

## 绿茶和红茶提取物抑制中波紫外线诱导 HaCaT 细胞氧化损伤和凋亡的比较

马蕊<sup>1,2,3</sup>, 刘仲华<sup>1,2\*</sup>, 黄建安<sup>1,2</sup>, 林勇<sup>1,2</sup>, 陈金华<sup>1,2</sup>, 钟源<sup>1,2</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.广西职业技术学院,广西 南宁 530226)

**摘要:**为比较绿茶、红茶提取物对中波紫外线(UVB)诱导角质形成细胞光损伤的抑制作用,用不同浓度的绿茶、红茶提取物对人表皮角质形成细胞(HaCaT)预处理 6 h,以 60 mJ/cm<sup>2</sup> 的剂量照射细胞,比较细胞生存率和细胞上清液中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性以及丙二醛(MDA)含量的变化,用荧光法检测细胞内活性氧(ROS)的含量,用流式细胞仪检测细胞的凋亡变化,并对绿茶、红茶的茶多酚及儿茶素类物质含量进行比较。结果表明:与空白对照组相比,UVB 辐射模型组的 HaCaT 细胞活性下降了 21.61%,细胞损伤严重;与 UVB 辐射模型组相比,绿茶、红茶提取物可提高 UVB 辐射后 HaCaT 细胞的存活率,提高 SOD、GSH-Px 活性( $P<0.01$ ),降低 LDH 活性、MDA 含量和细胞内氧自由基含量( $P<0.01$ ),降低由 UVB 辐射导致的细胞凋亡率( $P<0.01$ ),使细胞凋亡率分别降低了 6.94%和 3.68%;绿茶中茶多酚和儿茶素类物质的含量明显高于红茶,绿茶提取物的抑制效果优于红茶提取物。综合分析以上结果,认为绿茶、红茶提取物可以减少由 UVB 辐射导致的 HaCaT 细胞损伤和凋亡,具有光保护作用,其机制与细胞抗氧化能力的增强和氧自由基的加速清除有关,且绿茶提取物的作用效果比红茶提取物的好。

**关键词:** 绿茶提取物; 红茶提取物; 中波紫外线; HaCaT 细胞; 氧化损伤; 凋亡

中图分类号: S571.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)04-0377-05

### Comparison the inhibitional effects between extracts of green tea and black tea on oxidative damage and apoptosis of HaCaT cells induced by UVB

MA Rui<sup>1,2,3</sup>, LIU Zhong-hua<sup>1,2\*</sup>, HUANG Jian-an<sup>1,2</sup>, LIN Yong<sup>1,2</sup>, CHEN Jin-hua<sup>1,2</sup>, ZHONG Yuan<sup>1,2</sup>

(1.Key Laboratory of Tea Science of Ministry of Education, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.National Research Center of Engineering and Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China; 3.Guangxi Vocational & Technical College, Nanning 530226, China)

**Abstract:** To compare the photo-protective effect of green and black tea extracts on HaCaT cells damaged from ultraviolet radiation B. Sub-confluent HaCaT cells were incubated for 6 h with different doses of extracts from green tea and black tea, and then irradiated with 60 mJ/cm<sup>2</sup> doses of UVB. The change of the cell viability, the activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), lactate dehydrogenase (LDH), and the level of malondialdehyde (MDA) of supernatant were compared. The content of ROS was measured with the fluorescence method. Annexin V/PI double staining was performed to evaluate the change of apoptosis using flow cytometry. In addition, the contents of tea polyphenols and catechins from extracts of green and black tea were also tested. The results were as follows: Compared with control group, the UVB irradiation could seriously harm HaCaT cell and gave rise to

收稿日期: 2013-06-16

基金项目: 教育部创新团队计划项目(2012042); 国家自然科学基金项目(31100502); 国家茶叶产业技术体系项目(CARS-23-C); 教育部高校博士点专项基金项目(20114320120004); 国家科技支撑计划项目(2011BAD01B01)

作者简介: 马蕊(1987—), 女, 黑龙江省黑河人, 硕士, 主要从事茶叶深加工及茶与健康研究; \*通信作者, larkin-liu@163.com

21.61% cell viability decline. Extracts from green and black tea could enhance cell viability, SOD and GSH-Px activity in supernatant under UVB irradiation, and decrease LDH activity, the content of MDA and the content of ROS in cells in dose-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Compared with UVB-irradiated model group, the apoptosis rate of HaCaT cell in other groups was decreased by 6.94% and 3.68% respectively. Moreover, the photo-protective effect of green tea extracts was better than that of black tea extracts, which were consistent with the content of tea polyphenols and catechins they contained. Green and black tea extracts could relieve UVB-induced oxidative damage and apoptosis of HaCaT cells, which might be the reason that they raised the oxidase activity and cleared the oxy-radicals in cells. Moreover, the photo-protective effect of green tea extracts against oxidative damage and apoptosis of HaCaT cells from UVB irradiation was better than that of black tea extracts.

