

壳聚糖- β -环糊精/透明质酸杂化水凝胶抗皮肤光老化作用的实验研究

王海苗^{1,2,4}, 应 艺³, 王逸男^{1,2}, 韩愚弟^{1,2}, 陈 力^{1,4}

¹解放军医学院, 北京 100853; ²解放军总医院第一医学中心整形修复科, 北京 100853; ³中国中医科学院青蒿素研究中心, 北京 100700; ⁴解放军总医院第一医学中心全科医学科, 北京 100853

摘要:背景 光老化是皮肤长期暴露于紫外线所致的慢性损伤过程, 最终导致皮肤松弛、皱纹加深及屏障功能下降, 因此开发对抗皮肤光老化的新型材料具有重要临床意义。目的 构建一种新型壳聚糖- β -环糊精/透明质酸杂化水凝胶(chitosan- β -cyclodextrin/hyaluronic acid hybrid hydrogel, CS- β -CD-HAs), 以实现HA的无创高效递送, 并系统评估其在动物体内对抗皮肤光老化的功效及潜在机制。方法 制备CS- β -CD-HAs, 并利用X-射线衍射、傅里叶变换红外光谱、扫描电子显微镜及流变学等技术对其进行全面理化表征; 将9只SD大鼠随机分为空白对照组、CS- β -CD-HAs组及超纯水组, 每组3只, 分别测定皮肤水分含量以评估其保湿能力; 将20只SD大鼠随机分为空白对照(Control)组、光老化模型(Model)组、水凝胶外用(CS- β -CD-HAs)组与HA注射(INJ-HAs)组, 每组5只, 通过UVA+UVB递增照射大鼠背部皮肤建立光老化模型, 从大体观察及光老化外观评分、组织病理学(H&E、天狼猩红染色)、基因表达(RT-qPCR检测Col-1、Col-3、Elastin、Mmp-3)及生化指标[羟脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)含量、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量]等多维度评估治疗效果。结果 CS- β -CD-HAs呈现稳定的三维多孔网络结构, 具有良好的溶胀性、自愈合特性及优异的透皮性能。细胞实验表明, CS- β -CD-HAs可显著促进人皮肤成纤维细胞增殖与迁移, 具有良好的细胞相容性。动物实验表明, CS- β -CD-HAs无创外用可提高皮肤水合能力($P<0.001$); 与Model组相比, CS- β -CD-HAs可改善光老化皮肤外观评分($P<0.001$), 减轻了真皮胶原流失($P<0.001$), 上调Col-1、Col-3和Elastin mRNA表达($P<0.05$), 抑制Mmp-3 mRNA表达($P<0.01$), 提升Hyp含量($P<0.05$), 增强SOD活性($P<0.05$)并降低MDA含量($P<0.05$); 且与注射同分子量透明质酸相比, 两种给药方式的抗光老化效果无明显统计学差异。结论 本研究证实CS- β -CD-HAs是一种高效的非侵入性HA递送材料, 能够通过维持细胞外基质稳态与减轻氧化应激损伤有效改善皮肤光老化。

关键词:透明质酸; 光老化; 水凝胶; 壳聚糖; 环糊精

中图分类号: R758

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2026)05-0484-13

DOI: 10.12435/j.issn.2095-5227.25112901

引用本文: 王海苗, 应艺, 王逸男, 等. 壳聚糖- β -环糊精/透明质酸杂化水凝胶抗皮肤光老化作用的实验研究 [J]. 解放军医学院学报, 2026, 47 (5): 484-496.

Chitosan- β -cyclodextrin/hyaluronic acid hybrid hydrogel for skin photoaging: An experimental study

WANG Haimiao^{1,2,4}, YING Yi³, WANG Yinan^{1,2}, HAN Yudi^{1,2}, CHEN Li^{1,4}

¹Chinese PLA Medical School, Beijing 100853, China; ²Department of Plastic and Reconstructive Surgery, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China; ³Artemisinin Research Center, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; ⁴Department of General Practice, the First Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: CHEN Li. Email: chenli@301hospital.com.cn

Abstract: Background Developing innovative non-invasive formulations against skin photoaging is of considerable importance. **Objective** To develop a novel chitosan- β -cyclodextrin/hyaluronic acid hybrid hydrogel (CS- β -CD-HAs) for the non-invasive and efficient delivery of HA, and evaluate its efficacy against skin photoaging *in vivo*. **Methods** CS- β -CD-HAs were prepared and characterized using X-Ray diffraction, fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope, and rheology. Nine SD rats were randomly divided into blank control group, CS- β -CD-HAs group, and ultrapure water group to assess skin hydration capacity. Twenty SD rats were randomly divided into control group, photoaging model group, hydrogel topical application group (CS- β -CD-HAs), and HA injection group (INJ-HAs). A photoaging model was established on the dorsal skin of rats by incremental exposure to UVA and UVB irradiation. Therapeutic effects were evaluated through macroscopic observation and

收稿日期: 2025-11-29

第一作者: 王海苗, 在读硕士, 主治医师。Email: Melody_1124@163.com

通信作者: 陈力, 博士, 主任医师, 教授。Email: chenli@301hospital.com.cn

photoaging scoring, histopathology (HE and Sirius Red staining), gene expression (RT-qPCR analysis of Col-1, Col-3, Elastin, and Mmp-3 mRNA), and biochemical assays (Hyp content, SOD activity, and MDA content). **Results** The successfully prepared CS- β -CD-HAs exhibited a stable three-dimensional porous network structure with good swelling capacity, self-healing properties, and excellent transdermal performance. Cell experiments showed that CS- β -CD-HAs significantly promoted the proliferation and migration of human skin fibroblasts, indicating good cytocompatibility. Animal experiments demonstrated that topical application of CS- β -CD-HAs significantly enhanced skin hydration capacity ($P<0.001$). Compared with the Model group, CS- β -CD-HAs treatment improved the macroscopic photoaging score ($P<0.001$), alleviated dermal collagen loss ($P<0.001$), upregulated mRNA expression of Col-1, Col-3, and Elastin ($P<0.05$), suppressed Mmp-3 mRNA expression ($P<0.01$), increased Hyp content ($P<0.05$), enhanced SOD activity ($P<0.05$), and reduced MDA levels ($P<0.05$). No statistically significant difference in anti-photoaging efficacy was observed between topical application of CS- β -CD-HAs and injection of the same molecular weight HA. **Conclusion** CS- β -CD-HAs prove to be an efficient non-invasive HA delivery material, effectively ameliorating skin photoaging by maintaining extracellular matrix homeostasis and mitigating oxidative stress damage.

Keywords: hyaluronic acid; photoaging; hydrogel; chitosan; cyclodextrin

Cited as: Wang HM, Ying Y, Wang YN, et al. Chitosan- β -cyclodextrin/hyaluronic acid hybrid hydrogel against skin photoaging: An experimental study[J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2026, 47(5): 484-496.

光老化是皮肤暴露于紫外线(ultraviolet ray, UV)辐射后引发的损伤过程,UV被广泛认为是导致光老化的首要因素。UV辐射可导致日晒伤、外源性光感性皮炎,甚至诱发鳞状细胞癌等皮肤恶性肿瘤,严重危害人类健康^[1-2]。透明质酸(hyaluronic acid, HA)作为皮肤细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的关键成分,能维持细胞外空间的稳定、保持皮肤弹性并促进细胞修复,其含量与分子量随年龄增长及紫外线照射逐渐下降。因此,外源性补充HA成为缓解皮肤光老化的潜在策略之一。高分子量透明质酸(>1 000 kDa)虽具有更佳的抗炎、抗氧化特性,却因分子量超过500 Da而难以穿透皮肤角质层抵达真皮层^[3-4]。现有化学促渗或物理注射等方法存在破坏皮肤屏障或引发感染等风险^[5]。此外,目前关于HA抗光老化机制的研究多集中于体外细胞实验,仅有少量体内动物实验对其机制进行了进一步验证与分析^[6]。

水凝胶(hydrogel)具有良好的生物相容性和负载功能性分子的能力,作为ECM的类似物和治疗载体,在药物递送和组织工程等领域表现出巨大潜力^[7]。壳聚糖(chitosan, CS)与 β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)均为具有良好生物相容性的天然多糖材料,二者复合体系在生物材料领域已有一定研究基础^[8-9]。因此,本研究将尝试制备一种透明质酸杂化水凝胶(chitosan- β -cyclodextrin/hyaluronic acid hybrid hydrogel, CS- β -CD-HAs)以解决中、高分子量透明质酸透皮难题^[1],并验证其在皮肤光老化模型中的抗衰老作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与设备

透明质酸(华熙生物科技有限公司,中国)、壳聚糖、环糊精、0.5%醋酸、0%水合氯醛、无水乙醇、多聚甲醛、异丙醇等(北京化学试剂公司,中国),HE染色试剂盒、天狼猩红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,中国);M-MLV逆转录酶、TB Green® Premix Ex Taq™ II、DL2000 DNA Marker、dNTP(10 mmol/L)、RNase-free H₂O(宝生物工程大连有限公司,中国);DNase I、RNase Inhibitor、6×Loading Dye、RL 6, 000 RNA Marker (Fermentas公司,美国);引物(北京天一辉远生物科技有限公司,中国);超氧化物歧化酶比色法测试盒、丙二醛比色法测试盒、羟脯氨酸比色法测试盒(伊莱瑞特生物科技股份有限公司,中国);UVA及UVB紫外线灯管(医献川谷照明专卖店,中国);皮肤含水量测定仪(Corneometer,德国)。

