRNA 表达; 透射电镜观察皮肤自噬小体的形成情况。**结果** HE染色结果显示, 空白组大鼠的皮肤表皮结构规整, 厚度均匀; 模型组大鼠的皮肤表皮厚薄不一; 艾灸组大鼠表皮层规则且平整, 厚度较为均匀, 真皮层排列紧密; 维生素E组大鼠皮肤表皮层较模型组变厚。与空白组比较, 模型组大鼠皮肤组织含水量及皮肤组织中 Collagen I、Collagen III 含量均降低, 皮肤组织 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性均降低, H₂O₂ 及 MDA 活性升高, p62 蛋白水平及其 mRNA 表达升高, LC3 和 Beclin-1 蛋白水平及其 mRNA 表达降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 艾灸组上述各指标均有所改善 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 维生素E组皮肤组织中 Collagen I 和 Collagen III 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。透射电镜结果显示, 与空白组比较, 模型组皮肤细胞整体萎缩, 线粒体出现大量空泡化, 细胞结构降解; 艾灸组大鼠皮肤组织出现新月状或杯状的自噬小体, 单位面积内可见自噬小体数量明显增加, 而维生素E组改善不如艾灸组改善明显。**结论** 艾灸“关元”穴对光老化皮肤的改善作用可能与其调节氧化应激紊乱、调控细胞自噬, 促进胶原蛋白合成有关, 从而延缓皮肤衰老的进程。

[关键词] 光老化; 皮肤老化; 艾灸; 关元穴; 自噬; 氧化应激; 胶原蛋白

皮肤衰老是生物体生命进程中不可避免出现的老化现象, 是由内源性因素和外源性因素共同调控的复杂生物过程^[1], 其中紫外线引起的老化即光老化, 占皮肤衰老的 80%^[2]。长期暴露于紫外线下, 皮肤屏障功能受损, 不仅可引起皮肤炎症, 也会加速黑色素的合成和胶原的降解, 导致皮肤粗糙、皱

纹增多、弹性降低、色素沉着等光老化现象^[3-4]。艾灸作为中医传统外治法之一, 具有温通经络、调和气血、扶正祛邪等功效。关元穴作为艾灸养生保健的重要穴位之一, 是任脉与足三阴经之会, 具有培肾固本、补益元气功效。既往研究^[5]发现, 艾灸关元、印堂等穴位治疗皮肤光老化有效, 可改善患者皮肤氧化应激情况。针灸关元穴与足三里穴能够拮抗紫外线诱导的皮肤光老化, 对皮肤光老化具有防护作用^[6-7]。

基金项目: 国家自然科学基金(82004438); 福建省自然科学基金(2023J01869)

[✉] 通讯作者: 120845750@qq.com

自噬是真核生物中普遍存在的细胞降解代谢的过程,通过降解和回收受损的细胞器、蛋白质等,维持细胞内环境的稳定^[8]。研究^[9]表明,紫外线照射下,自噬因活性氧(ROS)的过量产生而被激活,分解并消除氧化的脂质和蛋白质,防止ROS的积累,恢复代谢稳态,减轻氧化损伤,从而减缓光老化的发生;当ROS过度积累时,自噬将会被抑制并降低其在光老化皮肤细胞中的清除效率。课题组前期研究证实,艾灸“关元”穴能够显著降低衰老大鼠皮肤氧化应激损伤、提高皮肤胶原蛋白含量,延缓大鼠皮肤衰老^[10-11]。因此,本研究从氧化应激及细胞自噬角度探讨艾灸关元穴改善光老化的可能作用机制,为其临床应用提供科学依据。本研究方案已通过福建中医药大学实验动物伦理委员会审批(审批号:2021177)。

1 材料与方法

1.1 动物

健康雄性Wistar大鼠32只,6周龄,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物生产许可证号:SYXK(沪)2017-0005。大鼠饲养于福建中医药大学实验动物中心,饲养环境温度(22±2)℃,相对湿度50%~70%,每日保证12 h的光照时间。

1.2 主要试剂与仪器

多聚甲醛(批号:BL539A),Biosharp公司;HE染色试剂盒(批号:G1120)、BCA试剂盒(批号:PC0020),Solarbio公司;维生素E(批号:RH362915),上海易恩化学科技有限公司;SDS-PAGE电泳液(批号:MA0238)、BSA封闭液(批号:MB4219)、二抗稀释液(批号:MB9888)、ECL发光液(批号:MA0186),美仑公司;微管相关蛋白1A/1B-轻链3(LC3)抗体(批号:ab63817)、多聚泛素结合蛋白(p62)抗体(批号:ab240635)、自噬特异性基因(Beclin-1)抗体(批号:ab207612),美国Abcam公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:A001-3)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号:A007-1-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号:A005-1)、过氧化氢(H₂O₂)试剂盒(批号:A064-1)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:A003-1),南京建成生物科技有限公司;胶原蛋白I(Collagen I)ELISA试剂盒(批号:CSB-E08084r)、胶原蛋白III(Collagen III)ELISA试剂盒(批号:CSB-E07924r),美国eBioscience公司;戊二醛(批号:A17876),Ala Aesar公司;钨酸

