

## 含维生素C、维生素E和阿魏酸的外用复合抗氧化制剂对UV导致中国女性皮肤光损伤的保护功效

众所周知,连续的紫外线(UV)照射可导致日晒伤、红斑、水肿、光老化和皮肤癌在内的多种皮肤生物学效应。UV照射诱导皮肤细胞水平活性氧簇(ROS)的增加是产生上述现象的机制之一,生成的ROS会损伤表皮和真皮细胞内的脂质、蛋白质和核酸,以及激发皮肤的炎症反应。占紫外线95%的UVA(波长320~400 nm)是导致人皮肤氧化应激反应的主要来源。很多研究发现,累积的UVA照射可诱导细胞DNA损伤,而DNA的损伤可能导致皮肤光老化、致癌基因和肿瘤抑制基因表达的改变,以及皮肤癌的产生。另外,UVB(波长290~320 nm)照射可导致细胞内大分子损伤并诱发ROS生成,生成的ROS(如羟基自由基和超氧离子等)可激活基因、损伤DNA、氧化细胞脂质和蛋白质,最终导致细胞凋亡或坏死。

人类皮肤具有抵御氧化性损伤的防御机制,保护细胞免受光损伤。即由一些酶和非酶类物质组合来清除皮肤内生成的ROS。如果人体持续暴露在UV中,皮肤自身的抗氧化机制将会受到巨大压力,同时生成更多的ROS。因此,需要采取一些必要策略来增强皮肤的抗氧化能力,抵御光损伤。

作为人体的获得性营养物质,维生素C(抗坏血酸)和维生素E(主要是生育酚)能够清除体内自由基,抵御ROS诱导的细胞损伤。维生素C能够直接清除水相的自由基、保护细胞膜;维生素E则通过抑制脂质氧化来清除脂相中的自由基;维生素C和E同时作用能够产生协同效应。阿魏酸是一种大量存在于植物中的高效酚系抗氧化物。已有研究报道阿魏酸可以通过抵御脂质氧化和中和烷氧自由基来保护细胞膜,同时抑制由羟基自由基、一氧化氮和超氧自由基所造成的细胞损伤。当把阿魏酸整合到含维生素C和(或)E的配方中时,可以增强维生素经皮渗透的作用,提高制剂的化学稳定性,其光防护功效两倍于单独使用维生素C和E的配方。

该研究建议外用抗氧化制剂对UV诱导的皮肤损伤做有效补充。这些制剂可以在皮肤内提供数天的抗氧化功效。近年,也有多种植物来源的抗氧化物被证实具有清除皮肤内自由基、抵御皮肤光损伤的功效。该研究旨在探讨含维生素C和E以及阿魏酸的外用复方抗氧化制剂对日光模拟照射所致皮肤光损伤的临床防护功效。

### 一、对象和方法

研究招募了12名18~60岁 Fitzpatrick III型或IV型的中

国健康女性志愿者,均签署了知情同意书。为避免环境日晒的混淆,该研究于冬季进行。

标记出每名志愿者背部4处未受照射的皮肤区域。将复方抗氧化制剂AOx(维生素C和E以及阿魏酸)和该制剂的赋形剂连续4 d分别涂抹于背部标记的两个部位。第4天,对AOx处理部位、赋形剂处理部位和一处空白部位(阳性对照)进行日光模拟照射,剂量为5倍的最小红斑剂量。第4处部位留做阴性对照,既无产品处理也不接受日光模拟照射。对照射后4个部位进行标准照片拍摄,并对红斑形成情况进行比较;红斑指数(EI)值由 Mexameter 18测得,对比照射前后各部位EI值的变化情况。日光模拟照射后24 h对各标记部位皮肤进行组织活检,使用HE和免疫组化染色后进行定量检测,最后对结果进行统计分析。详细方法见原文。

### 二、结果

1. 红斑反应和EI:照射前后对比标准照片发现,阳性对照组出现明显的红斑并伴有轻微水肿,赋形剂组有明显的红斑,而AOx组仅出现轻微的红斑反应。照射前,4个部位的EI值均相似(157.25~174.25,  $P > 0.05$ )。经5个MED照射后,受照射部位的EI值均明显升高:AOx组为375.33,赋形剂组为418.11,阳性对照组为439.89。相比赋形剂组(243.86;  $P = 0.07$ )和阳性对照(266.39;  $P < 0.05$ ),AOx组的EI差值最小(217.97)。

2. 晒伤细胞:晒伤细胞为表皮凋亡的角质形成细胞,是UV诱导的急性损伤。5个MED照射后,赋形剂组(40.08/HPF)和阳性对照组(41/HPF)均观察到了大量晒伤细胞;而AOx组(21.42/HPF;  $P < 0.05$ )则对UV诱导的晒伤细胞有显著抑制。

3. p53:在细胞抑制和凋亡的过程中,p53蛋白起重要作用。已知UV诱导DNA损伤后会激活角质形成细胞内p53蛋白的表达。5个MED照射后,赋形剂组(192.25/HPF)和阳性对照组(198.83/HPF)都观察到了大量p53阳性细胞,而AOx组(142.33/HPF)的p53阳性细胞量较少。阴性对照组为7.25/HPF。

4. 胸腺嘧啶二聚体:UV诱导角质形成细胞内胸腺嘧啶二聚体的产生在皮肤光致癌发生机制中起重要作用。5个MED照射后,赋形剂组(512.83/HPF)和阳性对照组(480.25/HPF)的胸腺嘧啶二聚体阳性细胞的数量显著较多,而AOx组(355.42/HPF)的增幅适中。阴性对照未形成阳性细胞。