1.2 杂化水凝胶的制备

将 β -CD分散于去离子水中,边搅拌边滴加NaOH溶液反应一定时间后,升温至35~45℃,依次加入LiH、LiI和3-溴丙烯继续反应2~4 h,当反应液完全澄清且继续搅拌30 min无变化时,以此衍生物溶液为原料,经盐酸调至中性后加入壳聚糖,在惰性气氛下依次滴加硫酸亚铁溶液与过氧化氢溶液(30% w/w),反应2~4 h。当颜色不再加深、气泡停止产生时将反应产物滤出,依次用水和乙醇洗涤,3 500 g离心5 min,重复2~5次,干燥至恒重,即得壳聚糖基环糊精聚合物。将低分子量(LHA, <10 kDa)、中分子量(MHA, 20~

50 kDa)、高分子量(HHA, 1 100 ~ 1 400 kDa) 3种分子量的透明质酸按质量比1:1:1溶解于去离子水中,加入EDC及NHS活化20~30 min后,加入上述壳聚糖基环糊精聚合物,室温下搅拌反应20 h,最终制得CS- β -CD-HAs。

1.3 CS- β -CD-HAs的结构及性能表征

将所得溶液在室温下旋转蒸发去除溶剂,得到黏稠状流体;将其转移至冷冻干燥箱预冻并冻干,得到白色固体,即为CS- β -CD-HAs粉末。后续表征均以此粉末为检测样品。

1.3.1 X射线衍射实验检测材料物相及结晶状态 采用广角X射线衍射(X-ray diffraction, XRD)对冻干后的CS- β -CD-HAs进行结构解析。实验使用日本理学Rigaku Ultima IV型多晶衍射仪,配置铜靶X射线源(辐射波长 $\lambda=1.5406\text{ \AA}$)。测试条件设定为:工作电流设定25 mA,工作电压设定35 kV,扫描范围设定 2θ 为 $5^\circ\sim40^\circ$,扫描步长为 0.02° ,扫描速度为 $2^\circ/\text{min}$ 。

1.3.2 傅里叶变换红外光谱实验检测材料特征性官能团 采用傅里叶变换红外光谱技术对材料的特征性官能团进行分子结构表征。实验采用透射模式,光谱分辨率设定为 4 cm^{-1} ,通过32次扫描累加提升信噪比,光谱采集范围覆盖中红外区 $400\sim4\,000\text{ cm}^{-1}$ 。使用OMNIC软件对光谱数据进行基线校正和峰位归属分析。

1.3.3 热重及差热分析实验检测材料热稳定性 利用热重分析仪测定凝胶的热分解信息,仪器由瑞士METTLER-TOLEDO公司生产,型号为TGA/SDTA851e,测试温度为 $25\sim800^\circ\text{C}$,气氛为空气。

1.3.4 旋转流变实验检测材料流变学性能 采用英国Malvern公司生产的Kinexus ultra+型流变仪(配备Peltier温控系统及40 mm平行板夹具),在 25°C 恒温环境和 1 rad/s 角频率条件下,通过多级应变扫描策略系统分析CS- β -CD-HAs的流变特性。第一阶段(低应变区):施加0.05%应变并维持200 s,采集储能模量(G')与损耗模量(G'')数据,该阶段用于表征材料的微观弹性网络结构。第二阶段(高应变区):将应变力提升至100%并维持200 s,重复模量测定,此过程模拟注射填充过程中的机械应力变化,评估材料在极端条件下的稳定性。上述两阶段测试循环进行1次,总实验时长800 s,以确保数据的重复性与可靠性。

1.3.5 溶胀性能测试 称取CS- β -CD-HAs粉末,将其浸入去离子水中进行溶胀实验。在20 h的实验

周期内,每隔5 h取样1次(取样时间点:5、10、15、20 h)。每次取样后使用洁净滤纸吸除表面游离水分,随后采用分析天平测定材料的质量 M_t 。基于以下公式计算溶胀率:

平衡溶胀率 $=[(M_t - m)/m] \times 100\%$ 。公式中, m 为冻干样品的初始质量。

1.3.6 扫描电子显微镜观察CS- β -CD-HAs微观形貌 使用扫描电子显微镜观察并拍摄CS- β -CD-HAs微观形貌。仪器为德国生产的蔡司GeminiSEM450型冷场发射扫描电子显微镜,工作电压为2 kV,二次电子图像分辨率为 $1.0\text{ nm}@1\text{ kV}$ 。

1.3.7 荧光染色透皮实验验证高分子HA透皮性能 分别将中、高分子量HA配制成1% (w/V)水溶液,调节pH至4.5~5.5后,加入EDC/NHS的DMSO溶液进行活化。随后调节pH至7.0~8.0,加入荧光素胺(HA羧基与荧光素胺氨基摩尔比为1:1),室温避光反应24 h。反应结束后,加入4倍体积预冷乙醇沉淀产物,经离心、乙醇洗涤并干燥,即得荧光标记的HA(FL-HA)。将上述FL-HA按前述方法载入,制得荧光标记的CS- β -CD-HAs。另取同等分子量与质量的未标记HA直接溶于超纯水,制得普通HA溶液(normal hyaluronic acid, NORM-HA)作为对照。将乳猪皮肤固定于Franz扩散池,角质层朝向供给室。接收室注入PBS接收液并排尽气泡。在皮肤表面均匀涂抹待测样品,于 $(32\pm1)^\circ\text{C}$ 、300转/min条件下进行透皮实验2 h。实验结束后,取皮肤组织经生理盐水清洗、4%多聚甲醛固定、梯度脱水、透明、浸蜡、包埋及切片。使用激光共聚焦显微镜分别于0、5及10 min观察并记录皮肤各层的荧光强度。

1.3.8 细胞相容性实验 将灭菌后的CS- β -CD-HAs按 $6\text{ cm}^2/\text{mL}$ 的比例浸入含5% FBS的DMEM培养基中,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中静置浸提24 h。收集浸提液,经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,即得100%浓度浸提液原液。取对数生长期的人皮肤成纤维细胞(human skin fibroblasts, HSF),以 5×10^3 细胞/孔的密度接种于96孔板,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中预培养24 h使细胞贴壁。吸弃原培养基后,每孔加入相应液体100 μL ,继续培养24 h。分组处理(每组设6个复孔)。(1)空白组:仅含培养基,无细胞(用于扣除背景);(2)对照组:含5% FBS的DMEM培养基;(3)实验组:含CS- β -CD-HAs浸提液的DMEM培养基;(4)每孔加入相应液体100 μL ,继续培养24 h。培养结束后,每孔加入

10 μ L CCK-8 溶液, 避光孵育 2 h。用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度(A), 并按试剂说明书中的公式计算细胞相对活力。

1.3.9 细胞迁移活性实验 取对数生长期的 HSF, 经胰酶消化后重悬计数, 调整细胞密度至 2.5×10^5 个/mL。在 6 孔板每孔加入 2.0 mL 细胞悬液(即 5×10^5 个细胞/孔), 轻轻十字摇匀使细胞均匀分布。置于 37°C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 使细胞融合至 90% 左右的单层状态。用 200 μ L 无菌枪头在孔板中央垂直用力划出一条直线。吸弃旧培养基, 用无菌 PBS 轻柔冲洗 2 次, 洗去划下的漂浮细胞。实验分组如下: (1) 对照组, 加入含 5% FBS 的 DMEM 培养基 2.0 mL; (2) 实验组, 将 CS- β -CD-HAs 浸提液(100% 浓度)与含 5% FBS 的 DMEM 培养基按 1 : 9 比例混匀(即 200 μ L 浸提液+1 800 μ L 完全培养基), 每孔加入 2.0 mL。加入相应液体后, 于活细胞工作站拍照记录 0、12、24 h 的划痕面积(初始每孔选取 3 ~ 5 个拍照视野, 后期拍照与 0 h 保持同一视野), 每次拍照后将细胞置入培养箱继续培养。使用 Image J 软件分析图像, 测量每张照片的划痕面积并计算细胞迁移率, 计算公式为: 细胞迁移率(%)=(初始划痕面积-观测时间划痕面积)/初始划痕面积 $\times$ 100%。

1.4 杂化水凝胶对 SD 大鼠皮肤的抗光老化作用
1.4.1 动物来源及预处理 雄性 8 周龄、体质量 200 ~ 250 g 的 SD 大鼠 29 只, 购自维通利华实验动物技术有限公司[实验动物生产许可证号: SCXK (京)2021-0006]。室内保持良好通风, 在 22 ~ 24°C、相对湿度 50%、12 h 光/暗循环条件下适应性饲养 1 周。同时在实验期间给予大鼠颗粒饲料、自由饮水及活动, 定期清理垫料。本研究获北京大学医学部动物实验伦理委员会批准(批号: BCJB0025), 实验过程遵循《实验动物福利伦理审查指南》。

