

论老年斑形成的生化原理及其在医学美容中的应用

黄鹂¹ 印大中²

1. 广州中医药大学第二附属医院 广州市大德路 111 号 510120

2. 湖南师范大学 生命科学学院 衰老生化实验室, 湖南长沙 410081

dazhongyin@hotmail.com

老化是人类在生命过程中不可避免的自然现象,大量的研究表明,老年斑的形成主要是由于人类在能量代谢过程中的自由基氧化和非酶糖基化(简称‘糖基化’)伤害所造成的代谢垃圾的堆积,该生化过程与皮肤起皱以及“人老珠黄”的诸多老化现象一脉相通。本文将从老年色素形成的生化机制的角度详细介绍相关领域已经取得的研究成果,希望能给医学美容的研究和应用带来一些有益的启发。

一、老年色素及其相关物质的科学定义

人们通常把体内与衰老相关的色素颗粒称之为老年色素并常常容易与“脂褐质”(lipofuscin)及其它相关物质混为一谈^[3],第四届老年色素国际会议对此做了专门讨论^[4],笔者在几年前的一篇综述文章中也对此提出过系统论述^[5]。严格说来,细胞内与衰老相关的色素颗粒由 Hannover 在 1842 年最初发现并报导^[6],而“脂褐质”这一术语是 1912 年 Hueck 为了将这种色素与衰老不相关的眼球或皮肤中的黑色素(melanin,酪氨酸的酶促氧化产物)区别开来而提出的^[7]。因此学术上应该重视老年斑和黑色素的差别。为了学术上的规范化,因此一般脂褐质(素)专指存在于细胞内晚期溶酶体(secondary lysosome)中蓄积的老年色素类生化物质。老年色素则泛指细胞内外所有与老化相关的色素物质及其复合成分,比如包括眼球晶体白内障、老化细胞间质中具有黄色荧光的胶原组织等^[5]。生物体内老年色素的形成是动态的连续变化过程。因而在不同生物个体的不同年龄阶段、不同组织部位都可能形成具有不同生物特性的老年色素。例如在实验与病理条件下,人和动物体内也会形成一些非永久性的黄色或棕色的聚合物和荧光物。

根据目前的观点，细胞内外在这样条件下产生的色素物质称为腊黄素（ceroid）比较恰当。腊黄素有时被该领域专业工作者称为脂褐素前体物质，有时还被不严格地称为可溶性脂褐素^[3]。值得注意的是，并非所有的老年色素都具荧光。

除了细胞内外这些与老化相关的荧光色素及病变加速产生的荧光色素外，许多有荧光特性的生化物质也能在不同生化反应模型中产生。例如：脂类过氧化、马龙二醛聚合，蛋白氧化、美拉德反应(Maillard reaction)，抗坏血酸褐变反应等。在这些反应中形成的具有类似于老年色素荧光特性的反应产物则总称为老年色素类荧光物质（age pigment-like fluorophores, APFs）。这些色素物质包括生物体内的高级氧应激终产物（ALEs）和高级糖基化终产物（advanced glycation end-products, AGEs）等，部分包括腊黄素和 APFs。

二、褐素的生化组成

早期对于脂褐素的研究大多建立在形态学及免疫组织生化方法的基础之上。在普通光学显微镜下，脂褐素表现为棕黄色非均一色素颗粒，主要蓄积在衰老动物的神经元细胞，心肌细胞等终末分化细胞的晚期溶酶体中。

脂褐素有如下免疫组化特性：嗜碱性（说明其中有含酸化合物）、过碘酸-西佛碱阳性（说明其中含羰基化合物）、对脂溶性染料的可染性、能被特殊蛋白试剂染色。

虽然脂褐素的生化组成在不同的组织、不同的物种甚至不同的研究中都有所不同。根据 Björkerud 的研究报导^[8]，脂褐素的三种主要成分是脂类（20—50%），蛋白（30—50%），水不溶性残余物（10—30%）。然而目前脂褐素中也检测出少量碳水化合物成分。其实早期的研究对这一物质的生化成分已有了初步的认识。例如，“脂褐素”这一术语就是希腊文中“lipo”（油脂）与拉丁语中“fuscus”（棕色）这两个词根的组合。

