

冰川水和白雪茶提取物延缓人真皮成纤维细胞衰老的实验研究

陈迪¹, 章漳², 蒋耀权², 方兆华², 丛峰松^{1*}¹上海交通大学生命科学与技术学院, 上海 200240; ²伽蓝(集团)股份有限公司, 上海 200233

摘要: 本文主要研究了冰川水和白雪茶提取物对正常人真皮成纤维细胞的抗衰老作用及其潜在的机制。用冰川水和白雪茶提取物处理正常人真皮成纤维细胞, 检测了不同处理对细胞活性、细胞外基质成分及其水解酶表达水平的影响。结果显示, 冰川水和白雪茶提取物可以提高人真皮成纤维细胞的增殖活性和能量代谢水平, 促进透明质酸和弹性蛋白的表达; 此外, 白雪茶提取物还可以促进 I 型胶原蛋白的表达和下调弹性蛋白酶的 mRNA 表达水平; 两者共同作用时影响更显著。以上研究表明, 冰川水和白雪茶提取物有延缓皮肤衰老的作用, 作用机制与两者可增强成纤维细胞活力, 提高外基质成分的表达水平并抑制部分成分的降解有关。

关键词: 冰川水; 白雪茶; 抗衰老; 成纤维细胞; 细胞活性; 细胞外基质

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.3.020

Anti-aging Effects of Glacial Water and *Thamnia vermicularis* Extract on Human Dermal Fibroblasts

CHEN Di¹, ZHANG Zhang², JIANG Yao-quan², FANG Zhao-hua², CONG Feng-song^{1*}¹School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;²Jala (Group) Co. Ltd, Shanghai 200233, China

Abstract: The objective of this study was to investigate the anti-aging effects of glacier water and *Thamnia vermicularis* extract (TVE) on human dermal fibroblasts (HDF) and their underlying mechanism. The HDF were treated by glacier water and TVE, and then the cell viability, the expression level of extracellular matrix components and corresponding hydrolytic enzymes were examined. The results revealed that both glacier water and TVE can promote the cell proliferation and energy metabolism level of HDF, as well as enhancing cellular content of hyaluronic acid and expression level of elastin. Besides, TVE also showed an ability to up-regulate the expression of collagen I and down-regulate the mRNA expression of elastase. Their efficacy was much more obvious when combining glacier water and TVE together. The results suggested that glacier water and TVE had anti-aging effect on skin through enhancing the cellular activity of HDF and promoting expression of extracellular matrix components as well as inhibiting their degradation.

Key words: glacier water; *Thamnia vermicularis*; anti-aging; human dermal fibroblasts; cell viability; extracellular matrix

皮肤的衰老主要由遗传因素(内源性因素)和环境因素(外源性因素)共同引发。长期暴露在紫外线、电离辐射、烟雾及其他化学污染物下,使得外界环境成为引发皮肤衰老的主要因素^[1]。成纤维细胞是真皮层中最主要的细胞,它与自身分泌的胶原蛋白、弹性蛋白和其他细胞外基质成分共同构成了真皮的主体。大量研究证明,成纤维细胞因其特有的生物学变化,在皮肤衰老的过程中扮演着重要角色^[2]。

白雪茶 [*Thamnia vermicularis* (Sw.) Ach] 又名地茶、太白茶,属地茶科地茶属植物^[3,4],主要分布于海拔 4000 m 左右的雪域高原地带,是雪域高原上天然的保健饮品和药物^[5,6]。白雪茶中含丰富的 Ca、Fe 元素^[4,7],可用于治疗中暑、心中烦热、咳嗽、神经衰弱和高血压等症^[5,6]。到目前为止,从雪茶中已分离出多糖类、缩酚酸类、甾体类等成分,且其丰富的生物学活性已得到验证。如雪茶素具有抗炎和免疫调节功能^[8],羊角衣酸有较强的抗肿瘤活性^[9],松萝酸则具有一定的抗菌活性^[10]。但是,白雪茶在抗衰老美容方面的作用至今尚无报道。以往研究表明,氧对生命体的生存发展和繁衍是有害的,