1.4.2 皮肤保湿实验 9 只大鼠随机分为 3 组: 空白对照组、CS- β -CD-HAs 组及超纯水组, 每组 3 只。每只大鼠背侧皮肤使用电动剃毛器制备 4.0 cm $\times$ 4.0 cm 脱毛区域作为测试区域。实验前, 先使用皮肤含水量测量仪测定测试区域内皮肤电容值, 随后将 CS- β -CD-HAs 和超纯水分别均匀涂于相应组别大鼠的测试区域, 并于涂抹后 4 h、8 h 分别测定测试区域皮肤电容值并记录。

1.4.3 紫外线皮肤光老化模型的构建及动物分组 将动物随机分为 4 组。A 组为空白对照组(Control):

不给予 UVA 和 UVB 照射, 也不给予任何治疗。B 组为光老化模型组(Model): 只给予 UVA 和 UVB 照射, 不给予任何治疗。C 组为 CS- β -CD-HAs 实验组: 采取 CS- β -CD-HAs 涂抹方式进行治疗, 每周用无菌棉签蘸取 1 mL CS- β -CD-HAs 对治疗区域进行均匀缓慢擦拭涂抹。D 组为同分子量 HA 注射实验组(INJ-HAs): 每周用 30G 尖针头均匀点状注射 1 mL 同分子量 HA。通过 UVA+UVB 混合递增光照法造成皮肤光损伤。实验前已通过预实验确定最小红斑剂量(minimal erythema dose, MED), 测得 MED(UVA)为 1.65 J/cm²; MED(UVB)0.34 J/cm², 单次辐照时间为 20 min。此后分阶段逐步增加照射剂量, 照射时将 SD 大鼠固定于眼部防护装置内, 与光源保持距离 10 cm 垂直距离进行照射。具体方案为: 第一阶段为实验前两周, SD 大鼠隔日接受 1 MED 照射; 第二阶段为动物实验的第三至第四周, 照射剂量增至隔日 2 MED; 第三阶段为动物实验的第五至第八周, 照射剂量增至隔日 3 MED; 整个照射周期为 8 周, 每次照射前均去除背部毛发。一旦观察到动物背部出现水疱、溃疡或糜烂, 立即暂停照射 2 ~ 3 次, 直至上述症状消失(预实验已证实该方案可复现稳定的皮肤光老化变化, 如脱屑、红斑、皱纹等)。

1.4.4 光老化皮肤外观评分 由两位中级及以上职称整形外科医师在盲法条件下观察大鼠背部皮肤外观, 按照皮肤外观评价标准评分并记录, 所得数据进行统计学分析。皮肤外观评价标准^[10]见表 1。

表 1 皮肤外观评价标准	
Tab. 1 Evaluation criteria for skin appearance	
分数	外观特征
0	皮肤光洁、纹理完整、手感细腻
1	正常皮肤纹理, 轻微的纹理破坏
2	正常皮肤纹理消失, 开始出现细小的皱纹, 运动时明显
3	浅皱纹, 细小皱纹增多
4	手感粗糙, 皱纹加深, 颜色暗淡
5	皱纹深, 皮肤纹理深
6	皱纹更多, 同时皮肤可能出现增厚及局部损伤

1.4.5 组织学观察及定量分析 实验完成后, 采用腹腔注射法对所有大鼠进行麻醉, 迅速剪取背部皮肤并去除皮下粘连脂肪, 经生理盐水洗涤后固定、脱水、包埋、切片, 取材结束后处死大鼠。按照试剂盒说明书对组织切片进行 HE 染色和天狼猩红染色, 并进行镜检及全景扫描分析。其中,

天狼猩红染色切片在偏振光下拍摄，使用SlideViewer 2.5 软件选取目的区域成像。利用图像分析软件以像素(Pixel)为单位，测量每幅图像中阳性像素面积及待测组织像素面积，计算阳性面积占比(%) (阳性像素面积/待测组织像素面积×100%)，据此对皮肤基质中不同类型的胶原蛋白进行区分及统计学分析。

1.5 CS-β-CD-HAs对光老化皮肤ECM合成与降解的影响

1.5.1 RNA分离与实时定量聚合酶链反应检测目的基因的表达 ColII和ColIII的表达可以提示光老化作用及对真皮基质受损或重构的程度^d，表皮ECM丧失和弹性蛋白异常重塑是皮肤光老化的主要病理表现，MMPS和弹性蛋白(Elastin)的上调是这些病理过程的主要驱动力之一。用TRIzol试剂提取大鼠背部皮肤组织总RNA，经反转录获得cDNA，进行RT-qPCR扩增。采用2-ΔΔCT法计算mRNA相对表达量，检测Col-1、Col-3、Elastin、MMP-3的表达水平，以GAPDH mRNA作为内参基因进行归一化。引物序列见表2。

表2 基因引物序列及引物信息
Tab. 2 Primer sequences and information for gene amplification

引物名称	序列(5'to3')	碱基数	产物长度
GaPdh	F: TGCTGAGTATGTCGTGGAG	19	288 bp
	R: GTCTTCTGAGTGGCAGTGAT	20	
Col-1	F: TCCTGCCGATGTCGCTATCCA	21	128 bp
	R: CTCTTGAGGTTGCCAGTCTGTT	24	
Col-3	F: CTCCAGGATCTCCAGGTCCACTTG	24	200 bp
	R: TGTACCAGGCTGACCAGGAAGAC	23	
Elastin	F: CTGCTACTGCTTGGTGGAGAATGT	24	141 bp
	R: CGTGGCTGCTGCTGTCTGATT	21	
Mmp-3	F: CCTCCCTGAAACCGTCCAGAAGA	23	230 bp
	R: CCAACTGTGAAGATCCGCTGAAGA	24	

1.5.2 比色法测定羟脯氨酸含量以评估胶原代谢羟基脯氨酸(hydroxyproline, Hyp)是胶原蛋白序列中的特征性氨基酸，可作为胶原蛋白及其片段含量的标志物^[11]。在多种羟脯氨酸测定方法中，比色法应用广泛。其基本原理是对组织匀浆进行酸水解，进而对水解产生的游离羟脯氨酸进行定量分析^[12]。按照试剂盒说明书进行操作，根据标准曲线及计算公式计算Hyp含量，记录结果并进行统计学分析。

1.5.3 CS-β-CD-HAs对光老化皮肤抗氧化应激损

伤的影响 紫外线照射会导致皮肤组织产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)，引起DNA损伤并诱发氧化应激。在体内，ROS水平受超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等抗氧化剂的调控，维持在生理平衡状态。紫外线照射产生的过量ROS会打破这一平衡，导致SOD活性下降；同时，紫外线促进脂质过氧化，导致丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量增加^[13]。因此，可通过测定SOD活性和MDA含量评价皮肤组织的光老化程度。SOD活性和MDA含量采用比色法试剂盒，按说明书进行测定：将皮肤组织称重，按0.1 g/mL的比例加入提取液，冰浴匀浆；4℃、8 000 g离心10 min后取上清液，用分光光度计测定SOD活性和MDA含量。

1.6 统计学分析

数据分析和绘图均使用GraphPad Prism 10.1.2软件进行。所有计量数据以均数±标准差表示。所有实验均按随机分组和盲法分析设计，确保每组样本量相等。统计分析仅对样本量至少为n=3的实验组进行。独立数据值的数量在图例中标注(均为生物学重复，非技术重复)，统计分析基于这些独立值进行。两组间比较采用配对t检验；多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)，必要时采用双因素方差分析(two-way ANOVA)。如需进一步两两比较，则采用Tukey法。以P<0.05为差异有统计学意义。

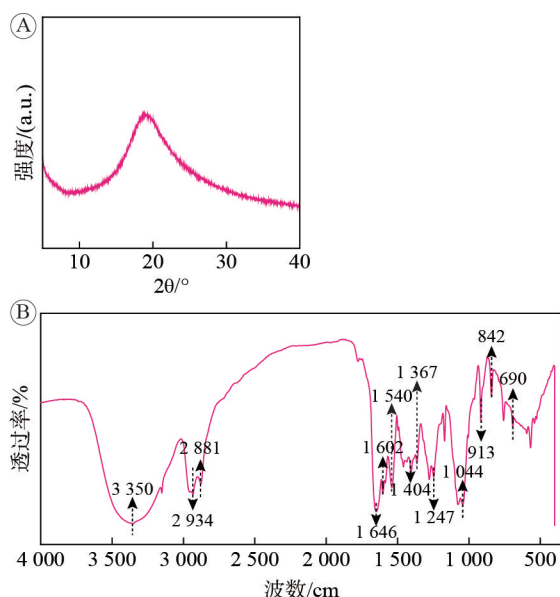
2 结果

2.1 CS-β-CD-HAs的结构及性能表征

通过X射线衍射分析CS-β-CD-HAs的结构，其XRD图谱显示出一个宽峰，峰位位于15~25°(2θ)范围内(图1A)。由图1B可见CS-β-CD-HAs在3 350 cm⁻¹处出现了一个宽峰，并在1 646、1 602、1 540、1 404、1 276、1 247、1 075、1 044、913、842、690 cm⁻¹处出现吸收峰。在3 350 cm⁻¹处的宽峰归因于羟基(-OH)和氨基(-NH-)的伸缩振动。