三、白质的氧化改变与老年色素

通常，蛋白质在 APFs 形成过程中起着十分重要的作用。与蛋白质相关的生物分子，如氨基酸、多肽、各类酶类等，无论是作为结构蛋白还是功能蛋白都参与了 APFs 的形成。

大多数蛋白质以及与蛋白相关的生物分子在紫外光区都有发荧光的特性。天然蛋白质发荧光主要因其含有芳香族氨基酸如：色氨酸（287/348nm）酪氨酸（275/303nm）等。Pirie 发现，将纯色氨酸或牛晶体蛋白置于太阳光下，会有蓝色荧光物 N-甲酰犬尿氨酸（330/440nm）产生，因此她认为这种光氧化造成的蛋白质变化与白内障的形成有关^[9]。Wicken 与 Lunec 发现将去脂的清蛋白置于紫外光下或在有自由基存在时，将出现具有脂褐素特性的，峰值在 360/454nm 的荧光物质^[10]，因此他们认为蛋白质的氧化（特别是色氨酸的氧化产物-犬尿氨酸的形成）是脂褐素形成的可能机理。

不久前，Kikugawa 等成功的检测并分离出了^[11]具有 315/410nm 荧光特性的二聚酪氨酸。这种与脂过氧化物相关的具有 APFs 光谱特性的二聚酪氨酸已被确认为是酪氨酸及含酪氨酸的蛋白质在生命活动中形成的一种氧化产物。

总之，不少氨基酸的氧化产物都有老年色素类荧光特性。但以作者之见，蛋白的直接氧化产物一般可与蜡黄素相提并论，而不宜列入脂褐素类荧光物质的范畴。

美国国立医学科学院 Stadtman 教授的工作从另一个角度证实了羰基化合物与衰老及老年色素形成之间的密切联系。在老化过程中，由氧化紧张导致的蛋白羰基化合物含量有所增加^[12]，其数量由在年轻动物体内的 2 nmol/mg 蛋白上升至老年动物体内的 4 nmol/mg 蛋白。Stadtman 教授预言，老年动物体内的含羰基的蛋白质甚至可高达细胞内蛋白总量的 50%以上。

我们在老鼠肝的溶酶体-线粒体氧化的模式中，使用半胱氨酸及 Fe^{2+} 刺激氧化发生，随后进行测定发现有蛋白羰基化合物及脂褐素类的自发荧光物产生。在脂过氧化物增加 1-2 小时之后，蛋白羰基化合物量呈逐渐上升趋势。与快速消失的蛋白质荧光（280-335nm）相比，氧化引起的脂褐素类荧光物质的形成需要更长时间。脂褐素类荧光物质形成缓慢表明他们的形成与色氨酸和酪氨酸产生的荧光物质的下降不直接相关^[13]。

蜡黄素-脂褐素症（Batten's disease 也称 Ceroid-lipofuscinosis）是一种遗传性溶酶体脂褐素储积症^[14]，它会导致失眠、癫痫、痴呆和早逝。这种病之所以这样

命名是因为患者体内储积了大量的腊黄素与脂褐素。Palmer 和 Jolly 曾报道, 羊的腊黄素-脂褐素症中 70%的堆积成分是线粒体 ATP 合成酶的 C 亚单元蛋白质^[15]。他们的工作曾一度被认为是找到了腊黄素-脂褐素病症的主要分子机理而很受推崇。最近的一项研究发现, 此种富含蛋白的储积物并非荧光物质, 而这与腊黄素-脂褐素症的主要症状大为冲突^[16]。

事实上, 在许多老化疾病中都已发现有非荧光的高蛋白储积物的存在。包括 Alzheimer 患者大脑中的淀粉样变性、II 型糖尿病患者体内的胰岛淀粉样变性, 以及各类慢性炎症, 如: 肺结核、类风湿性关节炎、慢性骨髓炎患者体内的各类淀粉样变性等^[17]。如前所述, 蛋白氧化伤害的程度, 又如赖氨酸、组氨酸、精氨酸等氨基酸残基的存在量, 对这些富含蛋白的与老化相关的储积物的荧光特性起十分重要的作用。