而自然界中的冰川水具有天然的低氧特性,可改善机体基础代谢水平、延缓衰老,被科学界称之为“生命之水”^[11]。本研究通过检测冰川水和白雪茶提取物对人真皮成纤维细胞的细胞活性,以及对细胞外基质中衰老相关指标的代谢水平的影响,来探讨其延缓皮肤衰老的机制,为其在化妆品领域的应用提供科学依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞株

成人真皮成纤维细胞(human dermal fibroblasts, HDF),购自美国 ScienCell 公司。

1.2 材料与试剂

冰川水和白雪茶提取物由伽蓝(集团)股份有限公司提供;DMEM 培养基干粉和 0.05% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)溶液(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Corning 公司);磷酸缓冲液(PBS)、四甲基偶氮唑盐(MTT)细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司);三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒(碧云天公司);透明质酸酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国 R&D Systems 公司);兔抗人 I 型胶原蛋白抗体、兔抗人弹性蛋白抗体(英国 Abcam 公司);驴抗兔荧光二抗(LI-COR 公司);RNAfast200—总 RNA 极速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司);PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 反转录试剂盒和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] Perfect Real Time[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.3 主要仪器

倒置显微镜(尼康公司 Ti 系列);全波长酶标仪(PE 公司 ENSPIRE 2300 型);荧光定量 PCR 仪(Eppendorf 公司 realplex 4 s 型);多功能台式离心机(Eppendorf 公司 5810/5810 R 型);电子分析天平(梅特勒托利多公司 ME203E 型)。

2 实验方法

2.1 培养基及药物配制

以超纯水和冰川水分别配制含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基;将白雪茶提取物用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基稀释至终浓度为 0.01%,并用 0.22 μm 滤膜过滤除菌,待后续实验使用。以超纯水 DMEM 培养基培养的 HDF 作为对照,分别以冰

川水 DMEM 培养基、含 0.01% 白雪茶提取物的超纯水 DMEM 培养基、含 0.01% 白雪茶提取物的冰川水 DMEM 培养基培养 HDF 作为冰川水组、提取物组和冰川水 + 提取物组。

2.2 细胞培养

将原代的人真皮成纤维细胞 HDF 接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、相对饱和湿度的细胞培养箱中培养,2~3 d 传代一次,选取第 4~6 代状态良好处于对数生长期的细胞用于实验。

2.3 MTT 法测定 HDF 增殖活性

参考文献方法^[12],收集生长状态良好的对数生长期细胞并调整浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,每组设 6 个复孔。待细胞完全贴壁后,按照对照组、冰川水组、提取物组和冰川水 + 提取物组进行处理,在 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,加入 50 μL MTT 溶液继续培养 4 h,吸净 MTT 后每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO),振荡 10 min 后用酶标仪测定波长 490 nm 处吸光值。

2.4 生物荧光法检测细胞 ATP 水平

取生长状态良好的对数生长期细胞按照 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度接种于 6 孔板。经过 4 种不同处理 24 h 后,按照试剂盒说明书进行操作,用全波长酶标仪检测样品荧光值,根据荧光均值及标准曲线计算出 HDF 细胞内 ATP 含量。

2.5 ELISA 法检测透明质酸的表达

将生长接近融合的细胞进行同步化处理—换用无血清 DMEM 培养基饥饿 12 h,经过 4 种不同处理培养 24 h,收集细胞培养上清液备用。按照透明质酸 ELISA 试剂盒说明书进行操作,用酶标仪测定波长 450 nm 处的吸光值,根据绘制的标准曲线计算 HDF 细胞外基质中透明质酸含量。