采用热重和差热分析考察了所制备的CS-β-CD-HAs的热稳定性。随着温度升高，样品质量逐渐减少，呈现两个明显的降解阶段(图2A)：第一阶段温度范围为150~600℃，质量损失达45.41%；第二阶段温度范围为600~700℃，质量损失达19.23%。与此同时，在650℃时观察到一个显著的放热峰，表明有机物经历了剧烈的分解和碳化现象。在600~800℃温度范围内，样品仍存在

一定的残余质量。图2B显示材料呈现典型的自剪切特征：在0.05%应变条件下，表现为三维交联网络主导的弹性响应($G' > G''$)；当应变提升至100%时，材料的黏弹性降低。值得注意的是，在持续施加200 s高应变后恢复至初始条件(0.05%)，其黏弹性参数可基本恢复至原始水平。由图2C可知，在实验初始阶段(0~10 h)，CS- β -CD-HAs的溶胀率快速上升；当实验时间延长至15 h后，溶胀速率逐渐减缓，最终趋于平衡状态。

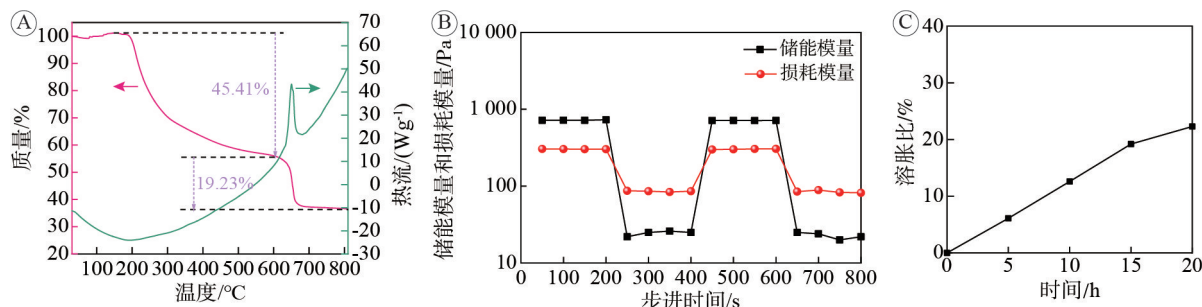


A: X射线衍射图; B: 傅里叶变换红外光谱图

图1 CS- β -CD-HAs结构表征

Fig. 1 Structural characterization of CS- β -CD-HAs

图像显示材料具有规整有序、分布均匀的多孔互穿网状结构，孔径从亚微米级延伸至纳米尺度。凝胶材料表面可见丰富的纳米级褶皱与颗粒状突起，网状结构致密，且孔间通透性良好，见图3。荧光染色结果显示，随着时间延长，其透皮效果逐步增强，且CS- β -CD-HAs的透皮效果显著优于NORM-HAs。见图4。



A: 热重分析和差示扫描量热分析; B: 动态阶应变扫描结果; C: 溶胀动力学变化

图2 CS- β -CD-HAs的热稳定性、流变性能及溶胀行为

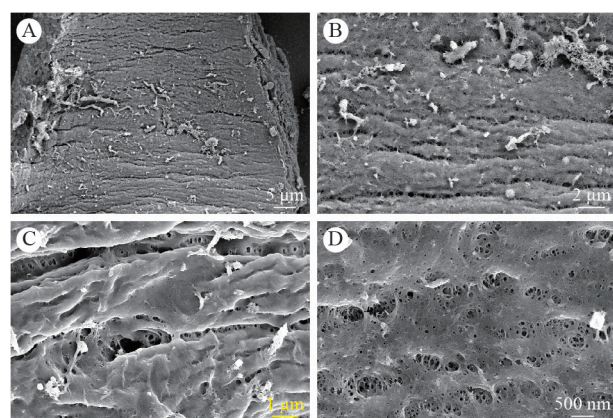
Fig. 2 Thermal stability, rheological properties and swelling behavior of CS- β -CD-HAs

2.2 CS- β -CD-HAs具有良好的细胞相容性并促进HSF的增殖与迁移

CCK-8法检测CS- β -CD-HAs浸提液对HSF细胞活力的影响，实验结果见图5A。对照组细胞相对活力为 $100.0\% \pm 6.5\%$ ，CS- β -CD-HAs浸提液处理HSF 24 h后，细胞相对活力升高至 $137.4\% \pm 8.2\%$ ($P=0.007$)，表明CS- β -CD-HAs浸提液无细胞毒性，且对HSF细胞的增殖具有促进作用。采用细胞划痕实验评估CS- β -CD-HAs浸提液对HSF迁移能力的影响，结果见图5B、图5C。培养12 h后，对照组细胞迁移率为 $18.34\% \pm 2.01\%$ ，CS- β -CD-HAs处理组细胞迁移率提高至 $28.56\% \pm 4.68\%$ ($P=0.013$)；培养24 h后，对照组细胞迁移率为 $34.70\% \pm 0.97\%$ ，CS- β -CD-HAs处理组细胞迁移率进一步升高至 $53.50\% \pm 4.47\%$ ($P=0.0003$)。结果表明，CS- β -CD-HAs浸提液能够促进HSF的迁移，且可能呈时间依赖性。

2.3 CS- β -CD-HAs可以提高皮肤含水量并改善皮肤光老化外观评分

大鼠背部皮肤外观变化见图6，光老化评分统计学结果、角质层水分含量及其变化量见图7。Control组皮肤光滑、细嫩，光泽度良好，未见褶皱，弹性正常，光老化评分大多集中在0~1分；Model组光老化特征最为显著，评分集中在5~6分，皮肤暗沉，出现大量深皱纹、红斑及色素沉着，呈明显皮革样改变，质感粗糙、增厚、松弛，弹性明显下降。HA处理组(CS- β -CD-HAs组与INJ-HAs组)大鼠皮肤外观较Model组相对光滑，光老化评分主要集中在2~3分，表面可见少量浅皱纹、红斑及零星色素沉着，未见明显深皱纹，触感柔软。Control组与Model组间的光老化宏观评分差异显著($P<0.001$)，进一步验证了SD大鼠光老化模型建立成功。与Model组相比，HA处理组光老



3 350 cm⁻¹为羟基和氨基的伸缩振动吸收峰; 1 646 cm⁻¹和1 540 cm⁻¹为酰胺键的特征吸收峰。

A: 1 700×; B: 5 000×; C: 10 000×; D: 17 000×

图3 扫描电镜下CS-β-CD-HAs的微观结构

Fig. 3 Microstructure of CS-β-CD-HAs observed under scanning electron microscope

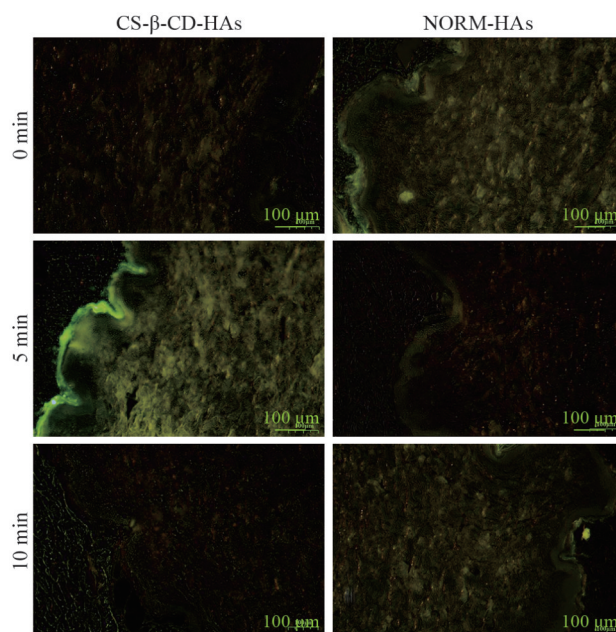


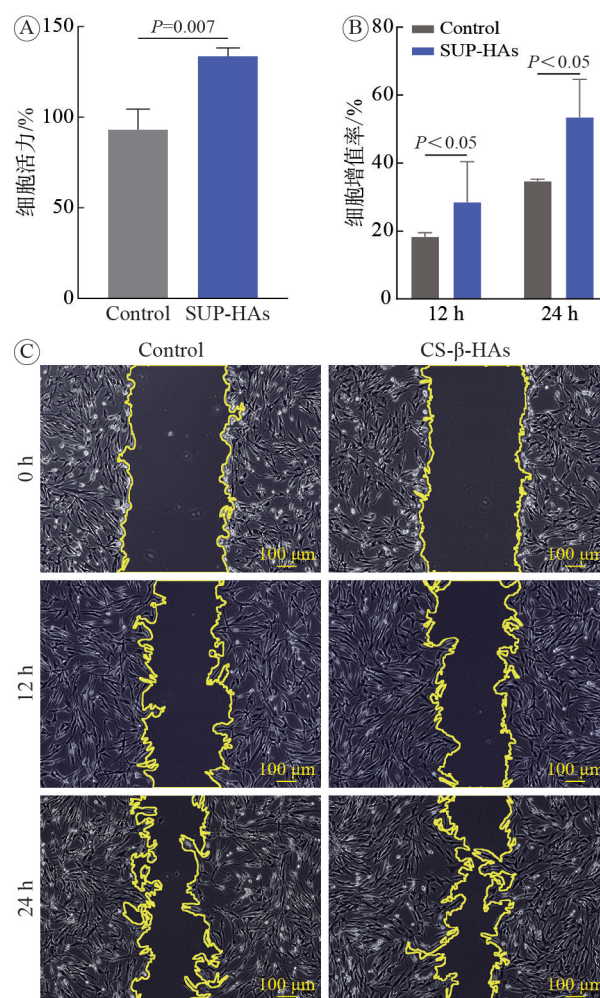
图4 激光共聚焦显微镜观察HA的透皮性能(200×)