**Key words:** green tea extracts; black tea extracts; ultraviolet B; HaCaT cell; oxidative damage; apoptosis

紫外线作用于皮肤中的各种光敏物质或色素,可诱导产生大量的自由基,破坏皮肤自身的抗氧化体系,使抗氧化酶活性降低,造成脂质过氧化产物堆积<sup>[1]</sup>。自由基促使DNA形成嘧啶二聚物,使DNA氧化损伤,导致DNA链断裂和碱基氧化,诱导细胞凋亡,甚至于产生皮肤癌变、免疫抑制等<sup>[2-3]</sup>。大量试验表明,UVB照射是皮肤癌发生的重要因素<sup>[4-5]</sup>。为了减轻UVB辐射引起的光损伤,人们主要应用抗氧化剂来保护皮肤。茶叶及茶叶提取物中含有大量的茶多酚类物质,是一种典型的抗氧化剂,具有很强的自由基清除作用,其抗氧化能力可达L-抗坏血酸的100倍<sup>[6]</sup>。茶多酚是绿茶、红茶共有的生物活性成分。关于绿茶和红茶拮抗紫外线诱导的光损伤作用已有相关报道<sup>[7-8]</sup>。笔者建立UVB诱导人表皮角质形成细胞(HaCaT)损伤的体外光老化模型,用以比较绿茶、红茶提取物对UVB损伤HaCaT细胞的抑制作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞

人表皮角质形成细胞(HaCaT)由武汉大学中国典型培养物保藏中心提供。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:紫外联仪(英国UVP);超净工作台(苏州净化设备有限公司);倒置显微镜(德国Leica);多功能酶标仪(Thermo公司);离心机(德国

Rotina公司);CO<sub>2</sub>培养箱(美国Nuair);紫外分光光度计(日本Shimadzu公司);振荡机(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);旋转蒸发器(瑞士Buchi公司);GAMMA1-20真空冷冻干燥机(德国Rotina公司)。

主要试剂:PBS粉剂、四甲基偶氮唑蓝MTT粉(美国Amresco公司);DMSO、儿茶素标准品(美国Sigma公司);胰蛋白酶、MEM培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(美国Hyclone公司);超氧化物歧化酶SOD、谷胱甘肽过氧化物酶GSH-Px、丙二醛MDA、羟脯氨酸Hyp试剂盒(南京建成生物工程研究所);BCA蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究所);细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基科技发展有限公司);N,N-二甲基甲酰胺、甲醇、冰醋酸(国产,分析纯)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 茶叶提取物的制备及检测

称取绿茶、红茶各200g,加2300mL沸水保温浸泡30min,每10min搅拌1次,纱布粗过滤,滤液倒入回收瓶中;再用700mL沸水保温浸泡茶渣20min,每10min搅拌1次,纱布粗过滤,合并滤液。粗滤液用薄纸浆抽滤。旋转蒸发器浓缩茶汤至约1/10,冷冻干燥得干粉,密封包装,-20℃保存。

供试材料化学成分检测:茶多酚含量采用酒石酸铁比色法测定<sup>[9]</sup>;儿茶素组分采用HPLC法检测<sup>[10]</sup>。

#### 1.2.2 细胞培养、分组和照光加药处理

将HaCaT细胞接种于培养瓶中,加入含10%

胎牛血清的 MEM 培养基, 在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的条件下培养于细胞培养箱中。当细胞长至 90% 融合时传代, 用 0.25% 胰酶消化, 离心。用含 10% 胎牛血清的 MEM 培养基调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  /mL, 接种到 96 孔培养板, 待细胞长至 70%~80% 融合后, 分为空白对照组(HaCaT 细胞于 MEM 完全培养基培养 6 h, 不接受紫外线辐射, 记作 CK)、UVB 辐射模型组(HaCaT 细胞于 MEM 完全培养基培养 6 h, 接受紫外线辐射, 记作 T<sub>U</sub>)、绿茶提取物给药组(分别于含绿茶提取物 2.5、5.0、10 μg/mL 的 MEM 完全培养基培养 6 h, 接受紫外线辐射, 分别记作 T<sub>G-2.5</sub>、T<sub>G-5.0</sub>、T<sub>G-10</sub>)和红茶提取物给药组(分别于含红茶提取物 2.5、5.0、10 μg/mL 的 MEM 完全培养基培养 6 h, 接受紫外线辐射, 分别记作 T<sub>B-2.5</sub>、T<sub>B-5.0</sub>、T<sub>B-10</sub>)。各组细胞均设 6 个复孔。弃培养基, 加入适量 PBS 覆盖细胞, 以 60 mJ/cm<sup>2</sup> 剂量进行辐射。CK 组用铝箔覆盖。弃 PBS, 加入含 10% 胎牛血清培养基, 放入培养箱继续培养 24 h。