2.6 免疫印迹法(Western Blot)法检测 I 型胶原蛋白与弹性蛋白的表达

收集药物处理好的 HDF,按照 BCA 试剂盒说明书提取总蛋白并计算蛋白浓度,以对照组蛋白浓度为标准调整处理组蛋白浓度。配制蛋白胶,各组取等质量的蛋白样品约 50 μg ,进行 SDS-PAGE 电泳分离后,将蛋白转移至 PVDF 膜,用脱脂奶粉封闭,4 $^{\circ}\text{C}$ 下一抗孵育过夜,洗涤后加入二抗室温孵育 1 h,通过化学发光成像系统进行分析,比较目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)条带吸光度的相对比值。

2.7 实时定量 PCR 法检测基质金属蛋白酶 1 (MMP-1) 和弹性蛋白酶 (Elastase) 的表达

分别按照 RNAfast200-总 RNA 极速抽提试剂盒和 PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 反转录试剂盒说明书提取总 RNA 并进行逆转录反应;根据 Elastase 和 MMP-1 的基因序列,设计合成引物如下。MMP-1:上游引物 5'-GTTCCCAAAATCCTGTC-CA-3',下游引物 5'-AACATCACTTCTCCCCGAAT-3';Elastase:上游引物 5'-CGTGGCGAATGTA-AACGTC-3',下游引物 5'-TGAGCTGGAGAAT-CACGATG-3'。按照 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 30 s,95 °C 15 s,60 °C 1 min,95 °C 15 s 的条件进行实时定量 PCR 反应,共 45 个循环。各指标各 3 个重复,取平均 Ct 值,以 GAPDH 为内参基因,采用相对定量法,目的基因的相对表达含量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2.8 统计方法

数据以表示;采用 SPSS Statistics 19.0 进行数据分析,多组间采取单因素方差分析,两两比较采用 LSD 和 S-N-K 法(方差齐性)和 Dunnett T3 法(方差不齐), $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 冰川水和白雪茶提取物对 HDF 增殖活性的影响

参考预实验结果,选取 HDF 增殖活性最高时的提取物处理浓度与处理时间进行本实验,即白雪茶提取物的处理浓度和时间分别为 0.01% 和 24 h。由 MTT 结果(图 1)可知,与对照组相比,冰川水和白雪茶提取物处理后 HDF 的增殖活性都有显著提

高($P < 0.01$)且两者的作用无明显差异;两者共同作用时,促进 HDF 增殖的效果更加显著,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

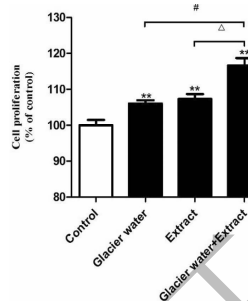


图 1 不同处理对 HDF 增殖活性的影响

Fig. 1 Effect of different treatments on the proliferation activity of HDF

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与冰川水组比较, # $P < 0.01$;与提取物组比较, Δ $P < 0.01$

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$; Compared with glacier water, # $P < 0.01$; Compared with extract, Δ $P < 0.01$

3.2 冰川水和白雪茶提取物对 HDF ATP 水平的影响

ATP 检测结果如表 1 所示,与对照组相比,冰川水和提取物都提高了 HDF 的 ATP 水平,促进了细胞的能量代谢,差异有统计学意义($P < 0.01$);白雪茶提取物相较冰川水对成纤维细胞能量代谢的促进作用更强。与细胞增殖活性结果类似,冰川水和白雪茶提取物在同时作用时细胞内 ATP 水平提高更显著,且差异有统计学意义。提示冰川水和白雪茶提取物对提高成纤维细胞的 ATP 水平存在协同作用。

表 1 不同处理对 HDF ATP 水平的影响 (nmol/L)

Table 1 Effect of different treatments on the ATP level of HDF

	组别 Group			
	对照组 Control	冰川水组 Glacier water	提取物组 Extract	冰川水 + 提取物组 Glacier water + Extract
ATP 水平 ATP level	58.74 ± 4.66	142.92 ± 8.52 **	172.24 ± 4.43 **	271.0186 ± 17.92 * * # Δ