Fig. 4 *In vitro* transdermal penetration observed by confocal laser scanning microscopy (200×)

化评分显著降低($P<0.001$), 表明HA对光老化有改善作用; 但CS-β-CD-HAs组与INJ-HAs组间光老化评分差异无统计学意义, 提示两种HA处理方法改善皮肤光老化的效果相近。皮肤电容值测定结果显示, 相较于超纯水组, CS-β-CD-HAs处理后4 h和8 h, 皮肤角质层含水量显著提升($P<0.001$)。

2.4 组织学实验进一步证实CS-β-CD-HAs对光老化皮肤的保护作用

HE染色及天狼猩红染色切片观察细胞和基质



A: CS-β-CD-HAs水凝胶浸提液对HSF细胞活力的影响; B: 定量分析12 h及24 h不同干预下HSF的迁移率; C: 不同干预组处理HSF后不同时间点的典型迁移图像(400×)

图5 CS-β-CD-HAs水凝胶浸提液对人皮肤成纤维细胞增殖与迁移的影响

Fig. 5 Effects of CS-β-CD-HAs hydrogel extract on the proliferation and migration of human skin fibroblasts

的分布及状况。Control组: 表皮层次及结构完整清晰, 细胞排列整齐。Model组: 与Control组相比, 表皮层明显增厚, 细胞分层不清, 部分表皮层断裂; 真皮纤维明显减少, 排列疏松, 真皮全层可见较多炎性细胞浸润。HA两组损伤程度相仿, 表皮层厚度明显较薄, 真皮层排列相对致密; 真皮内存在少许纤维变性、排列稍紊乱, 真皮浅中层炎性细胞浸润较少。使用偏振光显微镜观察不同处理组大鼠皮肤中Col-1与Col-3胶原的染色情况。Control组胶原排列整齐, Model组红色和绿色荧光分布均较为稀疏。经扫描软件选取组织目的区域成像并计算不同类型胶原蛋白面积占比。见图8、图9。

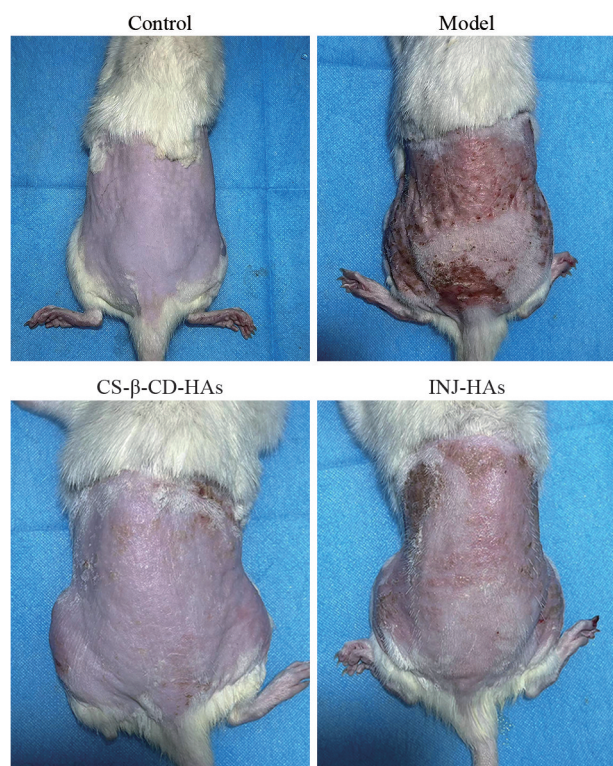


图6 各组大鼠皮肤外观变化

Fig. 6 Changes in skin appearance among different groups

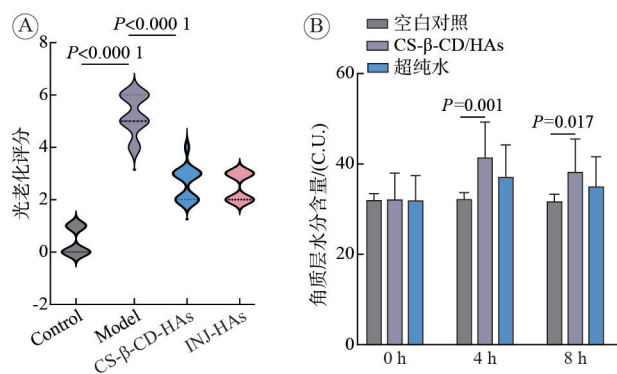


图7 大鼠的皮肤外观评分(A)与角质层水分含量(B)

Fig. 7 Skin appearance score (A) and stratum corneum moisture content (B) in rats subjected to different interventions

2.5 CS-β-CD-HAs可以维持皮肤细胞外基质的稳态并抑制胶原降解

利用Col-1、Col-3、Elastin和Mmp-3基因引物进行RT-qPCR检测mRNA相对表达量,以GAPDH作为内参基因进行归一化。结果显示,凝胶外用及HA注射干预后,Col-1、Col-3及Elastin的mRNA表达水平较模型组升高($P<0.05$),而Mmp-3 mRNA表达水平降低($P<0.01$);CS-β-CD-HAs与INJ-HAs两组处理方式间无显著差异。Hyp含量测定及统计学分析结果表明,HA干预能够显著提升皮肤中的羟脯氨酸含量($P<0.05$),从而在

一定程度上促进皮肤修复与重建。见图10。

2.6 CS-β-CD-HAs可减轻光老化皮肤的氧化应激损伤

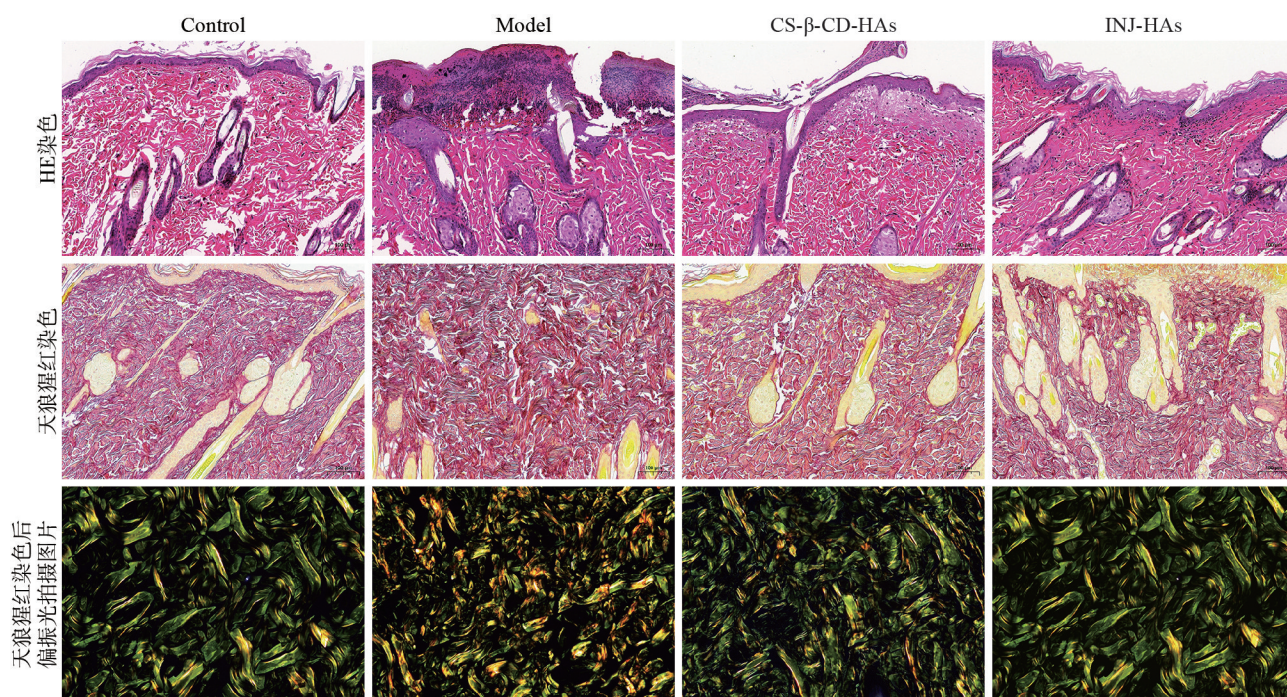
通过比色法测定SOD活性及MDA含量,并对结果进行统计学分析。在HA干预组中,CS-β-CD-HAs组的SOD活性为(23.76 ± 3.25) U/mg,较Model组显著提升了9.85 U/mg($P=0.012$);而INJ-HAs组的SOD活性为(28.35 ± 3.11) U/mg,较Model组显著提升了14.44 U/mg($P<0.001$)。结果表明,HA能够提升SOD活性,有效减轻氧化应激损伤,但不同干预方式之间的效果差异不显著。见图11。