(批号:18456),Ted Pella公司;醋酸铀(批号:02624-AB),SPI公司。

电子天平(ME203E/02型,梅特勒-托利多仪器公司),高速组织研磨仪(KZ-II型,Servicebio公司),酶标仪(Multiskan型,赛默飞世尔科技公司),光学显微镜(H550S型,Nikon公司),电子显微镜(H-7650型,Hitachi公司),病理切片机(RM2235型,德国徕卡公司),化学发光成像系统(ChemiDoc XRS+型,Bio-Rad公司)。

1.3 分组及模型制备

将大鼠按随机数字法分为空白组、模型组、维生素E组、艾灸组,每组8只。各组大鼠适应性生长1周后,于背部第4胸椎至第13胸椎(大鼠第二胸椎棘突最高)处用剃毛刀将大部分毛发剔除,接着把脱毛膏涂于大鼠背部皮肤4~6 min,用温水反复擦洗将毛发处理干净,剃毛区域约为4 cm×4 cm,每隔两天采用同样的方法进行脱毛处理。除空白组外,其余各组大鼠进行紫外线光照建立光老化模型^[12]。大鼠背部剃毛后进行紫外线照射,根据预实验测试,照射10 min可得最小红斑剂量(MED)397.2 mJ/cm²,并以此剂量进行干预,第1、2周每次照射10 min,第3、4周每次照射时间延长至20 min,第5~8周每次照射时间为30 min,为避免急性光损伤发生,周四、周日各休息1天,每周照射5天,每天1次,持续照射8周。造模后当大鼠皮肤表皮粗糙、皱纹明显,呈典型皮革样外观,表明造模成功^[12]。

1.4 干预方法

造模结束1周后,各组大鼠开始进行干预。艾灸组大鼠“关元”穴定位参照《实验针灸学》^[13]大鼠标准穴位图谱,艾灸前对大鼠关元穴区直径1 cm左右的区域进行备皮处理,并将用艾炷模具制作的直径5 mm、高8 mm、重量约50 mg的艾炷放置于关元穴区,用线香点燃艾炷,待艾炷燃烧4/5左右,用镊子夹去,易炷再灸,施灸3壮,每壮施灸约60 s。每天1次,每周灸5天,连续7周。灸后局部皮肤略红,无发泡。维生素E组大鼠给予生理盐水配制的1%的维生素E溶液,按25 mg/(kg·d)灌胃,每天1次,每周5天,连续7周。对空白组、模型组和艾灸组进行等量的生理盐水灌胃。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 皮肤组织含水量测定 大鼠最后一次干预后次日取材,用20%乌拉坦0.5 ml/100 g腹腔注射将大鼠麻醉后,切取每只大鼠背部剃毛区域皮肤约

4 cm×4 cm。剪取各组大鼠背部光照部位皮肤组织约 1 cm×1 cm 大小，用电子天平精密称量皮肤的湿重，记录并标号，随即将其放入烘箱中，80 ℃烘干 7 h，再称取其干重，计算皮肤含水量百分率。含水量百分率=(湿重-干重)/湿重×100%。剩余皮肤组织-80 ℃保存待用。

1.5.2 皮肤组织 HE 染色 剪取各组大鼠背部光照部位皮肤组织 0.5 cm×1.5 cm 放入多聚甲醛中固定，常规脱水、浸蜡、包埋及切片后，进行 HE 染色，光镜下观察各组皮肤组织的表皮和真皮变化。

1.5.3 皮肤组织氧化应激指标检测 剪取各组大鼠背部光照部位皮肤组织约 0.5 g，加入生理盐水 5 ml，置于冰水浴中使用组织研磨仪进行研磨，后将匀浆液移到离心管中，4 ℃、5000 g 离心 10 min，取上清液，按照试剂盒的操作说明分别测定大鼠皮肤组织匀浆液中 H₂O₂、SOD、MDA、CAT 及 GSH-Px 的活性。

1.5.4 ELISA 法检测皮肤组织中胶原蛋白含量 采用随机数字表法选取各组 3 只皮肤组织匀浆液移到离心管中，4 ℃、5000 g 离心 10 min，取上清液，按照 ELISA 试剂盒说明书操作检测皮肤组织中 Collagen I 和 Collagen III 含量。