### 1.2.3 测定指标及方法

HaCaT 细胞增殖活性的测定: 向每孔加入 20 μL 5 mg/mL 的 MTT, 孵育 4 h, 弃上清, 加入 150 μL DMSO, 置振荡器内振荡 10 min, 用酶标仪测定各孔在 570 nm 处的光密度(OD<sub>570 nm</sub>)。

SOD、GSH-Px、LDH 活性及 MDA 含量的测定: 将各组细胞按 1.2.2 节方法处理后, 收集细胞上清液, 严格按照南京建成生物工程所试剂盒说明书要求测定 SOD、GSH-Px、LDH 活性及 MDA 含量。

细胞内 ROS 含量的检测: 于紫外线辐射细胞后 0.5 h 收集细胞, 弃培养基, 加入含 10 μmol/mL 二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)的无血清培养基, 于 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min, 用无血清细胞培养基洗涤 3 次, 以充分去除未进入细胞的 DCFH-DA<sup>[11]</sup>。使用 488 nm 激发波长和 525 nm 发射波长检测氧化型二氯荧光素(DCF)的平均荧光强度。

细胞凋亡率的检测: 将按 1.2.2 节方法培养于 6 孔板中的 HaCaT 细胞取出, 用 0.25% 的胰酶(不含 EDTA)消化, 收集细胞, 稀释成细胞数达 10<sup>6</sup> 个/mL 的单细胞悬液。吸取细胞悬液于离心管中, 4 °C、2 000 r/min 离心 5 min。吸去上清液, 用 PBS 洗涤 2 次。每管加入 200 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 避光加入 5 μL Annexin V-FITC, 混匀; 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀。室温避光反应 5~15 min, 1 h 内在流式细胞仪上进行检测<sup>[12]</sup>。

### 1.3 数据分析

以 SPSS17.0 for Windows 统计软件进行统计分析。采用 ANOVA 进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 绿茶和红茶中茶多酚及儿茶素类物质的含量

由表 1 可见, 绿茶中茶多酚含量高于红茶, 其质量分数分别为 31.975%、13.766%; 绿茶中儿茶素类物质的含量均高于红茶, 绿茶、红茶中的 EGCg 含量分别为 5.351%、0.165%。

表 1 绿茶、红茶样品中茶多酚及儿茶素类物质的含量

Table 1 The analytical results of tea polyphenols and catechins in green tea and black tea

| 样品 | 质量分数/% |       |       |       |       |       |       |
|----|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    | 茶多酚    | EGC   | DL-C  | EC    | EGCg  | GCG   | ECG   |
| 绿茶 | 31.975 | 0.747 | 0.606 | 0.966 | 5.351 | 3.886 | 1.867 |
| 红茶 | 13.766 | 0.103 | 0.008 | 0.018 | 0.165 | 0.015 | 0.129 |

### 2.2 各处理 HaCaT 细胞的活性

由表 2 可见, 与 CK 组相比, T<sub>U</sub> 组细胞活性降低, 与 CK 组差异极显著。随着 T<sub>G</sub>、T<sub>B</sub> 组给药浓度的增大, 细胞活性提高, 除 T<sub>B-2.5</sub> 组外, 其余处理

组均与 T<sub>U</sub> 组的差异极显著, 表明绿茶、红茶提取物在一定程度上能够抵抗 UVB 对细胞活性的抑制, 且绿茶提取物预孵育细胞的活性均比红茶提取物的高。

