

# 绿茶水粗提物抗中波紫外线致人表皮细胞衰老作用

## Effect of anti-aging on human epidermal keratinocyte by UVB induced for green tea crude water extract

王 振<sup>1</sup> 刘仲华<sup>1,2,3</sup> 蔡淑贤<sup>1,2,3</sup> 刘 安<sup>1</sup> 文 祎<sup>1</sup>

WANG Zhen<sup>1</sup> LIU Zhong-hua<sup>1,2,3</sup> CAI Shu-xian<sup>1,2,3</sup> LIU An<sup>1</sup> WEN Yi<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 湖南 长沙 410128; 2. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410128; 3. 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410128)

(1. Key Lab of Tea Science of China Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2. National Research Center of Engineering & Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha, Hunan 410128, China; 3. Collaborative Innovation Center of Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha, Hunan 410128, China)

**摘要:**以人表皮角质形成细胞(HaCaT)为模型,采用中波紫外线诱导细胞衰老,研究绿茶水粗提物对细胞的抗衰老效果。在细胞培养基(DMEM)中分别添加0~20 μg/mL绿茶水粗提物,培养细胞接受60 mJ/cm<sup>2</sup> UVB照射诱导,考察绿茶水粗提物对细胞形态、凋亡水平、细胞存活率、细胞内抗氧化酶活力、细胞内活性氧簇(ROS)含量、丙二醛(MDA)含量、细胞线粒体膜电位、Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP酶活力的影响。结果表明:绿茶水粗提物对受诱导细胞在细胞体积、形状、核体积上明显改善,能抑制细胞凋亡;细胞存活率提高(30.52±8.69)%;细胞内抗氧化酶活力明显提高;ROS含量下降17.16%;MDA含量降低(50.69±6.81)%;JC-1染色红绿荧光平均光密度比提高13.75%;Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-APT酶活力提高(103.95±3.64)%。试验结果表明绿茶水粗提物具有抗中波紫外线致人表皮细胞衰老作用。

**关键词:**绿茶;水粗提物;中波紫外线;人表皮角质形成细胞;抗衰老

**Abstract:** In this study, anti-aging effects of green tea crude water extract were studied using human epidermal keratinocyte as model which induced by ultraviolet B (UVB). The green tea extract of 0~20 μg/mL was added to DMEM cell culture medium, then cells were induced by radiation of 60 mJ/cm<sup>2</sup> UVB. The anti-aging effects were studied by cellular morphology, apoptosis level, cell viability, intracellular antioxidant enzyme activity, intracellular active oxygen

cluster (ROS) content, malonaldehyde (MDA) content, cell mitochondrial membrane potential and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP enzyme activities. The results showed that the crude extract of green tea could obviously improve cell volume, cell shape, and nuclear volume of induced cells. Apoptosis of cells was inhibited, and the survival rate was increased by (30.52±8.69)%. The activity of antioxidant enzyme in cells was obviously improved. ROS content was decreased by 17.16%. The content of MDA was reduced by (50.69±6.81)%. The average light density of red green fluorescence in JC-1 dyeing was increased by 13.75%. Besides, the activity of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATP enzyme was increased by (103.95±3.64)%. The experimental results show that green tea extracts have anti-UVB induced aging effect on human epidermal cell, and this study may provide scientific basis to develop anti-aging products of green tea.

**Keywords:** green tea; water crude extract; ultraviolet radiation B; HaCaT; anti-aging

茶是最普及的一种天然饮料,中国已有长达4700年的饮茶史<sup>[1]</sup>。绿茶(Green Tea)是中国主要的未发酵茶类之一,茶鲜叶经杀青、揉捻、干燥等工艺加工而成。近年来消费者越来越能接受喝茶预防衰老的观点。绿茶中含有22%~30%多酚类物质和其它活性成分<sup>[2]</sup>,大量研究结果证明绿茶能够保护机体氧化还原体系<sup>[3-4]</sup>,保护线粒体的功能与结构,避免线粒体及细胞功能的衰退,对抗衰老有一定作用<sup>[5-6]</sup>。

紫外线照射引起人表皮细胞衰老,其表现包括造成机体免疫力减弱,组织及器官功能减退,创伤后修复变慢等<sup>[7]</sup><sup>[8]</sup><sup>[36-37]</sup>。目前茶提取物在抗氧化活性<sup>[9]</sup>、抗辐射<sup>[10]</sup>、抗衰老<sup>[11]</sup>、抗肿瘤<sup>[12]</sup>、降脂减肥<sup>[13]</sup>等功效方面已有大量研究