1.5.5 Western blot 法检测皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 蛋白水平 采用随机数字表法选取各组 3 只大鼠背部光照部位皮肤组织匀浆液，使用 BCA 试剂盒检测蛋白含量。取 20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并转膜，5%BSA 封闭后，分别加入一抗 LC3 (1:1000)、Beclin-1 (1:1000)、p62 (1:1500) 稀释液和 GAPDH (1:1500) 抗体稀释液，置于 4 ℃孵育过夜，加入二抗室温孵育 1 h，ECL 显色，在凝胶成像系统中采集照片，以目的蛋白与内参蛋白灰度值的比作为目的蛋白的相对表达量进行定量分析。

1.5.6 qRT-PCR 法检测皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达 采用随机数字表法选取各组 4 只大鼠背部光照部位皮肤组织 0.1 g 放入研钵，加入液氮进行研磨，直到皮肤组织被研磨为细腻的粉末状，放入离心管中，按试剂盒说明书提取总 RNA，将提取的 RNA 样品进行逆转录，获得 cDNA，根据逆转录的 cDNA 配置 RT-PCR 体系，进行 PCR 扩增，按照仪器设置参数绘制熔解曲线。以 GAPDH 作内参基因，采用 2^{-ΔΔCt} 方法进行分析，每个样本进行 3 复孔验证。PCR 引物的合成由上海博尚生物工程有限公司完成。LC3 引物：上游 TTGCTCAAGAT-

CATCCGGCG，下游 AGCCGAAGGTTTCTTGGGAG，产物长度 179 bp；Beclin-1 引物：上游 AATCTA-AGGAGTTGCCGTTGT，下游 GCCTCCAGTGCTTTC-AATCTT，产物长度 103 bp；p62 引物：上游 GCA-CTACCGCGATGAGGATG，下游：TCACAAATCAC-GTTGGGGTG，产物长度 149 bp；GAPDH 引物：上游 ACGGCAAGTTCAACGGCACAG，下游 GAAGAC-GCCAGTAGACTCCACGAC，产物长度 60 bp。

1.5.7 透射电镜观察皮肤自噬小体形成 将各组大鼠背部光照部位皮肤组织固定于预冷的 2.5% 戊二醛中，4 ℃冰箱保存 24 h，洗涤后 1% 锇酸后固定 2 h，脱水、包埋、超薄切片机切片及用柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀进行染色，晾干后用透射电镜观察皮肤细胞及其内容物。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 26.0 进行统计分析，计量资料均符合正态分布，以均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用单因素方差分析，方差齐性的数据采用 LSD 检验，方差不齐的数据采用 Games-Howell 法， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠皮肤组织含水量比较

表 1 示，与空白组比较，模型组大鼠皮肤组织含水量降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，维生素 E 组与艾灸组大鼠皮肤组织含水量均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠皮肤组织含水量比较

Table 1 Comparison of water content in rat skin tissue in each group (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	含水量
空白组	8	61.81±0.31
模型组	8	58.78±1.54 ^{a)}
维生素 E 组	8	61.00±0.92 ^{b)}
艾灸组	8	61.38±2.13 ^{c)}

注：a) 与空白组比较： $P < 0.01$ ；b) 与模型组比较， $P < 0.05$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.01$ 。

2.2 各组大鼠皮肤组织 HE 染色结果比较

图 1 示，空白组大鼠的皮肤表皮结构规整，厚度均匀，细胞排列紧密，表皮与真皮的界限分明。模型组大鼠的皮肤表皮变薄而不规则，厚薄不一，甚至在局部出现了角化现象。与模型组比较，艾灸组的大鼠皮肤组织形态得到很大改善，表皮层变得规则且平整，厚度较为均匀，真皮层排列紧密；维生素 E 组的大鼠皮肤相比模型组也有改善，表皮层