Control组MDA含量为(0.92 ± 0.50) $\mu\text{mol/gprot}$, Model组升高至(7.06 ± 1.25) $\mu\text{mol/gprot}$ ($P<0.001$),表明模型成功诱导了氧化应激反应。在干预组中,CS-β-CD-HAs组MDA含量降至(3.46 ± 1.31) $\mu\text{mol/gprot}$,与Model组相比差异具有统计学意义($P=0.011$);INJ-HAs组MDA含量降至(3.29 ± 0.46) $\mu\text{mol/gprot}$,与Model组相比差异具有统计学意义($P=0.008$)。然而,CS-β-CD-HAs组与INJ-HAs组MDA含量差异无统计学意义。这些结果表明,HA干预能够有效减轻氧化应激引起的脂质过氧化损伤,具有一定的抗氧化应激作用。

3 讨论

本研究通过β-CD接枝CS并偶联HA构建共价网络的路径,制备了CS-β-CD-HAs。研究结果表明,CS-β-CD-HAs经无创外用,可通过促进胶原合成及抑制氧化应激的机制达到与注射同分子量HA相当的抗光老化效果。该凝胶的设计思路如下:β-CD的疏水空腔与角质层脂质成分形成包合物,暂时扰乱脂质双分子层排列,增加细胞间隙,降低皮肤屏障阻力;CS的阳离子特性使其与带负电的角质层表面发生静电吸附,延长水凝胶在皮肤表面的滞留时间,为HA的透皮扩散提供充足的时间窗口;CS-β-CD-HAs中含有丰富的亲水基团(如-OH、-COO⁻、-CONH-),可显著提高角质层水合度。当角质层细胞处于水合状态时,其结构致密性下降,细胞间隙增大,进一步促进HA的透皮扩散。

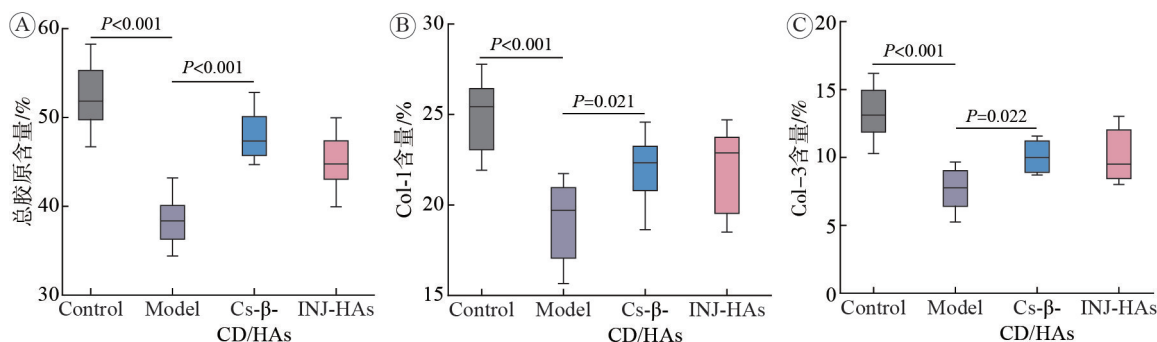
XRD宽峰首先展现了非晶材料的典型特征。红外光谱在1646 cm^{-1} 与1540 cm^{-1} 处的吸收峰支持了



Col-1 成像呈红色，Col-3 成像呈绿色。

图8 不同干预组大鼠皮肤组织的病理学染色(200×)

Fig. 8 Pathological staining of rat skin tissues in different intervention groups (200×)



A: 胶原含量占比(%); B: Col-1 占比(%); C: Col-3 占比(%)

图9 胶原含量占比

Fig. 9 Proportion of collagen

酰胺键的形成，这与EDC/NHS介导的羧基-胺基偶联反应的典型表征一致，证明HA与CS-g-β-CD之间确有共价交联^[13]。热重和差热分析考察了CS-β-CD-HAs的热稳定性。第一阶段的质量损失主要归因于材料内部结合水(如氢键吸附水)的脱除，以及HA和β-CD骨架官能团分解生成低分子量气态化合物。这一过程通常不会伴随明显的热效应，因此在DSC曲线上没有明显的放热或吸热峰^[14]。第二阶段的质量损失归因于碳氢化合物中碳-碳键的断裂以及高分子量羰基衍生物的释放^[15]。在600~800℃之后仍然存在残余质量，可能的残留物包括有机物高温碳化形成的残碳、材料合成过程中使

用的无机金属残渣，以及凝胶交联网络可能形成的热稳定碳化结构^[16]。

为确保交联结构的稳定性，该材料不仅需具备优异的流变模量，还需在外力作用下表现出自愈特性。在0.05%的小应变条件下，CS-β-CD-HAs材料的储能模量(G')显著高于损耗模量(G'')，表明材料形成了稳定的三维网络结构，证实了CS-β-CD-HAs的成功构建^[17]。当应变提升至100%时，巨大的剪切力破坏了维持网络结构的物理作用力，导致模量显著下降，材料发生“剪切稀化”；在持续施加200 s高应变后恢复初始条件，其黏弹性参数可迅速且基本恢复至原始水平，提示构成凝胶网

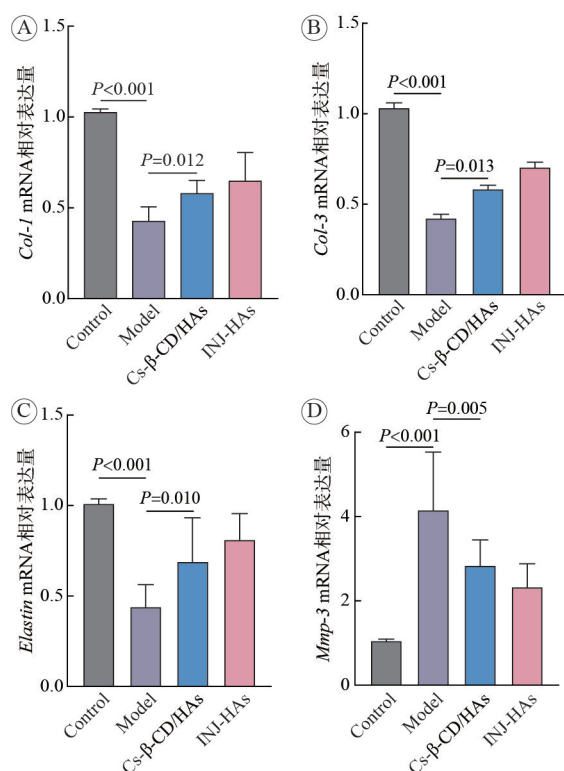


图 10 不同干预组大鼠皮肤组织中 *Col-1* (A)、*Col-3* (B)、*Elastin* (C)及 *Mmp-3* (D) mRNA 相对表达量

Fig. 10 mRNA expression levels of *Col-1* (A), *Col-3* (B), *Elastin* (C), and *Mmp-3* (D) in rat skin tissues from different intervention groups

络的交联作用是动态且可逆的,使材料能够自修复并维持其结构完整性和功能稳定性^[18]。

CS-β-CD-HAs 的 SEM 分析揭示了其微观形貌特征:材料具有规整有序、分布均匀的多孔互穿网状结构,孔径分布从亚微米延伸至纳米尺度。这种多尺度粗糙形貌由凝胶网络中氢键与疏水作用的协同效应形成,是透皮扩散与保湿性能提升的结构基础^[19]。孔道有利于水分的储存与缓释,也有利于真皮细胞和组织的黏附^[20]。功能与结构

的协同主要归因于:不可逆的共价酰胺键提供了基础力学强度与热稳定性;可逆的物理相互作用(包括 CS 静电吸引、广泛的氢键网络及接枝 β-CD)所赋予了材料剪切稀化、应变可恢复的黏弹行为。

作为皮肤真皮层的主要功能细胞,HSF 直接参与胶原合成、细胞外基质维持和皮肤损伤修复,是评价生物材料皮肤相容性的理想细胞模型。实验结果表明,SUP-HAs 不仅无细胞毒性,而且能促进成纤维细胞增殖和迁移,表现出良好的细胞相容性,为其后续应用于皮肤光老化防治提供了细胞水平的安全性依据。