**基金项目:**国家自然科学基金项目(编号:31471590);十三五规划项目(编号:CARS-23-03A, CARS-23-09B, ARS-23-C)

**作者简介:**王振,男,湖南农业大学在读硕士研究生。

**通信作者:**刘仲华(1965—),男,湖南农业大学教授,博士。

E-mail: larkin-liu@163.com

**收稿日期:**2017-11-05

报道。在研究绿茶抗衰老效果模型方面,主要以小鼠模型<sup>[14-15]</sup>、大鼠模型<sup>[16]</sup>为主,在衰老诱导方式上主要采用自然诱导<sup>[17]</sup>、D-半乳糖诱导<sup>[18]</sup>和热应激诱导<sup>[19]</sup>,而线虫模型<sup>[20]</sup>、人皮肤组织模型<sup>[21]</sup>,紫外线诱导人表皮细胞衰老模型<sup>[22]</sup>的相关研究报导较少。诸芳等<sup>[16]</sup>研究表明,绿茶能提高自然衰老下SD大鼠红细胞中SOD活力,减少血清中MDA含量。李琼等<sup>[17]</sup>的研究表明绿茶多酚能够提高小鼠血清中SOD和GSH-Px的活性,增加海马脑区突触后致密物-95(PSD95)和钙离子/钙调素依赖性蛋白激酶II(CaMKII)的蛋白表达。但是现阶段对于绿茶抗衰老作用的研究往往仅使用抗氧化指标或补充部分蛋白指标来衡量衰老程度,不够系统。

本研究拟建立UVB致HaCaT细胞衰老模型,并以绿茶水提取物对细胞进行预处理,检测不同组细胞相关指标的变化,根据不同组间差距比较,对绿茶水提取物抗衰老作用进行评价。为绿茶抗衰老保健品的开发提供理论依据。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料与试剂

古丈毛尖绿茶:湖南古楼雪峰云雾茶有限公司;

人正常皮肤永生角质形成细胞(HaCaT):中国典型培养物保藏中心(细胞库);

胎牛血清、高糖DMEM培养基:以色列Biological Industries公司;

磷酸缓冲盐溶液、二甲基亚砷、噻唑蓝(MTT):生工生物工程(上海)股份有限公司;

RIPA细胞裂解液:江苏凯基生物技术股份有限公司;

线粒体膜电位检测试剂盒、ATP酶试剂盒:南京建成生物工程研究所;

Annexin V-FITC试剂盒及DCFH-DA试剂盒:碧云天生物技术研究所;

BCA蛋白浓度试剂盒:北京康为世纪生物科技有限公司。

#### 1.1.2 主要仪器设备

超净工作台:SW-CJ-1D型,苏州净化设备有限公司;

紫外光联仪:CL-1000型,美国UVP公司;

多功能酶标仪:Varioskan LUX型,美国Thermo公司;

离心机:EBA 270型,德国Rotina公司;

CO<sub>2</sub>细胞培养箱:NU-4750E型,美国Nuair公司;

荧光显微镜:IX71型,日本Olympus公司;

旋转蒸发器:R-210型,瑞士Buchi公司;

冷冻干燥机:Alpha 1-4型,德国Christ公司;

微孔板恒温振荡器:ST60-4型,杭州米欧仪器有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 绿茶水粗提物制备 称取50g茶叶,加入500mL沸水,100℃水浴提取30min,每隔10min搅拌一次,纱布粗过滤,滤液至回收瓶。过滤后的茶渣重复提取一次,纱布粗过

滤后合并滤液,然后进行抽滤,滤液经旋转蒸发器减压浓缩至原体积的1/10,冷冻干燥得到绿茶水粗提物冻干粉,密封包装,-20℃保存。

1.2.2 细胞培养 将HaCaT细胞接种于10cm细胞培养皿中,加入含有10%胎牛血清及1%双抗(青霉素-链霉素混合液)的高糖DMEM培养基中。将细胞皿置于CO<sub>2</sub>培养箱中,培养条件为温度37℃、5%CO<sub>2</sub>浓度。当细胞生长至90%融合时传代,使用含有0.25%EDTA的胰酶消化,消化完成后立即使用培养基终止消化,吹打重悬后移至10mL离心管中离心。弃上清液,使用高糖DMEM培养基调整细胞密度后接种至所需细胞培养皿中。

1.2.3 细胞分组及处理 待细胞生长融合至70%后,消化细胞,使用高糖DMEM培养基调整细胞密度(96孔、24孔细胞培养板为5×10<sup>4</sup>mL<sup>-1</sup>,6孔细胞培养板为2.5×10<sup>6</sup>mL<sup>-1</sup>)后将细胞分为空白组、UVB模型组、绿茶水粗提物实验组(GT-1组、GT-5组、GT-10组、GT-20组)接种至所需培养板(皿)中,吸出培养基,再添加不同绿茶水粗提物浓度的DMEM培养基,各组采用细胞培养板(皿)培养6h后,吸出培养基,加入少量磷酸缓冲盐溶液(PBS)覆盖细胞,用紫外光联仪对细胞进行紫外线处理,辐照剂量为60mJ/cm<sup>2</sup>,空白组使用铝箔覆盖。各组处理后立即吸出PBS溶液,向培养板(皿)中加入不含绿茶水粗提物的DMEM培养基,在培养温度37℃、CO<sub>2</sub>浓度5%条件下培养24h后,对各指标进行检测分析。细胞分组及处理情况对照见表1。