四、老年色素类荧光物质与脂类过氧化物

由 Harman 教授于 1956 年提出的自由基衰老学说是当前从生化角度解释老年色素形成机制的最重要的理论之一^[18]。构成生命的基本单位是细胞, 而细胞膜则由脂双层组成。在过去的几十年里, 由氧自由基造成的细胞膜脂过氧化进而导致细胞损伤的过程已得到了深入细致地研究。

超氧化物阴离子自由基 ($O_2^{\cdot-}$) 和羟自由基 ($\cdot OH$) 等活性氧中间体是典型的氧自由基。这些活性氧基团有很高的反应势能。能导致脂膜不饱和脂肪酸形成脂过氧化物和环化过氧化物的产生, 而这些物质则往往分解成饱和与不饱和的羰基化合物 (如不饱和醛类)。不饱和醛酮化合物非常活跃, 最终往往造成各类细胞毒害与基因毒害, 同时也是形成荧光色素产物的主要前体。在这些前体物中, 生物医学工作者对丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和 4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, HNE) 的研究最为深入。Tappel 等在 1969 年首先报导脂类过氧化产物, 丙二醛与氨基酸反应形成类似脂褐质萃取物的荧光物质^[19]。这就使自由基伤害与老年色素的形成及生物老化有机地联系起来。丙二醛与各类氨基酸在强酸条件下反应能生成 APFs。这种 APFs 在紫外光激发下发出 450-470nm 的荧光, 红外及质谱分析表明: 荧光物质是 $-N=CH-CH=CH-NH-$ 结构的共轭多氮

复合物。

由于 Tappel“制造”APFs 的实验是在强酸条件下完成，与生物体系相差太远，遭到了很大非议。后来，Kikugawa 等将丙二醛与伯胺在 37℃ 的中性条件下反应生成了另一类荧光物质^[20]。这些物质在 365-405nm 的光波激发下的荧光峰值在 435-465nm。

Gutteridge 等在没有蛋白氮存在的条件下，利用高浓度的丙二醛得到另一类荧光物质。他认为产物是丙二醛的聚合物^[21]。当然，该产物在真正的生化系统中也不可能存在。

脂质过氧化形成的 4-羟基壬烯醛能与微粒体、线粒体、氨基磷脂反应产生荧光物质。这些荧光物质的光谱特性与从氧化损伤的细胞器内抽提的脂褐素的光谱特性相类似，都发射波长在 400-500nm 之间的蓝色荧光。

除了丙二醛、HNE 可以与氨基化合物反应形成 APFs 外，其它的脂类过氧化产物也可与氨基化合物反应形成 APFs^[22]，如：2,4-己二烯醛，2,3-丁二酮，12-酮-亚油酸，2,4-十二二烯醛等脂类过氧化产物都可与氨基化合物发生反应。值得注意的是许多单醛也能与氨基化合物反应形成 APFs，如：甲醛、乙醛、戊二醛等似乎也能与生物分子形成交联反应，形成大分子荧光产物。虽然各类 APFs 在前体组成、产物构成及溶解度、PH 值等生化性质方面存在很大差异，但很明显 APFs 主要是由各类氨基化合物与羰基化合物（特别是不饱和羰基化合物）耦合交联而成的。

总之，氧化应激是生物体尤其是皮肤表面形成老年斑以及 APFs 的最主要因素！因此抗氧化实际上已经成为了医学美容和防止老年斑形成的核心任务之一。

五、与碳水化合物相关的老年色素

上文所述的氧自由基诱导的脂质过氧化领域主要是研究与脂类相关的 APFs。但近来的研究发现，糖类与氨基化合物反应能形成另一类与老化相关的 APFs。这样的 APFs 主要通过糖基化/美拉德反应产生。且这一反应在糖尿病患者体内的增加尤为显著。