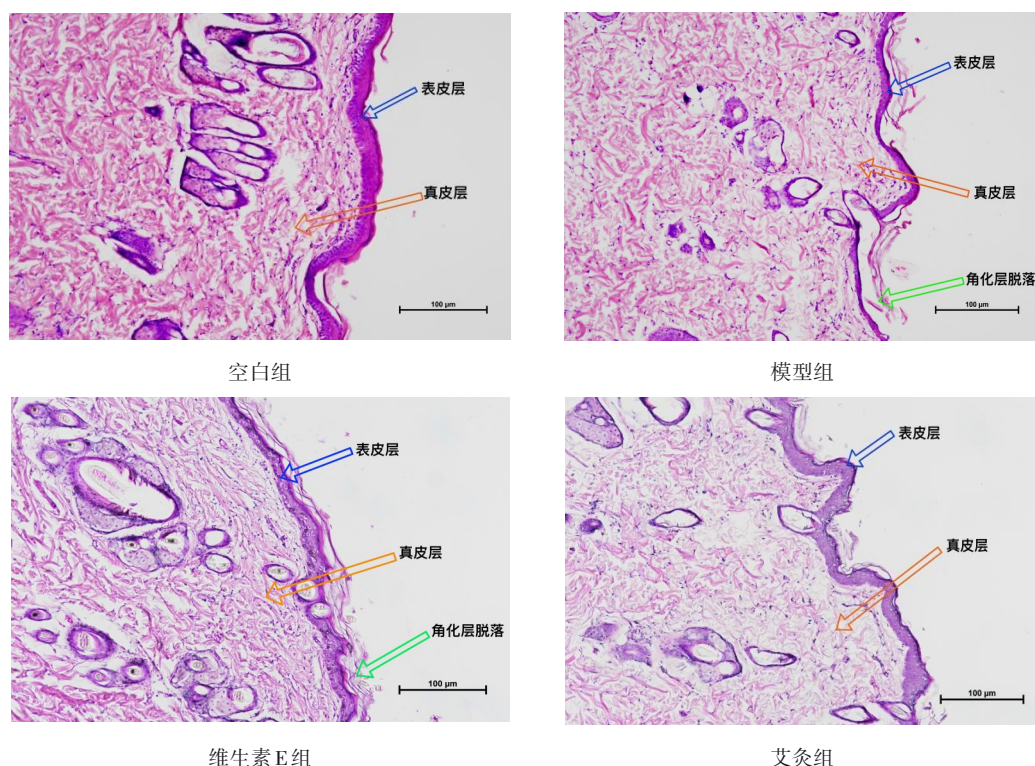


图1 各组大鼠皮肤组织形态结果 (HE 染色, ×40)

Figure 1 Morphology results of skin tissues of rats in each group (HE staining, ×40)

较模型组变厚。与艾灸组比较, 维生素E组表皮角化层存在更多未脱落细胞, 表皮厚度相对不均, 厚度不及艾灸组。

2.3 各组大鼠皮肤组织氧化应激指标活性比较

表2示, 与空白组比较, 模型组大鼠皮肤组织SOD、CAT和GSH-Px活性均降低, H_2O_2 及MDA活性升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 艾灸组与维生素E组大鼠皮肤组织SOD、GSH-Px和CAT活性均升高, H_2O_2 及MDA活性降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。艾灸组与维生素E组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠皮肤组织Collagen I和Collagen III含量比较

表3示, 与空白组比较, 模型组大鼠皮肤组织

中Collagen I和Collagen III含量降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 艾灸组皮肤组织中Collagen I和Collagen III含量升高 ($P<0.05$), 而维生素E组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表3 各组大鼠皮肤组织Collagen I和Collagen III含量比较

Table 3 Comparison of Collagen I and Collagen III content in skin tissue of rats in each group (ng/mg prot, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Collagen I	Collagen III
空白组	3	3.64±0.15	2076.63±71.82
模型组	3	2.39±0.14 ^{a)}	1683.39±36.32 ^{a)}
维生素E组	3	2.86±0.51	1837.05±199.36
艾灸组	3	3.05±0.72 ^{b)}	2050.76±122.80 ^{b)}

注: Collagen I, 胶原蛋白I; Collagen III, 胶原蛋白III。

a) 与空白组比较, $P<0.05$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

表2 各组大鼠皮肤组织氧化应激指标活性比较

Table 2 Comparison of the activity of oxidative stress indicators in skin tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	SOD/U·mg prot ⁻¹	CAT/U·mg prot ⁻¹	GSH-Px/U·mg prot ⁻¹	$H_2O_2/\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot}^{-1}$	MDA/nmol·mg prot ⁻¹
空白组	8	22.46±1.14	4.99±0.66	2.67±0.10	12.77±0.82	3.74±0.34
模型组	8	19.73±1.34 ^{a)}	4.01±0.14 ^{a)}	2.43±0.20 ^{a)}	14.78±1.19 ^{a)}	4.27±0.22 ^{a)}
维生素E组	8	22.29±1.71 ^{b)}	4.73±0.43 ^{b)}	2.61±0.06 ^{b)}	13.17±1.06 ^{b)}	3.74±0.20 ^{c)}
艾灸组	8	22.06±1.88 ^{b)}	4.89±0.44 ^{c)}	2.64±0.07 ^{b)}	12.89±0.85 ^{c)}	3.74±0.22 ^{c)}

注: SOD, 超氧化物歧化酶; CAT, 过氧化氢酶; GSH-Px, 谷胱甘肽过氧化物酶; H_2O_2 , 过氧化氢; MDA, 丙二醛。

a) 与空白组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

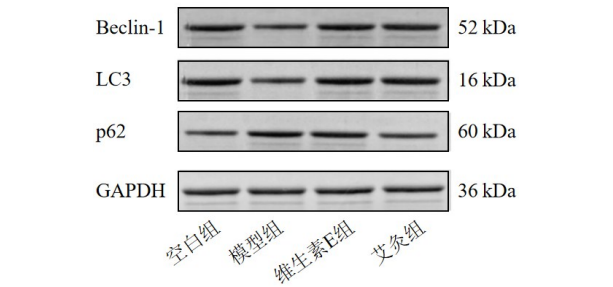
2.5 各组大鼠皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 蛋白水平比较