表1 细胞分组及样品处理对照表  
Table 1 Cell grouping and treatment table

组别	添加绿茶水粗提物浓度/(μg·mL <sup>-1</sup> )	接受中波紫外线辐照剂量/(mJ·cm <sup>-2</sup> )
空白组	0	0
模型组	0	60
GT-1组	1	60
GT-5组	5	60
GT-10组	10	60
GT-20组	20	60

1.2.4 细胞形态观察 使用荧光显微镜进行观察,仪器进行自动白平衡后收集图像。

1.2.5 细胞存活率检测 吸出培养基,向每孔中重新加入100μL含有0.5mg/mL噻唑蓝(MTT)的DMEM培养基,在培养温度37℃、5%CO<sub>2</sub>浓度条件下培养4h,吸出培养基,向每孔中加入150μL二甲基亚砷(DMSO),恒温振荡器振荡10min(温度25℃,振荡速度100r/min),用多功能酶标仪测定各孔吸光值,检测波长为570nm。根据吸光值计算不同组细胞存活率,计算公式为:

$$V = \frac{OD_1}{OD_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

V——细胞存活率,%;

OD<sub>1</sub>——各孔在570nm处吸光度;

$OD_0$ ——空白组各孔在 570 nm 处平均吸光度。

1.2.6 细胞线粒体膜电位检测 使用 JC-1 试剂对细胞进行染色。使用荧光显微镜观察染色结果并收集图像,计算不同组红绿荧光平均光密度比( $AOD_{红:绿}$ ),计算公式为:

$$AOD_{红:绿} = \frac{IOD_{红}}{S_{红}} \div \frac{IOD_{绿}}{S_{绿}}, \quad (2)$$

式中:

$AOD_{红:绿}$ ——各组红绿荧光平均光密度比;

$IOD_{红}$ ——各组红色荧光光密度;

$IOD_{绿}$ ——各组绿色荧光光密度;

$S_{红}$ ——各组红色荧光发光面积,  $Px$ ;

$S_{绿}$ ——各组绿色荧光发光面积,  $Px$ 。

1.2.7 细胞内抗氧化酶、 $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP 酶活力及 MDA 含量检测 吸出培养基,使用 PBS 溶液清洗残留的培养基,每孔中加入 1 mL RIPA 细胞裂解液收集细胞。使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,按照试剂盒说明书要求及步骤测定  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATP 酶活力、GSH-Px、SOD、CAT、LDH 活性及 MDA 含量。

1.2.8 细胞内 ROS 测定 吸出培养基,每孔加入 200  $\mu$ L 含有 10  $\mu$ mol/mL 二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)的无血清 DMEM 培养基,置于  $CO_2$  培养箱中继续培养 20 min 后,使用无血清的 DMEM 培养基清洗 3 次,彻底去除残留的 DCFH-DA。在荧光显微镜下使用白光及绿光进行观察,白光进行白平衡后收集图像,通过不同组平均光密度差异,计算 ROS 含量,计算公式为:

$$A = \frac{IOD_1}{S_1} \div \frac{IOD_0}{S_0} \times 100\%, \quad (3)$$

式中:

A——ROS 含量, %;

$AOD_1$ ——各组荧光光密度;

$IOD_0$ ——空白组荧光光密度;

$S_1$ ——各组荧光发光面积,  $PPI$ ;

$S_0$ ——空白组荧光发光面积,  $PPI$ 。

1.2.9 细胞凋亡情况测定 吸出培养基,使用 PBS 溶液洗涤后依次加入 195  $\mu$ L Annexin V-FITC 结合液, 5  $\mu$ L Annexin V-FITC 工作液, 10  $\mu$ L 碘化丙啶染色液(PI),置于室温(20~25  $^{\circ}C$ )下避光孵育 20 min。孵育结束后立即在荧光显微镜下使用白光、绿光及红光进行观察,白光进行白平衡后收集图像,分析不同组荧光染色情况。

### 1.3 数据分析

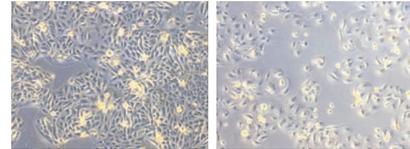
以 GraphPad Prism 6.02 软件对试验数据进行统计分析,采用 ANOVA 进行单因素方差分析;以 Image pro plus 6 软件进行光度分析。