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$;与冰川水组比较, # $P < 0.01$;与提取物组比较, Δ $P < 0.01$

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$; Compared with glacier water, # $P < 0.01$; Compared with extract, Δ $P < 0.01$

3.3 冰川水和白雪茶提取物对 HDF 透明质酸含量的影响

采用 ELISA 法检测 HDF 细胞外基质中的透明质酸含量。结果(表 2)显示,冰川水处理后细胞外基质中的透明质酸含量较对照组提高,差异有统计学意义($P < 0.05$);白雪茶提取物也能够促进透明

质酸含量的增加,且差异更加显著($P < 0.01$)。当两者同时作用于成纤维细胞时,检测到细胞外基质中透明质酸略高于白雪茶提取物单独处理后的透明质酸含量,两组处理间无显著差异。提示白雪茶提取物是促进透明质酸含量增加的主要因素。

表 2 不同处理对 HDF 透明质酸含量的影响 (ng/mL)

Table 2 Effect of different treatments on content of hyaluronic acid in HDF

透明质酸含量 Hyaluronic acid content	组别 Group			
	对照组 Control	冰川水组 Glacier water	提取物组 Extract	冰川水 + 提取物组 Glacier water + Extract
	26.43 ± 0.37	27.49 ± 0.27 *	32.06 ± 0.44 **	32.19 ± 0.48 * * #

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;与冰川水组比较, # $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compare with glacier water, # $P < 0.01$.

3.4 冰川水和白雪茶提取物对胶原蛋白和弹性蛋白表达的影响

通过免疫印迹法检测细胞外基质中 I 型胶原蛋白和弹性蛋白的表达水平。由图 2 和图 3 结果可知,经冰川水处理后,人真皮成纤维细胞弹性蛋白表达显著上调,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),而 I 型胶原蛋白表达无明显变化;白雪茶提取物则同时上调两种蛋白的表达水平,作用相较冰川水更为明显 ($P < 0.01$);冰川水和白雪茶提取物共同作用时,对 I 型胶原蛋白和弹性蛋白表达的促进作用更显著。

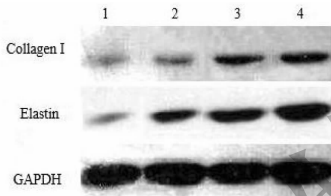


图 2 不同处理对 I 型胶原蛋白和弹性蛋白表达的影响 (电泳图)

Fig. 2 Effect of different treatments on expression of Collagen I and Elastin

注:1. 对照组;2. 冰川水组;3. 提取物组;4. 冰川水 + 提取物组

Note: 1. Control; 2. Glacier water; 3. Extract; 4. Glacier water + Extract

3.5 冰川水和白雪茶提取物对 MMP-1 和 Elastase mRNA 表达水平的影响

由图 4A 可知,冰川水和白雪茶提取物未对 HDF 中 MMP-1 的 mRNA 表达水平产生影响;由图 4B 可知,与对照组相比,冰川水处理后 HDF 中 Elastase 的 mRNA 表达水平无明显变化,而白雪茶提取物处理后, Elastase 的 mRNA 水平有显著下调 ($P < 0.01$),提示白雪茶提取物处理可以抑制 HDF 中 Elastase 在转录水平上的表达,从而减少弹性蛋白的降解;冰川水和提取物共同处理对 Elastase 的抑制作用更显著 ($P < 0.01$)。

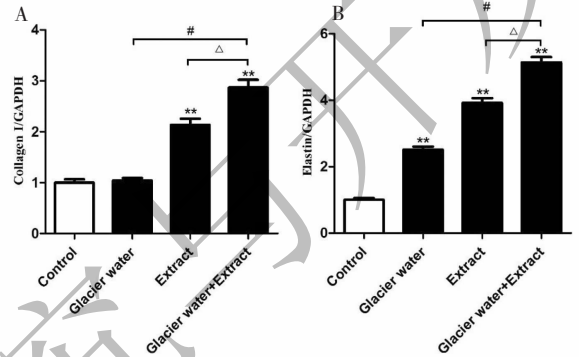


图 3 不同处理对 I 型胶原蛋白和弹性蛋白表达的影响 (统计图)