表 4 示，与空白组比较，模型组大鼠皮肤组织 p62 蛋白水平升高，LC3 和 Beclin-1 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，艾灸组与维生素 E 组大鼠皮肤组织 p62 蛋白水平降低，LC3 和 Beclin-1 蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。艾灸组与维生素 E 组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 蛋白电泳图见图 2。

表 4 各组大鼠皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 蛋白水平比较
Table 4 Comparison of the protein expression results of p62, Beclin-1 and LC3 in skin tissue of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	p62	Beclin-1	LC3
空白组	3	0.67±0.17	1.31±0.27	1.71±0.13
模型组	3	1.36±0.24 ^{a)}	0.77±0.04 ^{b)}	0.92±0.19 ^{b)}
维生素 E 组	3	0.80±0.15 ^{c)}	0.93±0.02 ^{c)}	1.34±0.04 ^{d)}
艾灸组	3	0.81±0.15 ^{c)}	1.13±0.04 ^{c)}	1.61±0.14 ^{d)}

注：Beclin-1，自噬特异性基因；LC3，微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3；p62，多聚泛素结合蛋白。
a) 与空白组比较， $P<0.05$ ；b) 与空白组比较， $P<0.01$ ；
c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与模型组比较， $P<0.01$ 。



注：Beclin-1，自噬特异性基因；LC3，微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3；p62，多聚泛素结合蛋白。
图 2 各组大鼠皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoresis of p62, Beclin-1 and LC3 proteins in skin tissue of rats in each group

2.6 各组大鼠皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达比较

表 5 示，与空白组比较，模型组大鼠皮肤组织 p62 mRNA 表达升高 ($P<0.01$)，LC3、Beclin-1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，艾灸组与维生素 E 组大鼠皮肤组织 p62 mRNA 表达降低，LC3、Beclin-1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。艾灸组与维生素 E 组各指标比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 5 各组大鼠皮肤组织 p62、Beclin-1 和 LC3 mRNA 表达比较
Table 5 Comparison of the mRNA expression results of p62, Beclin-1 and LC3 in skin tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	p62	Beclin-1	LC3
空白组	4	1.23±0.08	0.84±0.03	0.87±0.02
模型组	4	1.50±0.08 ^{a)}	0.71±0.03 ^{a)}	0.73±0.01 ^{a)}
维生素 E 组	4	1.33±0.04 ^{b)}	0.82±0.06 ^{c)}	0.77±0.02 ^{c)}
艾灸组	4	1.23±0.09 ^{c)}	0.80±0.02 ^{b)}	0.80±0.05 ^{b)}

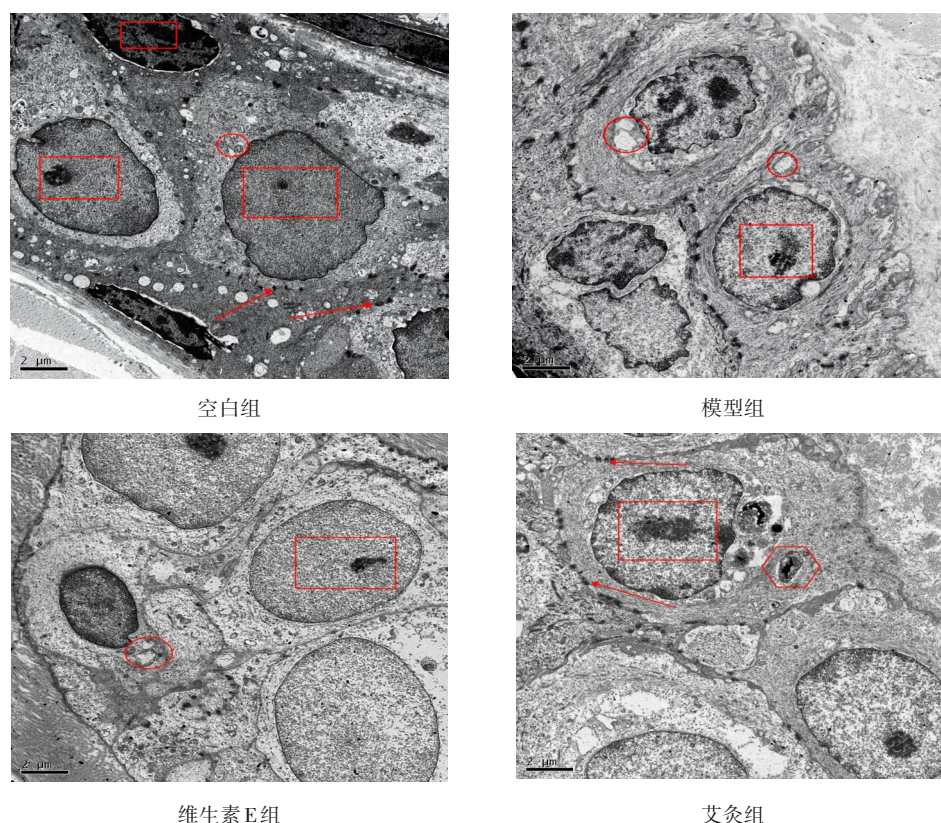
注：Beclin-1，自噬特异性基因；LC3，微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3；p62，多聚泛素结合蛋白。
a) 与空白组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；
c) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.7 各组大鼠皮肤组织透射电镜下自噬小体形成比较