## 2 结果与分析

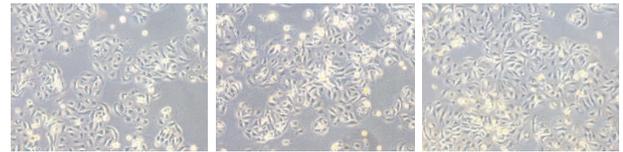
### 2.1 绿茶水粗提物对紫外诱导衰老细胞形态的影响

细胞形态变化是细胞衰老过程中各结构退行性变化的直观体现,主要包括细胞体积及细胞核体积变大,核膜内折,染色质固缩,细胞颜色加深等。由图 1 可见:空白组细胞生

长紧密,细胞呈现梭形。模型组细胞数量明显减少,细胞生长松散,细胞体积变小,细胞核体积变大,细胞变圆。各试验组(GT-1、GT-5、GT-10)细胞减少、细胞变圆、细胞核变大情况较模型组有明显改善。模型组细胞符合衰老细胞特征,而 GT-1、GT-5、GT-10 试验组细胞衰老特征不明显,说明绿茶水粗提物能保护紫外线诱导后的细胞形态,降低中波紫外线照射后细胞的衰老水平。



(a) 空白组细胞形态 (b) 模型组细胞形态



(c) GT-1组细胞形态 (d) GT-5组细胞形态 (e) GT-10组细胞形态

图 1 不同处理组显微镜下的细胞形态图

Figure 1 Cell morphologic map of different treatment groups under microscope

### 2.2 绿茶水粗提物对紫外诱导衰老细胞存活率的影响

细胞衰老往往伴随着细胞凋亡水平上升,从而导致细胞存活率下降。由表 2 可见,与空白组相比,模型组细胞存活率下降至  $(71.59 \pm 2.91)\%$ ,两者在  $P < 0.01$  水平差异显著;随着培养基中绿茶水粗提物浓度的提高,GT-1、GT-5、GT-10、GT-20 组的细胞存活率均有明显提高,其中 GT-10 组提高到  $(93.44 \pm 6.22)\%$ 。GT-5 组、GT-10 组、GT-20 组与模型组相比在  $P < 0.01$  水平差异显著,GT-1 组与模型组相比在  $P < 0.05$  水平差异显著。说明绿茶水粗提物能提高紫外线诱导后的细胞存活率。

### 2.3 绿茶水粗提物对紫外诱导衰老细胞膜电位的影响

细胞衰老过程中,细胞呼吸功能减退,线粒体活动减弱,线粒体膜两侧电位降低,表现出线粒体膜去极化的趋势。线粒体膜电位较高使 JC-1 能聚集在线粒体基质中形成能产生红色荧光的聚合物;线粒体膜电位下降时,JC-1 不会大量在线粒体基质中聚集,而是多以单体形式存在,产生绿色荧光。因此,衰老细胞在经过 JC-1 染色后,红绿荧光平均光密度比会明显下降。由图 2 可见,图片叠加后空白组图片色调偏向橙黄色,而模型组整体偏绿。使用软件统计空白组、模型组、GT-10 组红绿荧光平均光密度,计算得到空白组、模型组、GT-10 组红绿荧光平均光密度比( $AOD_{红:绿}$ )分别为 2.742, 2.203, 2.506, GT-10 组  $AOD_{红:绿}$  相对模型组提高了 13.75%。结果表明,绿茶水粗提物能降低紫外线诱导后的细胞线粒体膜的去极化趋势。与空白组相比,模型组绿色荧光较强、红色荧光较弱。在染色过程中,模型组 JC-1 单体比例较高,即模型组细胞线粒体膜电位较低,表现出较强的线粒体膜去极化的趋势,而 GT-10 组去极化趋势比模型组要小,说明细胞衰老较轻。

表 2 不同浓度绿茶水粗提取物紫外线诱导处理的细胞存活率<sup>†</sup>  
Table 2 Cell survival rate induced by UVB of different concentration green tea extracts

组别	粗提取物添加量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	紫外线照射量/ ( $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	吸光值 ( $OD_{570}$ )	存活率/ %	各试验组与模型组 存活率差异/% <sup>*</sup>
空白组	0	0	0.981±0.073	100.02±7.43	39.71±10.38
模型组	0	60	0.702±0.029 <sup>##</sup>	71.59±2.91 <sup>##</sup>	0.01±4.07
GT-1 组	1	60	0.796±0.046 <sup>*</sup>	81.16±4.68 <sup>*</sup>	13.37±6.53
GT-5 组	5	60	0.898±0.046 <sup>**</sup>	91.51±4.72 <sup>**</sup>	27.82±6.59
GT-10 组	10	60	0.917±0.061 <sup>**</sup>	93.44±6.22 <sup>**</sup>	30.52±8.69
GT-20 组	20	60	0.846±0.045 <sup>**</sup>	86.26±4.64 <sup>**</sup>	20.49±6.48

† \* 表示试验组与模型组在  $P < 0.05$  水平差异显著, \*\* 表示试验组与模型组在  $P < 0.01$  水平差异显著; ## 表示模型组与空白组比较在  $P < 0.01$  水平差异显著; ※ 各孔差异为(试验组每个孔存活率/模型组平均存活率)-1, 并对结果进行统计学分析得到各组存活率差异。