1. 非酶糖基化与高级糖基化终产物 (ALEs)

糖基化反应主要是一类还原糖与氨基化合物之间的反应。葡萄糖、果糖等还原糖与氨基化合物反应产生西佛碱，进而形成阿马多里（Amadori）重排产物等一些较为稳定的羰基化合物。在脱氨剂或脱水剂作用下阿马多里产物逐渐降解，产生不饱和羰基化合物，如：糠醛、脱氧邻酮醛糖（deoxyosone）等^[23]。有趣的是这些糖基化产物与脂过氧化产物十分相似。（虽然在糖基化反应中氧及过渡金属元素 Fe 离子的出现可能诱导复杂的过氧化产物生成，但此反应本身并不需要氧。）而由此产生的不饱和羰基化合物与氨基化合物之间的进一步反应则可产生棕黄色的糖基化终产物。这些糖基化终产物包括嘧啶、吡咯、吡嗪、咪唑^[24]、萘啶氯化物及它们的复合物。糖基化终产物或游离存在、或结合到蛋白等其他生物分子上^[25]。

早在 1953 年 Hodge 就对美拉德反应做了全面深入的总结，他指出这些糖基化终产物主要是含氮的共轭环状化合物或聚合物，并命名为类黑色素蛋白质（melanoidins）^[23]。

与美拉德反应相关的生物老化被认为是因羰基化合物与生物大分子（特别是蛋白质）交联而造成的。糖尿病患者体内血糖浓度的上升是引起非酶促糖基化血红蛋白增加（glycemia）的主要原因，其它糖尿病晚期并发症也与此密切相关，如：肾病变、动脉粥样硬化、眼球黄斑病变（macular degeneration）^[26]等。在人类衰老过程中，人眼球晶体蛋白溶解性会逐渐降低，最终可导致白内障；另外，皮肤、肌腱、肺叶、动脉和关节的弹性下降等等都与美拉德反应引起的这些组织的胶原交联有关，并且很可能是这些组织老化的关键所在。

虽然糖基化与美拉德反应这两个术语经常互换使用，但根据 Hodge 的研究，美拉德反应的范围更宽。它还包括焦糖化作用及维生素 C 引起的褐变反应，而后者与氧化过程密切相关^[23]。

2. 维生素 C 与 APFs 的相关性

为了研究脂过氧化物造成的氧化伤害的影响及 APFs 的形成，维生素 C 与 Fe 的混合物被广泛用来诱导 Fenton 反应。在许多生物模型中，维生素 C 的引入及其氧化加强了脂过氧化物及 APFs 的形成。

另一方面,早期的食品科学家对维生素 C 氧化引起的食品褐变有过深入的研究。然而它与 APFs 的关系直到最近才引起人们的注意。Ortwerth 等报道,在眼球晶状体交联老化褐变过程中,抗坏血酸能诱导比葡萄糖更广泛的蛋白交联。这些交联物的荧光特性(350/450nm)与人及动物眼球晶体白内障的荧光特性相似。Bensch 等也研究和指出了维生素 C 在老年白内障形成中的重要作用^[27]。

Yin 与 Brunk 的研究报道,在氧化了的维生素 C 的水溶液中也可观察到荧光物质及非酶促褐变发生。这些物质是由维生素 C 与氨基酸反应生成的^[28]。维生素 C 的自动氧化及随后的聚合被认为是荧光物形成的主要机理。这些反应物的荧光特性(400-490nm)与脂褐素的提取物相似,而维生素 C 与谷氨酰胺的衍生物反应能够形成一类稳定的脂褐素类荧光物质(350/430nm)^[29]。

另外,Alroy 等利用免疫组化的研究方法证实了脂褐素中还有其它糖类的存在。甘露糖、葡萄糖、半乳糖与氨基酸形成的脂褐素类产物已见报道^[30,31]。利用刀豆素 A 在人溶酶体的脂褐素中可检查到甘露糖、葡萄糖的存在。利用植物凝集素组织生化方法研究表明:配糖体也是形成脂褐素及腊黄素的重要组分。