图 3 示，空白组皮肤细胞结构完整，形态正常；皮肤细胞间紧密连接及胶原纤维丰富，排列整齐，线粒体结构完整，出现部分空泡化，细胞无自噬发生。模型组皮肤细胞整体萎缩，线粒体出现大量空泡化，细胞结构降解。与模型组比较，艾灸组大鼠皮肤组织出现新月状或杯状的自噬小体，呈双层膜或多层膜囊泡结构，大小不一，单位面积内可见自噬小体数量明显增加。维生素 E 组显微结构相较于模型组有所改善，但不如艾灸组改善明显。

3 讨论

中医学认为，皮肤光老化的主要病因为外感光毒侵袭，腠理不固，卫外功能降低所致，其病机不外乎虚实两端。虚者为正气不足，气血亏虚，肌肤失养；实者为痰、瘀等病理产物堆积，脉络瘀阻，使皮肤不能得到充分滋润濡养，从而出现老化现象^[14]。因此，调理脏腑功能、培补正气、调和气血为延缓光老化的重要治则。《神灸经纶·说原》云：“灸者，温暖经络，宣通气血，使逆者得顺，滞者得行。”艾灸具有温通经脉、固本培元、调和气血、平衡阴阳、扶正祛邪等功效，在治疗疾病、预防保健和抗衰老中发挥着重要的作用^[15]。关元穴最早见于《素问·骨空论篇》。《说文解字》中解释“关”为闭、合拢，“元”指元气，即人体的正气，与邪气相对。关元穴属于任脉穴位，为小肠之募穴，是任脉与足三阴经的交汇点，为人体全身元气聚集之处，乃人身之关要。《扁鹊心书》中阐述关元穴“每夏秋之交，即灼关元千柱，久久不畏寒暑，人至三十，可三年一灸脐下三百壮。五十，可二年一灸脐下三百壮；六十，可一年一灸脐下三百壮，令人长生不老”，认为关元为真元之根，关元



注：图中矩形代表细胞核，箭头代表紧密连接，圆形代表线粒体，六边形代表自噬溶酶体。

图3 各组大鼠皮肤组织中自噬小体的形成(透射电镜, ×5000)

Figure 3 Observation of Autophagosome formation in rat skin (transmission electron microscope, ×5000)

穴集先后天之本于一体,有培补元气之功;艾灸关元穴可以通过足三阴经滋养肝、脾、肾,调理气血,补气益元,延缓衰老。维生素E具有抗氧化作用,口服维生素E能提高抗氧化酶的表达,减少氧化物的过量堆积,均衡皮肤的氧化还原调控作用,可缓解皮肤光老化进程^[16],因此本研究采用维生素E灌胃的方式干预,作为阳性对照组。

在光老化过程中,皮肤细胞受到紫外线过量照射引起损伤,导致细胞内产生大量ROS引起病理性氧化应激反应。当ROS大量堆积时,会促使人体的抗氧化防御系统产生SOD、CAT、GSH-Px等物质,以减轻紫外线所带来的伤害^[4]。自噬作用同样因ROS的过量而被激活,用以分解并消除氧化的脂质和蛋白质,防止氧化产物的积累,引起机体损伤;当氧化产物过度累积时,自噬会被抑制^[17]。因此,自噬的调控机制与氧化应激紊乱具有相关性。另有研究^[18]表明,皮肤光老化的主要致病机制是产生的ROS与抗氧化防御系统两者无法达到平衡所致。核心自噬基因Beclin-1是自噬过程的关键启动蛋白,目前研究中常通过检测Beclin-1和LC3来反映自噬^[19]。此外,p62作为多功能衔接蛋