光老化模型的成功构建对本研究至关重要。在模型动物选择方面,常用的实验动物包括小鼠、裸鼠、小型猪、大鼠等。其中,裸鼠等免疫缺陷动物易模拟人类皮肤对紫外线的反应^[21]。本研究选择雄性 SD 大鼠的主要原因如下:第一,雌激素具有增强皮肤水合、抗炎及抗氧化等作用,选用雄性可避免该混杂因素的影响;第二,SD 大鼠皮肤厚度适中,适合模拟紫外线穿透效应。在辐照方式上,鉴于 UVB 主要损伤表皮层,而 UVA 在破坏表皮的同时可深入真皮层,导致表皮细胞、胶原蛋白、弹性蛋白及真皮血管的 DNA 损伤^[22],故本研究采用 UVA+UVB 混合辐照方式。造模过程中,尽管缩短光源与照射部位距离、增加辐射强度以及提升辐射频率等措施可在一定程度上缩短成模时间,但过高的辐射强度可能导致急性光损伤,显著降低成模率,故须综合考虑上述关键因素。因此,本研究根据文献报道和预实验确定 UV 辐射的模式和参数确定 MED,并最终采取逐周递增 UV 照射剂量(1→2→3 MED)的策略。结果显示,大鼠皮肤呈现稳定的光老化宏观表现,包括干燥脱屑、增厚、弹性下降及皱纹形成等。组织学观

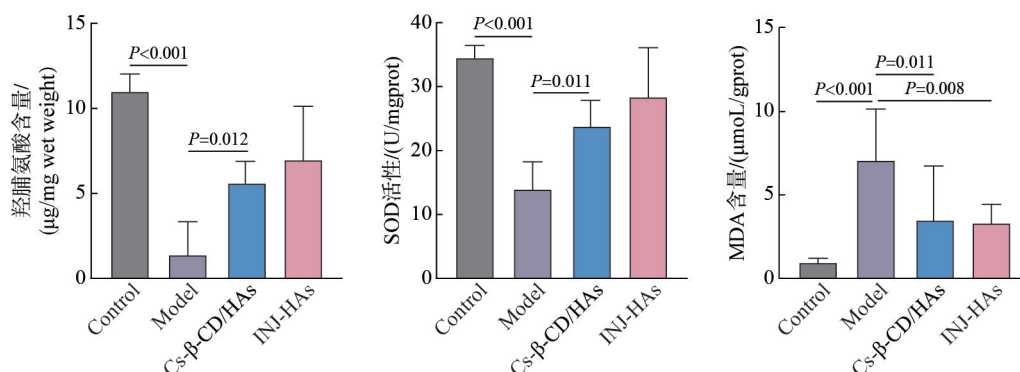


图 11 不同干预组大鼠皮肤组织中羟脯氨酸含量 (A)、超氧化物歧化酶活性 (B)及丙二醛含量 (C)

Fig. 11 Hydroxyproline content (A), superoxide dismutase activity (B), and malondialdehyde content (C) in rat skin tissues across different intervention groups

察表明,与传统单剂量高强度UV照射模型相比,本方案通过渐进性累积损伤,更真实地再现了表皮增厚、真皮乳头层胶原断裂等典型光老化组织学变化^[10]。

胶原蛋白是ECM的主要成分,其丢失会破坏ECM固有的动态平衡,导致ECM重塑异常,进而影响皮肤的结构和功能^[23-24]。Hyp作为胶原蛋白特有的氨基酸,在维持胶原蛋白三螺旋结构稳定性方面发挥着关键作用^[11-12,25]。本研究中,Model组Hyp含量较Control组显著降低87.6%($P<0.001$),CS- β -CD-HAs和INJ-HAs组Hyp含量均较Model组显著提高($P<0.05$),表明二者能够促进胶原蛋白的合成,提高胶原结构稳定性,从而减轻光老化皮肤损伤。

Col-1决定皮肤轮廓,Col-3决定皮肤弹性。天狼猩红染色后偏振光显微镜观察可见,Col-1和Col-3分别呈红色和绿色^[26]。通过图像识别和处理,本研究定量评估了这两种胶原在显微镜视野中的面积占比。HA作用下,两组大鼠皮肤的Col-1与Col-3图像面积占比均较光老化Model组升高,与RT-qPCR检测到的Col-1和Col-3 mRNA表达上调结果一致,且Col-3的上调幅度更高。这一发现具有重要意义:Col-3的显著上调提示HA可能通过促进更具弹性的III型胶原合成,在改善皮肤质地和弹性方面发挥关键作用。

胶原代谢失衡的具体表现,一方面是胶原蛋白的合成减少,另一方面是其降解增加。弹性蛋白(Elastin)是维持皮肤弹性的关键ECM组分,其通过自组装和赖氨酸交联形成成熟的弹性纤维,可提高真皮弹性纤维网的连续性。Elastin的合成受TGF- β /Smad信号通路调控,降解则主要依赖于MMP-3的作用。MMPs是降解ECM的关键酶家族,其主要功能是降解ECM中的胶原纤维网络等组分。MMP-1作为胶原酶可特异性切割I型、III型胶原的三螺旋结构,生成胶原片段^[27-28];而MMP-3作为基质溶解素不仅可以降解Elastin等ECM组分,还可激活MMP-1前体(pro-MMP-1),形成“胶原降解-酶原活化”的正反馈循环,从而引发光老化的发生^[29-30]。

本研究中Model组Mmp-3 mRNA的表达显著升高,Elastin mRNA的表达下降;HA干预后,两组Mmp-3 mRNA的表达均显著降低,说明透明质酸抑制了胶原蛋白和弹性蛋白的降解。

这种“抑降解-促合成”的双重调控效应,正是CS- β -CD-HAs修复光老化皮肤ECM稳态的核心机制。文献报道显示,HA与成纤维细胞表面的CD44受体结合后,可激活TGF- β /Smad通路,促进Smad2/3的磷酸化,从而促进胶原转录。CS- β -CD-HAs是否通过该分子通路发挥作用,有待后续研究进一步验证^[31]。

除了ECM的破坏,氧化应激和炎症反应也在光老化过程中扮演着重要角色。UV辐射可使大量ROS累积,引发氧化应激,造成脂质、蛋白质和DNA等细胞成分的损伤^[32-33]。

ROS是介导氧化应激的核心启动因子^[32]。过量ROS不仅直接攻击生物大分子,还可作为信号分子激活下游应激通路^[34]。Nrf2/ARE途径是细胞氧化应激反应的关键调节通路^[35]。在正常条件下,Nrf2被其抑制蛋白Keap1结合并滞留于细胞质中;UV辐射导致ROS过量蓄积,打破氧化还原稳态。为应对氧化应激,Nrf2与Keap1解离并易位至细胞核,在核内与小Maf蛋白形成异二聚体后与ARE结合,启动下游基因转录,促进SOD等抗氧化酶的合成。SOD可清除超氧阴离子,中和ROS并防止氧化损伤,从而增强细胞的抗氧化能力,降低MDA的积累^[36]。MDA是脂质过氧化的终产物,其含量可间接反映细胞膜脂质遭受氧化损伤的程度^[37]。ROS攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发链式脂质过氧化反应,最终生成MDA等醛类物质,导致膜流动性和通透性改变,进而损害细胞结构和功能^[38-39]。

本研究中,Model组皮肤MDA含量较正常组升高6倍之多($P<0.001$),SOD活性下降59%($P<0.001$),与UV诱导的氧化应激机制高度吻合。实验结果表明,HA提升了SOD活性,降低了MDA含量,减少了UV诱导的ROS积累。最新的体外研究证实,HA可显著降低UVA诱导的人真皮成纤维细胞内和线粒体ROS水平,并上调抗氧化酶的表达,恢复ECM相关基因的转录,这与本研究的发现高度一致^[24]。

另外,胶原合成与氧化应激通路存在互相影响:ROS-AP-1-MMP信号级联反应正是二者之间的桥梁。紫外线诱导产生的ROS通过抑制蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases, PTPs)活性,激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号级联反应,进而磷酸化

激活转录因子 AP-1。AP-1 作为一种关键的转录因子,一方面可促进 MMPs 的转录,另一方面可抑制 TGF- β 信号通路,使前胶原合成减少^[27-28]。

本研究的局限性在于:第一,仅设置 CS- β -CD-HAs 组和 HA 注射组,未设置单独 CS、单独 β -CD 及空白凝胶等对照组,因此,无法完全排除壳聚糖和环糊精自身对抗光老化的潜在贡献;第二,虽从胶原代谢和氧化应激角度初步探索了 CS- β -CD-HAs 的抗光老化机制,但仅停留在 mRNA 表达和生化指标层面;第三,采用单一 HA 分子量配比(1:1:1)和单次给药频次,未进行不同分子量配比及给药时间梯度的系统分析,无法确定最优配比及最佳治疗方案。