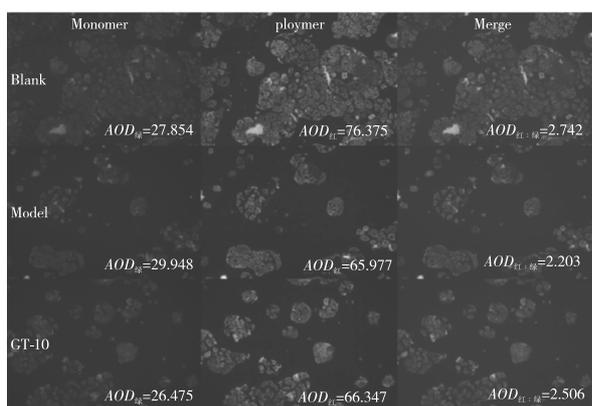


图 2 不同处理组荧光显微镜下细胞 JC-1 染色图  
Figure 2 JC-1 staining of cells in different treatment groups under fluorescence microscope

2.4 绿茶水粗提取物对紫外诱导衰老细胞  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力的影响

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶在维持细胞膜通透性和细胞正常跨膜运输中具有重要作用。随着细胞衰老, 细胞内  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力随之降低, 从而影响到细胞膜正常的生理功能。同时  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶还与细胞膜电位差的形成即细胞兴奋相关, 细胞兴奋状态下新陈代谢得以加强, 有助于抵抗衰老。由表 3 可见, 绿茶水粗提取物能提高紫外线诱导后的细胞  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力。UVB 处理后, 模型组  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP

酶活力 [ $(14.25 \pm 0.3)$  U/mg · Prot] 明显低于空白组 [ $(29.86 \pm 0.93)$  U/mg · Prot], 而 GT-10 组经过绿茶水粗提取物预处理后  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活力能保持在  $(29.06 \pm 0.52)$  U/mg · Prot, 表明绿茶水粗提取物能预防中波紫外线照射引起的细胞衰老。

2.5 绿茶水粗提取物对紫外诱导衰老细胞内抗氧化酶活力及氧化产物的影响

氧化还原失衡是机体衰老的重要诱因之一<sup>[23]</sup>, 经典的小鼠衰老模型是用 D-半乳糖诱导小鼠衰老, 以 GSH-Px、SOD 活力及 MDA 含量作为衰老指标。而 CAT 作为 SOD 的下游, 能将 SOD 反应产物过氧化氢进一步分解, 补充 SOD 在抗氧化方面的作用。

由表 4 可见, 模型组与空白组相比, 细胞内 GSH-Px、CAT、SOD 活力分别下降  $(77.52 \pm 6.33)\%$ ,  $(54.51 \pm 4.17)\%$ ,  $(44.46 \pm 3.79)\%$ , MDA 含量提高  $(136.64 \pm 12.78)\%$ , 细胞内抗氧化酶活力明显降低, 氧化产物堆积。而 GT-1、GT-5、GT-10、GT-20 组抗氧化酶活力及 MDA 含量均有改善, 其中 GT-10 组 GSH-Px、CAT、SOD 活力分别提高  $(257.74 \pm 110.26)\%$ ,  $(82.52 \pm 5.60)\%$ ,  $(72.22 \pm 5.79)\%$ 、MDA 含量下降  $(50.69 \pm 6.81)\%$ , 氧化酶活力明显提高, 氧化产物减少。说明绿茶水粗提取物能提高紫外线诱导后细胞中 GSH-Px、SOD、CAT 活力, 降低 MDA 含量, 维持细胞内氧化还原平衡, 预防中波紫外线照射引起的细胞衰老。

表 3 不同浓度绿茶水粗提取物紫外线诱导处理的细胞 ATP 酶活力<sup>†</sup>

Table 3 Cell ATP enzyme activity induced by UVB treatment in different concentration green tea extracts

组别	粗提取物添加量/ ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	紫外线照射量/ ( $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ )	$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATP 酶活力/ ( $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Prot}$ )	各试验组与模型组 酶活力的差异/% <sup>*</sup>
空白组	0	0	29.86±0.93	109.56±6.54
模型组	0	60	14.25±0.34 <sup>##</sup>	0.01±2.38
GT-1 组	1	60	11.07±0.94 <sup>*</sup>	-22.33±6.56
GT-5 组	5	60	22.12±0.75 <sup>**</sup>	55.20±5.24
GT-10 组	10	60	29.06±0.52 <sup>**</sup>	103.95±3.64
GT-20 组	20	60	22.16±0.20 <sup>**</sup>	55.54±1.37

† \* 表示试验组与模型组在  $P < 0.05$  水平差异显著, \*\* 表示试验组与模型组在  $P < 0.01$  水平差异显著; ## 表示模型组与空白组比较在  $P < 0.01$  水平差异显著; ※ 各孔差异为(试验组每个孔酶活力/模型组平均酶活力)-1, 并对结果进行统计学分析得到各组酶活力差异。