白,参与多种生物过程,也是调控细胞自噬的关键分子^[20]。当细胞内自噬活性越高,Beclin1和LC3的表达上升,p62的表达水平则降低^[21]。因此,本实验选择了LC3、Beclin-1和p62作为检测自噬水平的代表基因。Collagen I和Collagen III主要分布在真皮基质中,随着皮肤光老化的进程,胶原的降解增加,合成下降不明显,导致胶原含量逐渐降低^[22],因此是Collagen I和Collagen III含量是衡量皮肤衰老的重要指标。

本研究结果显示,模型组大鼠皮肤表皮结构不规则,较空白组皮肤厚度变薄且厚薄不均,含水量与胶原蛋白含量均降低,皮肤组织SOD、CAT和GSH-Px活性均降低,H₂O₂及MDA活性升高,皮肤组织p62水平升高,LC3和Beclin-1水平降低,说明其皮肤屏障功能下降,皮肤组织受到损害,抗氧化及自噬能力降低。通过艾灸干预,能改善大鼠表皮和真皮组织结构,增加皮肤组织含水量和皮肤组织中Collagen I和Collagen III含量;上调皮肤组织SOD、GSH-Px和CAT活性,下调H₂O₂及MDA活性从而改善皮肤氧化应激紊乱;调节自噬相关蛋白及基因,降低p62蛋白及其mRNA表达,升高LC3和

Beclin-1 蛋白及其 mRNA 表达;透射电镜结果显示,艾灸组大鼠皮肤组织中单位面积内自噬小体的数量较模型组明显增加。以上结果说明,艾灸“关元”穴可通过调节细胞自噬相关基因和蛋白的水平,促进细胞自噬活动的进行,从而有效地清除这些损伤物质,维持皮肤细胞的稳态和健康,延缓皮肤衰老,并且与维生素 E 组的干预效果相当。

综上,艾灸“关元”穴对光老化皮肤的改善作用可能与其调节氧化应激紊乱、调控细胞自噬、促进胶原蛋白合成有关,从而延缓皮肤衰老的进程。然而,本研究仍存在一定局限性,虽验证了艾灸“关元”穴与自噬和皮肤光老化的关系,但尚不确定在调节自噬过程中发挥作用的具体通路;另外本研究仅在大鼠模型上进行了实验,其结果在临床上的适用性仍需要进一步探索和验证。

参考文献

- [1] FULLER B. Role of PGE-2 and other inflammatory mediators in skin aging and their inhibition by topical natural anti-inflammatories[J]. *Cosmetics*, 2019, 6(1): 6-33.
- [2] GROMKOWSKA-KĘPKA KJ, PUŚCION-JAKUBIK A, MARKIEWICZ-ŻUKOWSKA R, et al. The impact of ultraviolet radiation on skin photoaging: review of in vitro studies[J]. *J Cosmetic Dermatol*, 2021, 20(11): 3427-3431.
- [3] 祝高飞,王洁,郭新艳,等. 多酚类化合物的抗皮肤光老化作用[J]. *生命的化学*, 2024, 44(7): 1161-1168.
- [4] CHEN JJ, LIU Y, ZHAO Z, et al. Oxidative stress in the skin: impact and related protection[J]. *Int J Cosmet Sci*, 2021, 43(5): 495-450.
- [5] 陈绍斐. 艾灸配合超声波治疗皮肤光老化的疗效观察[J]. *上海针灸杂志*, 2020, 39(7): 880-884.
- [6] 刘斌. 针刺足三里和关元穴抗皮肤衰老的作用及机制研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2010.
- [7] 刘斌,王业秋,陈巧云,等. 针灸“足三里”及“关元”对大鼠皮肤光老化的防护作用[J]. *针灸临床杂志*, 2010, 26(8): 56-58.
- [8] WANG Y, WEN X, HAO D, et al. Insights into autophagy machinery in cells related to skin diseases and strategies for therapeutic modulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 113: 108775. doi: 10. 1016/j. biopha. 2019. 108775.
- [9] PFEIFER GP. Mechanisms of UV-induced mutations and skin cancer[J]. *Genome Instab Dis*, 2020, 1(3): 99-113.
- [10] 靖媛,张苗,游世晶. 艾灸关元穴对 D-半乳糖诱导的衰老大鼠皮肤氧化应激及 MMP-1、TIMP-1 mRNA 表达的影响[J]. *福建中医药*, 2018, 49(5): 32-35.
- [11] 靖媛,胡炜圣,惠倩倩,等. 基于营卫理论探讨自噬及替代自噬与皮肤衰老的相关性[J]. *中医杂志*, 2022, 63(18): 1706-1711.
- [12] 曹迪,陈瑾,黄琨,等. 皮肤光老化 SD 大鼠模型的构建及评价标准的探讨[J]. *重庆医科大学学报*, 2016, 41(4): 379-383.
- [13] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社, 2007: 255-257.
- [14] 陶冶,张小卿,吴景东. 皮肤光老化中医机理探讨[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(1): 97-98.
- [15] 张承舜,吕鹏,唐勇,等. 艾灸光效应研究进展及展望[J]. *成都中医药大学学报*, 2016, 39(3): 1-4.
- [16] 庄洁,陈晗俊,吴旭. 维生素在皮肤抗光老化方面的研究进展[J]. *中国洗涤用品工业*, 2021(4): 77-83.
- [17] MA J, TENG Y, HUANG Y, et al. Autophagy plays an essential role in ultraviolet radiation-driven skin photoaging[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 864331. doi: 10. 3389/fphar. 2022. 864331.
- [18] GU Y, HAN J, JIANG C, et al. Biomarkers, oxidative stress and autophagy in skin aging[J]. *Ageing Res Rev*, 2020, 59: 101036. doi: 10. 1016/j. arr. 2020. 101036.
- [19] LI WD, LI NP, SONG DD, et al. Metformin inhibits endothelial progenitor cell migration by decreasing matrix metalloproteinases, MMP-2 and MMP-9, via the AMPK/mTOR/autophagy pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(5): 1262-1268.
- [20] 高雅然,胡明,吕佩源. 选择性自噬接头蛋白 p62 与 Keap1-Nrf2 信号通路在神经退行性疾病中的研究进展[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2020, 47(4): 439-442.
- [21] 何子纯,张佳怡. 自噬相关蛋白在脓毒症并发急性呼吸窘迫综合征患者中的水平变化及临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2021, 37(9): 1131-1135.
- [22] 白爽,夏志宽,敖俊红,等. 胶原蛋白与皮肤创伤修复[J]. *实用皮肤病学杂志*, 2022, 15(5): 296-298.