六、多烯化合物与 APFs

还有些研究表明,一些多烯化合物如:类维生素 A、类胡萝卜素、多萜醇也与棕黄色 APFs 相关。类维生素 A、类胡萝卜素的分子结构中存在共轭双键,这对于色谱吸收及荧光的发射是很重要的结构基础(但是多萜醇不具有此种结构)。实验反复证明,视网膜上皮细胞中的老年色素会因维生素 E 的缺乏而增多。Katz 和 Eldred 等认为这些色素是维生素 A 的衍生物^[32],他们在视网膜上皮细胞中已成功地分离和鉴定了一种典型的脂褐素类荧光化合物。他们称这是科学上首例分离和鉴定了的典型的脂褐素类荧光化合物。他们的研究表明,因这一类脂褐素具有多烯共轭的视黄醛-乙醇胺交连结构,其荧光在黄色至红色可见光波段(500-640nm)^[33]。正如其它 APFs 一样,视黄醛与乙醇胺的反应过程同样也是形成西佛碱的羰-氨反应过程^[34,35]。

合成胡萝卜素的甲羟戊酸途径还有另一产物,即多萜醇。根据 Wolfe 等报道:与同一年龄阶段的对照组相比较^[36],早老性痴呆(如 Alzheimer disease, AD)患

者体内及神经元脂褐素储积症患者的大脑皮层内多萜醇含量明显升高,另外这两类患者在心脏与肾脏中磷酸多萜醇也有所增加。因此多萜醇的积累曾一度被认为是与老化疾病正相关的老化指标。然而,因为多萜醇分子中的多烯结构不是共轭结构,故其光谱特性不同于其它脂褐素,多萜醇的颜色并非棕黄色(吸收光值为210nm),本身也非荧光物质。其氧化产物,多萜醛与赖氨酸的反应产物,的最大荧光波长(320/390nm)也不同于其它脂褐素及其抽提物的荧光光谱。由于以上差别,Wolfe只能模棱两可的提出多萜醇是独特的腊黄素与脂褐素组分^[37]。关于是否应该将多萜醇产物列入脂褐素组分之中,有关专家持有不同的看法。

七、其它与老年色素相关的生化物质

各类核酸的碱基,如鸟嘌呤、腺嘌呤和胞嘧啶与丙二醛及花生四烯酸的过氧化物共同培养时也能产生 APFs。这一类荧光物质是由于 DNA 分子中的氨基与脂过氧化产生的羰基化合物反应形成的。Seto 等报道,嘧啶-嘌呤酮-核苷酸复合物为最大激发与发射光谱为 360/460nm 和 360/500nm 的荧光物质^[38],但这种荧光特性没有得到其它研究的证实。另外 Fujimoto 等认为在 DNA 中的氨基与不饱和醛酮及化合物反应导致 APFs 形成的过程中,丙二醛不是作为羰基化合物主要来源的反应物。其它一些关于核苷酸(如脱氧鸟苷)与脂过氧化物的反应产物也没有发现荧光特性^[39]。

最近,我们在超净工作台中将多种不同的生物材料置于紫外光下进行氧化损伤和老化研究,结果这些生物材料的反应终产物中都发现有大量 APFs 的生成。这表明绝大多数生物材料在遭受环境伤害时都有褐变成复杂荧光物质的趋势。虽然氧化伤害能加速 APFs 的生成速率,但羰-氮交联则被发现是 APFs 形成中最本质的生化过程。

基于上述研究结果,我们深刻地认识到:脂肪、蛋白质、碳水化合物、类胡萝卜素、维生素 C 以及核苷酸等各类生物分子在一定条件下都能形成 APFs。

八、老年色素与衰老

综述各种与老年色素形成相关的衰老理论的要点,我们确信与熵增原理相应的,缓慢进行的羰-蛋白交联是老年色素形成的最重要的机理。羰基毒化反应揭

示了贯穿于衰老过程的最普遍、最本质、最重要的生化副反应。目前,老化是各类生物副反应的必然结果这一观点已逐步得到广泛认同。由诸如抗氧化、羰基清除及细胞修复这样一些数量有限的基因群所调控的生物防御系统是影响寿命的控制因素,这些基因群即所谓的“衰老基因”。而糖基化、蛋白交联、自由基导致的过氧化、核苷酸变异以及其它生物副反应都能导致与衰老密切相关 AGEs 和 ALEs 的形成。研究和揭示老年色素形成的生化本质的最终目的是为了探讨防老抗衰的方法和技术。老年色素形成机理的揭示为医学美容的研究和应用奠定了重要的理论基础^[1, 5, 40]。