表 4 不同浓度绿茶水粗提取物紫外线诱导处理的细胞抗氧化酶活力及 MDA 含量<sup>†</sup>

Table 4 Antioxidant enzyme activity and MDA content of UVB induced cells in different concentration green tea extracts

处理组别	GSH-Px/(U·mL <sup>-1</sup> )	SOD/(U·mL <sup>-1</sup> )	CAT/(U·mL <sup>-1</sup> )	MDA/( $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> )
空白组	14.90±1.43	26.89±0.45	17.74±0.85	2.85±0.11
模型组	3.40±1.27 <sup>##</sup>	14.04±0.89 <sup>##</sup>	7.92±0.22 <sup>##</sup>	6.74±0.19 <sup>##</sup>
GT-1 组	4.97±0.81 <sup>*</sup>	17.86±0.86 <sup>**</sup>	10.24±0.54 <sup>*</sup>	5.23±0.16 <sup>*</sup>
GT-5 组	10.18±1.58 <sup>**</sup>	21.38±0.69 <sup>*</sup>	12.48±0.36 <sup>**</sup>	4.06±0.15 <sup>**</sup>
GT-10 组	11.25±0.43 <sup>**</sup>	25.71±1.56 <sup>**</sup>	14.45±0.63 <sup>**</sup>	3.31±0.29 <sup>**</sup>
GT-20 组	10.14±0.25 <sup>**</sup>	25.10±0.62 <sup>**</sup>	14.45±0.82 <sup>**</sup>	3.36±0.17 <sup>**</sup>

<sup>†</sup> \* 表示试验组与模型组在 P<0.05 水平差异显著, \*\* 表示试验组与模型组在 P<0.01 水平差异显著;  
## 表示模型组与空白组比较在 P<0.01 水平差异显著。

## 2.6 绿茶水粗提取物对紫外诱导衰老细胞内 ROS 含量的影响

生物体衰老是过量自由基积累引起的,ROS 在体内大量产生,超过机体自身对 ROS 的清除能力时,ROS 会在体内大量积累,ROS 能与蛋白质等大分子交联,影响其正常生理功能;同时 ROS 还会造成 mtDNA 的损伤,加速细胞衰老<sup>[24]</sup>。由图 3 可见,与空白组细胞相比,模型组绿色荧光较强,细胞内 ROS 含量较高;而 GT-10 组荧光值较模型组要弱,说明其 ROS 含量较少。使用软件对图片进行分析后发现,空白组、模型组、GT-10 组相对平均光密度分别为 49.598,76.222,65.054,以空白组 ROS 含量为 100%,模型组相较空白组 ROS 含量增加 53.67%,GT-10 组相较模型组减少 17.16%。说明绿茶水粗提取物能通过抑制 ROS 的积累,预防中波紫外线照射引起的细胞衰老。

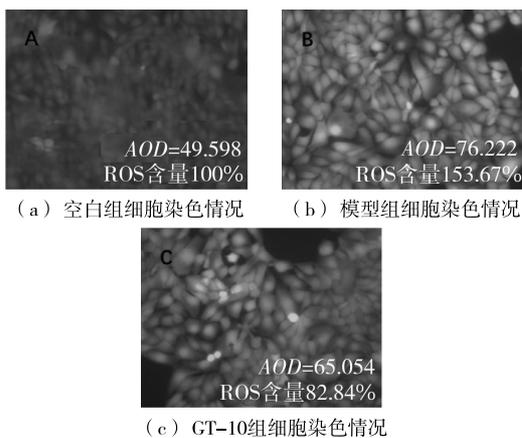


图 3 不同处理组荧光显微镜下细胞 DCFH-DA 染色图  
Figure 3 DCFH-DA staining of cells in different treatment groups under fluorescence microscope

## 2.7 绿茶水粗提取物对紫外诱导衰老细胞凋亡水平的影响

细胞衰老过程往往伴随着细胞凋亡,细胞衰老时 ROS 积累,氧化水平上升引起线粒体膜通透性改变,线粒体释放细胞色素 C(Cyt-C),激活 Caspase-9 进入激活 Caspase-3,形成凋亡小体引起细胞凋亡。因此细胞凋亡水平能在一定程度上表现细胞衰老水平。在细胞凋亡早期,细胞膜上的磷脂酰丝氨酸外翻,Annexin-FITC 与之结合产生绿色荧光;凋亡晚期细胞膜通透性改变,碘化丙啶(PI)能进入细胞与细胞核结合,产生红色荧光,根据两种荧光能够判断细胞的凋亡水

平。由图 4 可见,模型组 Annexin-FITC 染色与 PI 染色荧光均显著高于空白组,而 GT-10 组荧光与模型组相比较低,说明 UVB 处理后细胞凋亡水平明显升高,而绿茶水粗提取物对此有抑制作用。说明绿茶水粗提取物能预防中波紫外线照射引起的细胞衰老。