Fig. 3 Effect of different treatments on expression of Collagen I and Elastin

注:A. 不同处理对 I 型胶原蛋白表达的影响;B. 不同处理对弹性蛋白表达的影响。与对照组比较, ** $P < 0.01$;与冰川水组比较, # $P < 0.01$;与提取物组比较, $\Delta P < 0.01$

Note: A. Effect of different treatments on expression of Collagen I; B. Effect of different treatments on expression of Elastin. Compared with control, ** $P < 0.01$; Compared with glacier water, # $P < 0.01$; Compared with extract, $\Delta P < 0.01$

4 讨论与结论

皮肤覆盖于体表,是个体与社会其他成员间的“社交界面”,其衰老也就成为个体衰老最直观的表现,这也是皮肤学与化妆品产业领域致力于抗皮肤衰老研究的主要原因^[13]。皮肤由表皮层、真皮层和皮下组织三部分构成。相较于表皮,真皮层在皮肤衰老的过程中呈现出更明显的变化^[14]。成纤维细胞是真皮结缔组织中最主要的细胞,其细胞活性的降低是皮肤衰老过程中的重要表现^[15]。细胞活性主要体现在细胞的新陈代谢水平和细胞的增殖能力等方面^[16]。活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能将黄色的 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色甲臞并沉积在细胞中,可间接反映活细胞数量,即细胞增殖活性。ATP 是活细胞最基本的能量来源,在细胞各

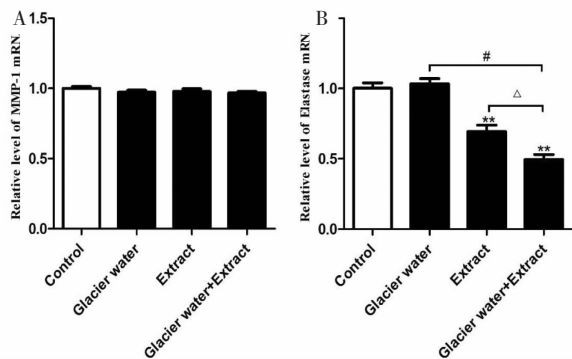


图4 不同处理对HDF中MMP-1和Elastase表达的影响
Fig. 4 Effect of different treatments on mRNA expression of MMP-1 and Elastase in HDF

注:A.不同处理对MMP-1 mRNA表达的影响;B.不同处理对Elastase mRNA表达的影响。与对照组比较, ** $P < 0.01$;与冰川水组比较, # $P < 0.01$;与提取物组比较, $\Delta P < 0.01$

Note: A. Effect of different treatments on mRNA expression of MMP-1 in HDF; B. Effect of different treatments on mRNA expression of Elastase in HDF. Compared with control, ** $P < 0.01$; Compared with glacier water, # $P < 0.01$; Compare with extract, $\Delta P < 0.01$

种生理活动中起着重要作用。ATP水平可以及时反映细胞线粒体功能,从而反映细胞活性^[17]。本研究通过MTT法检测了成纤维细胞的增殖活性,根据荧光素酶由ATP提供能量催化荧光素产生荧光检测了成纤维细胞的ATP水平。实验结果显示,冰川水和白雪茶提取物能够提高成纤维细胞的增殖活性和能量代谢水平,显示出其在增强皮肤细胞活性、促进新陈代谢、延缓皮肤衰老功能上的巨大潜力。