Effects of Moxibustion at "Guanyuan (CV 4)" on Oxidative Stress and Autophagy-Related Gene Expression of Skin Tissue in Photoaging Model Rats

HUI Qianqian, JING Yuan, OUYANG Sijie, YOU Shijing, TONG Boying

School of Acupuncture, Moxibustion and Tuina, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

ABSTRACT **Objective** To explore the potential mechanism of moxibustion at Guanyuan (CV 4) in delaying skin photoaging. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into four groups, namely blank group, model group, vitamin E group, and moxibustion group, with 8 rats in each group. Except for the blank group, dorsal skin of rats were exposed to ultraviolet (UV) radiation to establish a skin photoaging model. One week after modeling, the moxibustion group received moxibustion at "Guanyuan (CV 4)" once a day, five days per week; the vitamin E group received vitamin E (25 mg/kg·d) once a day by gavage, five days per week; the blank group, model group, and moxibustion group received an equivalent volume of normal saline via gavage; the intervention lasted for 7 weeks. After 7 weeks, dorsal skin tissues were collected to analyze the following indicators, such as skin tissue moisture content, histomorphological changes using hematoxylin-eosin (HE) staining, Collagen I and collagen III content using ELISA. Malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), hydrogen peroxide (H_2O_2), and catalase (CAT) activity in skin tissue were detected. Western Blot was used to determine autophagy-related proteins, including microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), polyubiquitin-binding protein (p62), and autophagy-specific gene (Beclin-1); LC3, p62, and Beclin-1 mRNA expression was detected via qRT-PCR, and autophagosome formation was observed using transmission electron microscopy (TEM). **Results**

HE staining showed that the epidermal structure in the blank group was orderly and evenly thick, while the model group exhibited uneven epidermal thickness. In the moxibustion group, the epidermis was well-structured, smooth, and uniform, with densely arranged dermal layers; the epidermis in the vitamin E group was thicker than that in the model group. Compared with the blank group, the model group exhibited decreased skin moisture content and reduced level of Collagen I and collagen III, reduced SOD, CAT, and GSH-Px activity in skin tissue, increased H_2O_2 and MDA activity, elevated p62 protein and mRNA expression, reduced LC3 and Beclin-1 protein and mRNA expression ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, the moxibustion group showed significant improvement in all these indicators ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); whereas the vitamin E group did not show a statistically significant difference in Collagen I and collagen III levels ($P > 0.05$). TEM results showed that, compared with the blank group, the model group had atrophic skin cells, extensive mitochondrial vacuolization, and degraded cellular structures; the moxibustion group exhibited crescent- or cup-shaped autophagosomes with a significantly increased number of autophagosomes per unit area, whereas the vitamin E group showed less improvement than the moxibustion group. **Conclusion** Moxibustion at "Guanyuan (CV 4)" may alleviate skin photoaging by regulating oxidative stress imbalance, modulating cellular autophagy, and promoting collagen synthesis, thereby slowing the aging process of the skin.

Keywords photoaging; skin aging; moxibustion; Guanyuan (CV 4); autophagy; oxidative stress; collagen

(收稿日期: 2024-09-16; 修回日期: 2025-01-09)

[编辑: 邓媛]