5. 朗格汉斯细胞:UV能够刺激表达CD1a的朗格汉斯细胞从表皮迁移至局部淋巴结,导致表皮朗格汉斯细胞减少,引发皮肤免疫抑制。5个MED照射后,赋形剂组(7.33/HPF)及阳性对照组(8.33/HPF)CD1a阳性细胞的数量明显减少,而AOx组(15.73/HPF; $P < 0.05$ )减幅最小。阴性对照内有大量的朗格汉斯细胞(27.92/HPF)。

### 三、讨论

UV可诱导人体皮肤一系列复杂的生化级联反应。简言之,UV会造成细胞内抗氧化物和抗氧化酶的耗竭;导致DNA损伤,产生胸腺嘧啶二聚体和p53的过度表达;还会激活神经内分泌系统导致免疫抑制和神经内分泌介导物质的释放。在ROS诱导组织发生氧化性改变之前,人体会利用一系列低分子质量的抗氧化物来中和ROS,抵御氧化损伤。当自由基产量过多,且细胞无法靠自身的抗氧化机制来中和时,出现了氧化应激。

皮肤中的主要抗氧化物为维生素C与维生素E。维生素C与超氧离子或羟自由基作用,可抑制或阻断UV诱导ROS的生成。维生素C还能影响酪氨酸酶的活性,使氧化型黑素转变为还原型黑素,抑制黑素生成。维生素E是皮肤中主要的脂溶性抗氧化物。维生素E最重要的亚型是 $\alpha$ 生育酚,构成了细胞脂质自由基第一道防线。维生素E已被用于抗老化研究,因为它能清除细胞中沉积的黑素、延缓老化进程。每日口服3g维生素C和2g维生素E,可使皮肤抵御光损伤的能力提高1.5倍,表明这两种维生素具有协同效应。

作为酚系植物抗氧化物,阿魏酸本身也能够清除自由基并抑制自由基合成酶的活性;还能显著提高谷胱甘肽巯基转移酶和醌还原酶的活性,抑制酪氨酸酶活性。之前作者研究已报道将阿魏酸加入维生素C和维生素E外用溶液配方中能提高维生素的化学稳定性,同时通过对比红斑反应和晒伤细胞形成的结果还发现其皮肤光防护功效是单用维生素C和E制剂的两倍。

该研究发现,含维生素C、维生素E和阿魏酸的外用抗氧化制剂(AOx)可抑制日光模拟照射诱导的红斑反应。虽然其EI的平均值上升,但其差值(与照射前的EI差)远低于阳性对照组。对晒伤细胞形成的抑制作用,相比赋形剂组和阳性对照组,AOx可使晒伤细胞的形成降低近一半(21.42/HPF)。皮肤对UV照射的初期反应是皮肤血管扩张,产生红斑。该中国女性志愿者的临床测试结果表明,外用含维生素C、维生素E和阿魏酸的复方抗氧化制剂能明显抑制日光模拟照射诱导的皮肤红斑反应。

研究还发现在未使用产品的阳性对照组中,急性日光模拟照射可诱导p53的过度表达和形成嘧啶二聚体。p53在细胞应激反应中起关键作用,调节应对应激的多种适应性和保护性反应。当正常的细胞接受到DNA损伤或氧化应激的信号时,负责协调细胞生长停滞或凋亡的下游靶基因会启动转录。由于p53基因的突变主要在胸腺嘧啶二聚体的位点发生,因此这种现象是合理的。胸腺嘧啶二聚体是UV诱导DNA损伤的结果,它能够改变DNA的生物功能,已证实涉及多个有害通路,包括红斑和晒伤细胞形成、免疫抑制和肿瘤形成。有研究者指出,阿魏酸、维生素C和维生素E复方制剂能抑制胸腺嘧啶二聚体、半胱天冬酶3和半胱天冬酶7的形成。这种制剂能够降低p53的过度表达和胸腺嘧啶二聚体的形成(降幅分别为25%与30%)。

朗格汉斯细胞能够捕获、提呈和处理感染皮肤的抗原,是表皮中唯一具有表达抗原特异性CD1a的树突细胞。UV照射可抑制皮肤内朗格汉斯细胞介导的免疫反应,诱发皮肤的免疫抑制。该研究发现经5个MED照射后24h,阳性对照组中表达CD1a的朗格汉斯细胞显著降低了70%(27.92/HPF降到8/HPF)。而AOx组的朗格汉斯细胞细胞为15.75/HPF,说明该抗氧化制剂能够保护皮肤内的朗格汉斯细胞抵御光损伤。

综上所述,对于日光模拟照射所造成急性光损伤(包括红斑、晒伤细胞形成、p53过度表达、胸腺嘧啶二聚体形成和LC消耗),含维生素C、维生素E和阿魏酸的外用复方抗氧化制剂均可有效预防,说明该复方制剂具有良好的光防护功效。

防晒霜的使用虽然能够为皮肤提供光防护,但人们日常对防晒霜的使用不当可能会减弱光防护的效力。例如,防晒霜使用剂量不足、使用后极易被擦拭或洗去、没有选择广谱防晒类产品(能够同时抵御UVB和UVA甚至是UVA1的防晒类产品)等。近年的研究证明:使用抗氧化制剂可作为预防UV诱导皮肤光损伤的有效策略,抗氧化制剂能够同时作用在皮肤表面和内部,它的抗氧化功效能够持续数日。因此,同时使用含维生素C、维生素E和阿魏酸的抗氧化制剂和广谱防晒类产品,能够为人们日常生活提供最佳的光防护效果。

[摘自 Wu Y, Zheng X, Xu XG, et al. Protective effects of a topical antioxidant complex containing vitamins C and E and ferulic acid against UV irradiation - induced photodamage in Chinese woman[J]. J Drugs Dermatol, 2013, 12(4): 464-468.]