针对上述局限性,后续研究将增设单独 CS、单独 β -CD 及空白凝胶等对照组,以明确各组分的独立作用与协同机制。同时,探索不同分子量 HA 的优化配比并完善实验技术细节,以期获得最佳抗光老化效果。在机制研究方面,采用 Western blot 检测 TGF- β /Smad、Nrf2/ARE 等通路关键蛋白的表达及磷酸化水平,并结合通路特异性抑制剂进行功能挽救实验,以阐明 CS- β -CD-HAs 抗光老化的分子机制;此外,可借助代谢组学、单细胞测序等技术,全面揭示其多靶点调控网络。未来亦可探索 CS- β -CD-HAs 与其他抗光老化成分(如抗氧化剂、生长因子、外泌体等)的联合应用,以期实现协同增效。

综上,CS- β -CD-HAs 作为一种非侵入性抗光老化材料,具有良好的应用前景;本研究成果为相关领域的后续研究提供了实验基础和理论参考。

作者贡献 王海苗:实验设计与实施,论文撰写;应艺、王逸男:实验实施,统计分析;陈力、韩愚弟:实验设计与指导,论文修订,获取研究经费。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突。

数据共享声明 本论文相关数据可依据合理理由从作者处获取,Email: Melody_1124@163.com。

参考文献

- 1 Fisher GJ, Voorhees JJ. Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce ap-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin *in vivo* [J]. J Invest Dermatol Symp Proc, 1998, 3 (1): 61-68.
- 2 Fisher GJ, Wang ZQ, Datta SC, et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light [J]. N Engl J Med, 1997, 337 (20): 1419-1429.
- 3 Liu Y, Li Y, Wu NM, et al. Effects of hyaluronic acid with different molecular weights and concentrations on skin optical clearing and collagen fibril structural characteristics [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 318: 144954.
- 4 Essendoubi M, Gobinet C, Reynaud R, et al. Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy [J]. Skin Res Technol, 2016, 22 (1): 55-62.
- 5 Espinoza L, Vinshtok Y, McCreesh J, et al. Kinetic energy - assisted delivery of hyaluronic acid for skin remodeling in middle and lower face [J]. J Cosmet Dermatol, 2020, 19 (9): 2277-2281.
- 6 Šimek M, Šínová R, Berka V, et al. Alleviating UV-induced photoaging with oral hyaluronic acid: insights from a hairless mouse model [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 321: 146340.
- 7 Huang QC, Zhang XJ, Zuo YY, et al. Chitosan-based nanozyme hydrogels: Advanced antioxidant and sustained-release systems for the prevention and treatment of skin photoaging [J]. Int J Pharm X, 2026, 11: 100491.
- 8 Sakulwech S, Lourith N, Kanlayavattanakul M, et al. Nano complex of quaternized cyclodextrin grafted chitosan and hyaluronic acid for a skin delivery [J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2022, 220: 112920.
- 9 Pan SY, Zhu CY, Wu YW, et al. Chitosan-based self-healing hydrogel: from fabrication to biomedical application [J]. Polymers, 2023, 15 (18): 3768.
- 10 Bissett DL, Chatterjee R, Hannon DP. Photoprotective effect of superoxide-scavenging antioxidants against ultraviolet radiation-induced chronic skin damage in the hairless mouse [J]. Photodermatol Photoimmunol Photomed, 1990, 7 (2): 56-62.
- 11 Ivaskiene T, Viskelis J, Streimikyte P, et al. Collagen supplementation and regenerative health: advances in biomarker detection and smart material integration [J]. Front Nutr, 2025, 12: 1716166.
- 12 Kuttan R, Radhakrishnan AN. Biochemistry of the hydroxyprolines [J]. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol, 1973, 37: 273-347.
- 13 Fischer MJE. Surface plasmon resonance [M] // DE MOL NJ, FISCHER MJE. Surface plasmon resonance: methods and protocols. New York: Humana Press, 2010: 55-73.
- 14 Caspersen MB, Roubroeks JP, Liu Q, et al. Thermal degradation and stability of sodium hyaluronate in solid state [J]. Carbohydr Polym, 2014, 107: 25-30.
- 15 Thomas A, Moinuddin K, Tretsiakova-McNally S, et al. A kinetic analysis of the thermal degradation behaviours of some bio-based substrates [J]. Polymers, 2020, 12 (8): 1830.
- 16 Ma YC, Yu ZQ, Waudby CA, et al. Development of hyaluronic acid/ β -cyclodextrin semi-interpenetrating network hydrogels for prolonged delivery of water-soluble sunitinib malate [J]. Int J Pharm, 2025, 669: 125039.
- 17 Craciun AM, Morariu S, Marin L. Self-healing chitosan hydrogels: preparation and rheological characterization [J]. Polymers, 2022, 14 (13): 2570.
- 18 Almeida D, Dias D, Ferreira FC, et al. Self-healing, electroconductive hydrogels for wound healing applications [J]. Gels, 2025, 11 (8): 619.
- 19 Wu SJ, Liu GD, Shao P, et al. Transdermal sustained release properties and anti-photoaging efficacy of liposome-

- thermosensitive hydrogel system [J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13 (2): 2301933.
- 20 Gering C, Párraga J, Vuorenää H, et al. Bioactivated gellan gum hydrogels affect cellular rearrangement and cell response in vascular co-culture and subcutaneous implant models [J]. *Biomater Adv*, 2022, 143: 213185.
- 21 Russell-Goldman E, Murphy GF. The pathobiology of skin aging [J]. *Am J Pathol*, 2020, 190 (7): 1356-1369.
- 22 Martic I, Guerrero-Navarro L, Cappuccio E, et al. Synergistic interplay between UV and urban particulate matter exposure induces melanocyte senescence and contributes to human skin aging [J]. *Sci Rep*, 2025, 15: 44893.
- 23 Zhao X, Psarianos P, Ghoraie LS, et al. Metabolic regulation of dermal fibroblasts contributes to skin extracellular matrix homeostasis and fibrosis [J]. *Nat Metab*, 2019, 1 (1): 147-157.
- 24 Tran TTT, Heo SC, Lee JH, et al. Synergistic protective and regenerative effects of hyaluronic acid and polynucleotides against UVA-induced oxidative stress in dermal fibroblasts [J]. *Sci Rep*, 2026, 16: 6703.
- 25 Yang DY, Liu Q, Xu QY, et al. Effects of collagen hydrolysates on UV-induced photoaging mice: Gly-Pro-Hyp as a potent anti-photoaging peptide [J]. *Food Funct*, 2024, 15 (6): 3008-3022.
- 26 Lattouf R, Younes R, Lutomski D, et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues [J]. *J Histochem Cytochem*, 2014, 62 (10): 751-758.
- 27 Jang HY, Kim GB, Kim JM, et al. Fisetin inhibits UVA-induced expression of MMP-1 and MMP-3 through the NOX/ROS/MAPK pathway in human dermal fibroblasts and human epidermal keratinocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24 (24): 17358.
- 28 Wäster P, Rosdahl I, Öllinger K. Cell fate regulated by nuclear factor- κ B- and activator protein-1-dependent signalling in human melanocytes exposed to ultraviolet A and ultraviolet B [J]. *Br J Dermatol*, 2014, 171 (6): 1336-1346.
- 29 Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, et al. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17 (6): 868.
- 30 Zhang XY, Alanazi YF, Jowitt TA, et al. Elastic fibre proteins in elastogenesis and wound healing [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (8): 4087.
- 31 Gruber JV, Holtz R, Riemer J. Hyaluronic acid (HA) stimulates the *in vitro* expression of CD44 proteins but not HAS1 proteins in normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and is HA molecular weight dependent [J]. *J Cosmet Dermatol*, 2022, 21 (3): 1193-1198.
- 32 Fiorica C, Palumbo FS, Pitarresi G, et al. A hyaluronic acid/cyclodextrin based injectable hydrogel for local doxorubicin delivery to solid tumors [J]. *Int J Pharm*, 2020, 589: 119879.
- 33 Sreedhar A, Aguilera-Aguirre L, Singh KK. Mitochondria in skin health, aging, and disease [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11 (6): 444.
- 34 Lin JT, Zhang T, Zhang L. Arsenite-induced liver apoptosis via oxidative stress and the MAPK signaling pathway in marine medaka [J]. *Aquat Toxicol*, 2025, 279: 107226.
- 35 Liu HH, Hu YL, Ji WT, et al. Sustained activation of Nrf2 antioxidant pathway by flexible liposome based on low phase transition temperature to delay skin aging [J]. *Adv Healthc Mater*, 2026, 15 (3): e01696.
- 36 Liu SN, Pi JB, Zhang Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 54: 102389.
- 37 Sun LL, Dong HL, Zhang WQ, et al. Lipid peroxidation, GSH depletion, and SLC7A11 inhibition are common causes of EMT and ferroptosis in A549 cells, but different in specific mechanisms [J]. *DNA Cell Biol*, 2021, 40 (2): 172-183.
- 38 Ma LN, Liu XQ, Zhao YY, et al. Ginkgolide B reduces LOX-1 expression by inhibiting Akt phosphorylation and increasing Sirt1 expression in oxidized LDL-stimulated human umbilical vein endothelial cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e74769.
- 39 Itoh K, Chiba T, Takahashi S, et al. An Nrf2/small maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 236 (2): 313-322.

(责任编辑:孟晓彤)