参 考 文 献

- 1、龚萍,李国林,印大中.老年色素类荧光物质形成的生化机理.生命科学杂志,2001,5:19-24.
- 2、Ikeda K, Akiyama H, Arai T, Kondo H, Haga C, Tsuchiya K, Yamada S, Murayama S, Hara A. Neurons containing Alz-50-immunoreactive granules around the cerebral infarction: evidence for the lysosomal degradation of altered tau in human brain? *Neurosci Lett* 2000, 284(3):187-9.
- 3、Hegedus ZL. The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology*, 2000, 145:85-101.
- 4、Porta EA, Mower HF, Moroye LC, Palimbo NE. Differential features between lipofuscin and various experimentally produced “ceroid pigments”. In Zs.-Nagy I (ed): *Lipofuscin-1987. State of the Art. Amsterdam, Excerpta Medica*, 1988:341-374.
- 5、Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21:871-888.
- 6、Hannover A. Mikroskopische Untersuchungen des Nervensystems. *Naturv Math Afh Copenhagen*, 1842, 10:1-112.
- 7、Huech W. Pigmentstudien. *Beitr Pathol Anat Allgem Pathol*, 1912, 54:68-232.

8. Björkerud S. Isolated lipofuscin granules - a survey of a new field. *Adv Geront Res*, 1964, 1:257-288.
9. Pirie A. Formation of N'-formylkynurenine in proteins from lens and other sources by exposure to sunlight. *Biochem J*, 1971, 125:203-208.
10. Wickens DG, Norden AG, Lunec J, Dormandy TL. Fluorescence changes in human gamma-globulin induced by free radical activity. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 742:607-616.
11. Kikugawa K, Kato T, Hayasaka A. Formation of dityrosine and other fluorescent amino acids by reaction of amino acids with lipid hydroperoxides. *Lipids*, 1991, 26:922-928.
12. Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science*, 1992, 257:1220-1224.
13. Yin DY, Yuan XM, Brunk UT. Test-tube simulated lipofuscinogenesis: Effect of oxidative stress on autophagocytotic degradation. *Mech Ageing Dev*, 1995, 81:37-50.
14. Mole SE, Mitchison HM, Munroe PB. Molecular basis of the neuronal ceroid lipofuscinoses: mutations in CLN1, CLN2, CLN3 and CLN5. *Hum Mutat*, 1999, 14:199-215.
15. almer DN, Husbands DR, Winter PJ, Blunt JW, Jolly RD. Ceroid lipofuscinosis in sheep: I. bis(monoacylglycero)phosphate, dolichol, ubiquinone, phospholipids fatty acids, and fluorescence in liver lipopigment lipids. *J Biol Chem*, 1986, 261:1766-1772.
16. Palmer DN, Bayliss SL, Clifton PA, Grant VJ. Storage bodies in the ceroid lipofuscinosis: Low-molecular-weight components, unusual amino acids and reconstitution of fluorescent bodies from non-fluorescent components. *J Inher Metab Dis*, 1993, 16:292-295.
17. Westermarck P, Johnson KH. Amyloidosis and aging. in Mscieira-Coelho A(ed). *Molecular Basis of Aging*, London, CRC Press, 1995:437-458.

18. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 1956, 11:289-300
19. Chio KS, Tappel AL. Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malondialdehyde and amino acids. *Biochemistry*, 1969, 8:2821-1827.
20. Kikugawa K, Machida Y, Kida M, Kurechi T. Studies on peroxidized lipid: III. Fluorescent pigments derived from the reaction of malonaldehyde and amino acids. *Chem Pharm Bull*, 1981, 29:3003-3011.
21. Gutteridge JMC, Heys AD, Lunec J. Fluorescent malondialdehyde polymers from hydrolysed 1,1,3,3-tetramethoxypropane. *Anal Chim Acta* 1977, 94:209-211.
22. Nielsen H, Covalent binding of peroxidized phospholipid to protein: III. Reaction of individual phospholipids with different proteins. *Lipids*, 1981, 16:215-222.
23. Hodge JE. Chemistry of browning reactions in model system. *J Agric Food Chem*, 1953, 1:928-943.
24. Monnier VM. Nonenzymatic glycosylation, the Maillard reaction and the aging process. *J Gerontol*, 1990, 45:B105-111.
25. Sell DR, Nagaraj RH, Grandhee SK, Odetti P, Lapolla A, Fogarty J, Monnier VM, Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes/Metab Rev*, 1991, 7:239-251.
26. Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD, Sternberg P. Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis*, 1999, 5:32.
27. Bensch KG, Fleming JE, Lohmann W. The role of ascorbic acid in senile cataract. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82:7193-7196.
28. Yin D, Brunk UT. Oxidized ascorbic acid and reaction products between ascorbic and amino acids might constitute part of age pigments. *Mech Ageing Dev*, 1991, 61:99-112.

29. Yin D. Lipofuscin-like fluorophores can result from reactions between oxidized ascorbic acid and glutamine. Carbonyl-protein cross-linking may represent a common reaction in oxygen radical and glycosylation-related ageing processes. *Mech Ageing Dev*, 1992, 62:35-46.

30. Hooghwinkel GJM, Blaauboer L, Novak L, Trippelwitz LAW. On the composition of autofluorescent accumulation products: ceroid and lipofuscin. in Freysz L, Dreyfus H, Massarelli R, Gatt S (eds): *Enzymes of Lipid Metabolism II*. New York, Plenum press, 1986: 827-831.

31. Alroy J, Gasperi D, Warren CD. Application of lectin histochemistry and carbohydrate analysis to the characterization of lysosomal storage disease. *Carbohydr Res* 1991; 213: 229-250.

32. Katz ML, Eldred GE, Robinson WG: Lipofuscin autofluorescence: evidence for vitamin A involvement in the retina. *Mech Ageing Dev* 1987, 39:81-90.

33. Katz ML, Robinson WG, Herrmann RK, Groome AB, Bieri JG. Lipofuscin accumulation resulting from senescence and vitamin E deficiency: Spectral properties and tissue distribution. *Mech Ageing Dev*, 1984, 25:149-159.

34. Eldred GE, Lasky MR. Retinal age pigments generated by self-assembling lysosomotropic detergents. *Nature*, 1993, 361:724-726.

35. Karnaukhov VN, Tataryunas TB, Petrunyaka VV. Accumulation of carotenoids in brain and heart of animals on aging; The role of carotenoids in lipofuscin formation. *Mech Ageing Dev*, 1972, 2:201-210.

36. Wolfe LS, Ng Ying Kin NMK, Palo J, Haltia M. Raised levels of cerebral cortex dolichols in Alzheimer's disease. *Lancet*, 1982, 2:99.

37. Wolfe LS, Ivy GO, Witkop CJ. Dolichols, lysosomal membrane turn over and relationships to the accumulation of ceroid and lipofuscin in inherited diseases, Alzheimer's disease and aging. *Chem Scripta*, 1987, 27:79-84.

38. Seto H, Okuda T, Takesue T, Ikemura T. Reaction of malonaldehyde with

nucleic acid: I. Formation of fluorescent pyrimido (1,2-a) purin -10(3H)-one nucleosides. Bull Chem Soc Jpn, 1983, 56:1799-1802.

39、Winter CK, Segall HJ, Haddon WF. Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal in vitro, Cancer Res, 1994, 29:429-432.

40、印大中. 衰老,千古之谜的终结. 中国老年学杂志, 2008, 28:209-211.

www.cnki.net