皮肤衰老过程中的另一重要变化是细胞外基质成分的降解。胶原蛋白是真皮中含量最丰富的蛋白,使皮肤保持一定的强度和弹性。当皮肤衰老时,胶原蛋白中含量最高的I型胶原所占比重逐渐降低、胶原纤维交联异常,进而导致皱纹的出现^[18]。弹性纤维在真皮层中形成精密的网状结构,对于保持皮肤弹性、防止变形具有重要意义。衰老的皮肤中弹性蛋白含量减少,弹性纤维增粗、聚集成团,皮肤失去弹性,呈松弛状态^[1]。已有研究表明,皮肤光老化过程中胶原蛋白与弹性纤维含量的降低源于其合成速率的减缓、降解速率的加快,或者两者的共同作用^[19,20]。由成纤维细胞分泌的基质金属蛋白酶(MMPs)和弹性蛋白酶是胶原蛋白和弹性蛋白的主要水解酶。基质金属蛋白酶1(MMP-1),又称间质胶原酶,特异性降解皮肤中的I型和III型胶原蛋白^[21];人皮肤成纤维弹性蛋白酶分布于细胞膜上,

可快速降解真皮乳头层中的弹性纤维。免疫印迹法实验结果显示,经冰川水处理后,细胞外基质中弹性蛋白表达水平均显著提高;而白雪茶提取物则能够同时促进I型胶原蛋白和弹性蛋白的表达。在mRNA水平,荧光定量检测结果显示白雪茶提取物可抑制弹性蛋白酶的表达,而对基质金属蛋白酶1没有明显作用。推测白雪茶提取物可能通过促进细胞外基质中胶原蛋白和弹性蛋白的合成或抑制其降解,保持皮肤弹性,防止皮肤松弛与下垂。在冰川水的协同下,白雪茶提取物的作用更加显著。因为冰川水和白雪茶提取物在转录水平上对MMP-1的表达无显著作用,因此实验下一步将继续探究冰川水和白雪茶提取物对MMP-1蛋白表达水平的影响。

透明质酸是细胞外基质中一类重要的非硫酸化粘多糖,在维持皮肤含水量、调节生理平衡和渗透压等方面发挥重要功能^[1,14]。皮肤中的透明质酸随着年龄增加而逐渐流失,因此,透明质酸含量的提高有利于维持皮肤的生理平衡,减缓衰老的速度^[22]。本研究表明,冰川水与白雪茶提取物处理后,成纤维细胞中透明质酸含量提高,推测二者可以促进成纤维细胞分泌透明质酸,而透明质酸的降解代谢还需进一步探究。

寻找天然有效成分以延缓皮肤衰老,是近年来国内外化妆品研究的热点之一。一些天然活性成分,如多糖、黄酮、多酚、生物碱和皂苷等,它们具有清除体内自由基、修复紫外线损伤、促进皮肤成纤维细胞分裂增殖及生长因子分泌、增加胶原蛋白含量等多种抗皮肤衰老作用^[23]。初步成分分析显示雪茶提取物含有31.5%总糖,3.8%黄酮,1.8%多酚和4.1%蛋白,但是针对雪茶抗皮肤衰老作用的活性成分和作用机理有待更加深入的考察确认。

综上所述,冰川水和白雪茶提取物皆可提高人真皮成纤维细胞的增殖活性和能量代谢水平,促进透明质酸和弹性蛋白的表达;此外白雪茶提取物还有促进I型胶原蛋白的表达和抑制弹性蛋白酶的作用,从而保持皮肤弹性和较高含水量,以延缓皮肤衰老。当两者协同作用时,效果更为显著。本研究为冰川水和白雪茶提取物在功能化妆品中的应用提供了必要的科学依据,但二者的协同作用及延缓皮肤衰老的具体分子机制尚需进一步探究。