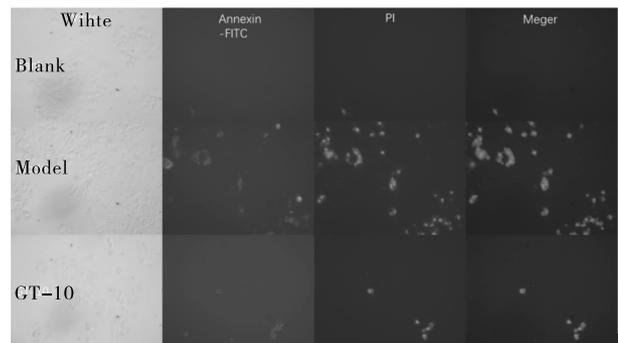


图 4 不同处理组荧光显微镜下细胞 Annexin-FITC 染色图  
Figure 4 Annexin-FITC staining of cells in different treatment groups under fluorescence microscope

## 3 结论

通过对中波紫外线诱导人表皮角质形成细胞衰老特征变化的比较分析,发现绿茶水粗提取物能预防 UVB 诱导后模型细胞表现出的衰老特征,有效改善细胞体积、形状、核体积等细胞形态,抑制细胞凋亡趋势;提高细胞存活率和细胞内抗氧化酶活力,降低细胞内氧化产物(MDA)含量,抑制细胞内 ROS 的积累,抑制细胞线粒体膜电位去极化的趋势,提高细胞内 Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATP 酶活力。表明绿茶水粗提取物抗中波紫外线诱导人表皮角质形成细胞衰老具有较好的效果,为绿茶抗衰老产品研发提供科学依据。

现阶段的研究中对于衰老机理的学说主要有自由基氧化应激学说、细胞凋亡学说、线粒体 DNA 损伤学说、端粒学说、TOR 分子理论 5 种<sup>[25]</sup>,中波紫外线可能通过增加细胞内 ROS 含量与凋亡水平的方式诱导细胞衰老,而绿茶水粗提取物能够显著抑制中波紫外线引起细胞内 ROS 含量增加与凋亡水平上升,因此可能通过这些途径抑制中波紫外线诱导人表皮角质形成细胞衰老。本研究结果符合自由基氧化应激学说与细胞凋亡学说的观点,与韩小苗<sup>[26]</sup>、马蕊<sup>[8]35</sup>、赵海梅<sup>[27]</sup>等使用 D-半乳糖诱导的衰老小鼠模型、UVB 诱导表皮细胞模型和人内皮细胞自然衰老模型得到的变化趋势一致。