参考文献

- 1 Makrantonaki E, Zouboulis CC. Molecular mechanisms of

- skin aging: state of the art [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2007, 1119:40-50.
- 2 Makrantonaki E, Zouboulis CC. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2) [J]. *Exp Gerontol*, 2007, 42: 879-886.
 - 3 Cheng Z(程攀). Current research and exploitation of *Thamnoia vermicularis* in Yunnan [J]. *J Anhui Agri Sci* (安徽农业科学), 2015, 43: 289-290.
 - 4 Han BQ(韩碧群), Peng Y(彭勇). Exploitation and current research of *Thamnoia vermicularis* [J]. *Modern Chin Med* (中国现代中药), 2012, 14(6): 63-67.
 - 5 Luo H, Ren M, Lim KM, et al. Antioxidative activity of lichen *Thamnoia vermicularis* *in vitro* [J]. *Mycobiology*, 2006, 34: 124-127.
 - 6 Li C, Guo XD, Lei M, et al. *Thamnoia vermicularis* extract improves learning ability in APP/PS1 transgenic mice by ameliorating both A β and Tau pathologies [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38: 9-28.
 - 7 Fu H(付惠), Wang LS(王立松), Chen YH(陈玉惠), et al. A study on nutritional components of two different lichen teas from Yunnan [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 340-343.
 - 8 Omarsdottir S, Freysdottir J, Olafsdottir ES. Immunomodulating polysaccharides from the lichen *Thamnoia vermicularis* var. *subuliformis* [J]. *Phytomedicine*, 2007, 14: 179-184.
 - 9 Guo J, Li ZL, Wang AL, et al. Three new phenolic compounds from the lichen *Thamnoia vermicularis* and their antiproliferative effects in prostate cancer cells [J]. *Planta Med*, 2011, 77: 2042-2046.
 - 10 Zhao Y(赵颖), Song D(宋丹), Zhong GY(钟国跃), et al. Determine the usnic acid in *Thamnoia subuliformis* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2009, 40(Suppl): 281-282.
 - 11 Liu GX(刘光琇), Pan YF(潘有福), Lu W(陆卫). The biological effect of glacier water in Qilian mountains [J]. *J Glaciol Geocryol* (冰川冻土), 2004, 26: 784-787.
 - 12 Zhang YR(张亚茹), Wu S(吴晟), Jiang YF(姜银凤), et al. Effect of deuterium-depleted water on skin fibroblast and melanoma cells [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 96-100.
 - 13 Robert L, Labat-Robert J, Robert AM. Physiology of skin aging [J]. *Pathol Biol*, 2009, 57: 336-341.
 - 14 Stern R, Maibach HI. Hyaluronan in skin; aspects of aging and its pharmacologic modulation [J]. *Clin Dermatol*, 2008, 26: 106-122.
 - 15 Hwang KA, Yi BR, Choi KC. Molecular mechanisms and *in vivo* mouse models of skin aging associated with dermal matrix alterations [J]. *Lab Anim Res*, 2011, 27: 1-8.
 - 16 Greig AVH, James SE, McGrouther DA, et al. Purinergic receptor expression in the regenerating epidermis in a rat model of normal and delayed wound healing [J]. *Exp Dermatol*, 2003, 12: 860-871.
 - 17 Li L(李磊), Yang YH(杨雨晗), Wang S(王双), et al. Comparison of cellular activity detection methods [J]. *J Biol* (生物学杂志), 2011, 28: 87-90.
 - 18 Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology [J]. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 2011, 19: 229-234.
 - 19 Varani J, Spearman D, Perone P, et al. Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen *in vitro* [J]. *Am J Pathol*, 2001, 158: 931-942.
 - 20 Makrantonaki E, Zouboulis CC, William J. Cunliffe Scientific Awards. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin [J]. *Dermatology*, 2007, 214: 352-360.
 - 21 Quan T, Qin Z, Xia W, et al. Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2009, 14: 20-24.
 - 22 Tammi RH, Tammi MI. Hyaluronan accumulation in wounded epidermis; a mediator of keratinocyte activation [J]. *J Invest Dermatol*, 2009, 129: 1858-1860.
 - 23 Tundis R, Loizzo MR, Bonesi M, et al. Potential role of natural compounds against skin aging [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22: 1515-1538.