绿茶水粗提物各成分组成、含量、抗衰老功能作用与机制还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] 良石, 杨焕瑞. 中医话茶疗[M]. 哈尔滨: 黑龙江科技出版社, 2008: 扉页.
- [2] 连艳玲, 何东仪. 表没食子儿茶素没食子酸酯的免疫调节机制研究进展[J]. 上海预防医学, 2010, 22(10): 538-541.
- [3] 林勇, 刘仲华, 马蕊. 茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯抑制中波紫外线诱导 HaCaT 细胞氧化损伤研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015(4): 1 224-1 228.
- [4] 林向飞. 不同剂型的光保护药物对 UVB 光损伤的干预作用及其对相关调控分子影响的实验研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2005: 89-100.
- [5] 贺音. EGCG 缓解丙烯酰胺诱导的大鼠肝脏及神经损伤机理研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017: 65-55.
- [6] 尹述婷. EGCG 对铅致大鼠海马神经元突触可塑性和氧化损伤的修复作用及机制[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2009: 64-65.
- [7] 梁治学, 胡燕, 李其忠, 等. “衰老”词源学探析[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(22): 6 619-6 620.
- [8] 马蕊. 茶叶水提物抗皮肤光老化的作用及机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013.
- [9] 潘顺顺, 赖幸菲, 孙伶俐, 等. 不同季节翠玉品种 3 大茶类生化成分及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(9): 22-27.
- [10] 王舟, 曾令福, 肖元梅, 等. 绿茶抗辐射损伤作用研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2003, 34(2): 303-305.
- [11] 李军. 绿茶多酚抗衰老作用的实验研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2013: 40-14.
- [12] 冯强, 李毅, 王文洋, 等. 绿茶提取物对乳腺癌细胞株 MCF-7 的作用机制探讨[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(12): 1 999-2 002.
- [13] 刘安军, 郭丹青, 刘慧慧, 等. 绿茶提取物的降血脂及减肥作用研究[J]. 现代食品科技, 2012, 28(6): 601-605.
- [14] LI Jun, LIN Li-wen, XIN Qin, et al. Anti-aging effect of green tea polyphenols on D-galactose-induced subacute aging in mice [J]. Food & Drug, 2013, 15(2): 106-109.
- [15] LIU Hua, SHEN Xue-hui-zi, NIE Lan, et al. Study on Influence of se-enriched and zinc-enriched green tea on anti-oxidation and anti-aging of mice in guizhou[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2014, 42(28): 9 657-9 660.
- [16] 褚芳, 万筱荣, 周银平, 等. 两种茶叶对 SD 大鼠营养保健功能与抗衰老作用的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2000, 10(2): 94-97.
- [17] 李琼, 李勇. 绿茶多酚预防老龄 C57BL/6J 小鼠学习记忆功能衰退实验研究[J]. 科技导报, 2009, 27(22): 26-31.
- [18] 初晓, 姚如泳, 韩志武. 茶多酚对 D-半乳糖致衰老小鼠免疫功能的调节作用[J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(5): 637-638.
- [19] 张健伟. 红茶提取物抗衰老效应研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2013: 17-19.
- [20] XIONG Li-gui, CHEN Yi-jun, TONG Jie-wen, et al. Epigallocatechin-3-gallate promotes healthy lifespan through mitochondrial hormesis during early-to-mid adulthood in *Caenorhabditis elegans*[J]. Redox Biol, 2017, 14: 305.
- [21] 高雅倩, 王曦, 金银珠, 等. 含灰树花子实体及绿茶提取物眼霜的抗衰老功效研究[J]. 中国美容医学杂志, 2014, 23(17): 1 404-1 407.
- [22] 陈文琦, 许惠娟, 毕志刚. UVB 照射诱导皮肤成纤维细胞早期衰老的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(2): 98-100.
- [23] 胡明曦, 张栩, 陈畅. 细胞氧化还原调控与衰老[J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(3): 288-294.
- [24] 张军, 张敬, 石红军, 等. 茶多酚对紫外线引起的 DNA 损伤的保护作用[J]. 同济大学学报: 医学版, 2004(2): 91-92, 97.
- [25] 游庭活, 温露, 刘凡. 衰老机制及延缓衰老活性物质研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2015, 27(11): 1 985-1 990.
- [26] 韩小苗, 吴苏喜, 吴美芳, 等. 红花籽油对 D-半乳糖致衰老小鼠模型的抗衰老作用[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 127-131.
- [27] 赵海梅, 杨斌, 成蓓. 衰老血管内皮细胞线粒体膜电位与活性氧的变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(15): 2 729-2 734.
- (上接第 114 页)
- [15] 王玮琼, 熊光权, 陈玉霞, 等. 鲈鱼半成品辐照灭菌剂量研究[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 107-110.
- [16] 罗志平, 孟兰贞, 徐远芳, 等.  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  辐照对茶花蜂花粉的杀菌效果及品质影响[J]. 食品与机械, 2015, 31(3): 150-153.
- [17] 李淑荣, 冯敏, 李澧, 等. 辐照对泡椒凤爪在货架期中的营养品质的影响[J]. 核农学报, 2013, 27(10): 1 490-1 494.
- [18] 李澧, 朱佳廷, 冯敏, 等. 辐照灭菌对干制鸭肉品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(12): 278-280.
- [19] BAPTISTA R F, TEIXEIRA C E, LEMOS M, et al. Effect of high-dose irradiation on quality characteristics of ready-to-eat broiler breast fillets stored at room temperature[J]. Poultry Science, 2014, 93(10): 2 651-2 656.
- [20] 刘春泉, 冯敏, 李澧, 等. 辐照处理对冷冻羊肉品质的影响[J]. 核农学报, 2014, 28(6): 1 018-1 023.
- [21] 冯敏, 王玲, 杨萍, 等. 辐照处理对于制海兔杀菌效果及其营养成分的影响[J]. 核农学报, 2010, 24(5): 982-986.
- [22] 冯敏, 严建民, 李澧, 等. 辐照对宠物干粮食品酸价的影响[J]. 核农学报, 2012, 26(9): 1 260-1 264.
- [23] 高鹏, 王艳, 黄敏, 等.  $^{60}\text{Co}$ - $\gamma$  射线辐照对凤爪软罐头的灭菌作用和品质的影响[J]. 食品科学, 2009(21): 36-38.
- [24] FENG X, MOON S, LEE H, et al. Effect of irradiation on the parameters that influence quality characteristics of uncured and cured cooked turkey meat products[J]. Poultry Science, 2016, 95(12): 2 986-2 992.
- [25] 范凯, 廖李, 程薇, 等. 茶多酚结合辐照对鲈鱼冷藏品质的影响[J]. 核农学报, 2016, 30(9): 1 780-1 785.
- [26] 李树锦, 高美须, 刘超超, 等. 辐照对鲜切蔬菜维生素 C 及亚硝酸盐的影响[J]. 中国食品学报, 2015(9): 224-230.
- [27] 毛青秀, 邓钢桥, 李文革, 等. 辐照对水溶液中亚硝酸盐降解效果研究[J]. 激光生物学报, 2013, 22(3): 225-229.
- [28] 罗小虎, 齐丽君, 房文苗, 等. 电子束辐照降解玉米中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 及对玉米品质的影响[J]. 食品与机械, 2016, 32(10): 111-114.