表2 各处理 HaCaT 细胞的活性

| 处理                 | 各剂量组 $OD_{570\text{ nm}}$ | 细胞活性/%          |
|--------------------|---------------------------|-----------------|
| CK                 | 0.883±0.035               | 100±0.00        |
| T <sub>U</sub>     | (0.692±0.025)**           | (78.39±2.77)**  |
| T <sub>G-2.5</sub> | (0.713±0.016)**#          | (80.74±1.81)**# |
| T <sub>G-5.0</sub> | (0.726±0.027)**#          | (82.23±3.03)**# |
| T <sub>G-10</sub>  | (0.743±0.031)**#          | (84.24±3.89)**# |
| T <sub>B-2.5</sub> | (0.691±0.014)**           | (78.26±1.83)**  |
| T <sub>B-5.0</sub> | (0.700±0.021)**#          | (79.30±1.43)**# |
| T <sub>B-10</sub>  | (0.715±0.015)**#          | (80.94±0.71)**# |

\*表示与模型组比较,在  $P<0.05$  水平差异有统计学意义;  
 \*\*表示与模型组比较,在  $P<0.01$  水平差异有高度统计学意义;  
 #表示与空白对照组比较,在  $P<0.05$  水平差异有统计学意义;  
 ##表示与空白对照组比较,在  $P<0.01$  水平差异有高度统计学意义。  
 下同。

表3 各处理 HaCaT 细胞培养液的 SOD、GSH-Px、LDH 活性和 MDA 含量

| 处理                 | SOD 活性/(U·mL <sup>-1</sup> ) | GSH-Px 活性/(U·mL <sup>-1</sup> ) | MDA 含量/(nmol·mL <sup>-1</sup> ) | LDH 活性(U·L <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| CK                 | 27.08±1.60                   | 48.57±1.57                      | 2.970±0.129                     | 414.81±27.96               |
| T <sub>U</sub>     | (15.69±0.53)**               | (17.71±0.71)**                  | (6.931±0.113)**                 | (825.93±6.42)**            |
| T <sub>G-2.5</sub> | (21.54±1.07)**#              | (29.14±0.43)**#                 | (4.307±0.074)**#                | (496.30±50.10)**#          |
| T <sub>G-5.0</sub> | (25.23±0.92)#                | (32.00±1.25)**#                 | (4.134±0.113)**#                | (325.93±39.02)**#          |
| T <sub>G-10</sub>  | (26.62±0.46)#                | (36.57±1.14)**#                 | (3.267±0.074)**#                | (311.11±11.11)**#          |
| T <sub>B-2.5</sub> | (22.46±1.41)**#              | (28.86±0.43)**#                 | (3.936±0.223)**#                | (570.37±52.51)**#          |
| T <sub>B-5.0</sub> | (24.00±0.53)**#              | (30.86±0.25)**#                 | (3.564±0.386)**#                | (529.63±46.26)**#          |
| T <sub>B-10</sub>  | (25.85±0.53)#                | (38.29±1.98)**#                 | (3.589±0.227)**#                | (500.00±11.11)**#          |

## 2.4 各处理细胞 ROS 的含量

表4 结果表明,与 CK 组比较,T<sub>U</sub> 组细胞内 ROS 含量升高了1倍,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。随着 T<sub>G</sub>、T<sub>B</sub> 组给药浓度的增大,细胞体内 ROS 含

表4 不同处理下 HaCaT 细胞内 ROS 含量

| 处理                 | ROS 含量           |
|--------------------|------------------|
| CK                 | 1.163±0.035      |
| T <sub>U</sub>     | (1.945±0.009)**  |
| T <sub>G-2.5</sub> | (1.726±0.020)**# |
| T <sub>G-5.0</sub> | (1.701±0.004)**# |
| T <sub>G-10</sub>  | (1.572±0.007)**# |
| T <sub>B-2.5</sub> | (1.872±0.025)**# |
| T <sub>B-5.0</sub> | (1.790±0.048)**# |
| T <sub>B-10</sub>  | (1.654±0.014)**# |

## 2.3 各处理 HaCaT 细胞的 SOD、GSH-Px、LDH 活力和 MDA 含量

表3 结果表明,与 CK 组比较,T<sub>U</sub> 组细胞培养基中 MDA 含量极显著升高,而 SOD 和 GSH-Px 的活性极显著降低,LDH 活性极显著升高,说明 HaCaT 细胞正常的抗氧化能力明显受到损伤,细胞膜的结构和功能遭到破坏。与 T<sub>U</sub> 组相比,T<sub>G</sub>、T<sub>B</sub> 组随着给药浓度的增大,细胞培养基中 SOD 和 GSH-Px 活性均呈上升趋势,而 MDA 含量呈下降趋势,LDH 活性呈下降趋势,各给药组与 T<sub>U</sub> 的差异均具有高度统计学意义( $P<0.01$ ),且绿茶提取物抑制氧化损伤的能力比红茶提取物的强。

量逐渐降低,均与 T<sub>U</sub> 组差异极显著(T<sub>B-2.5</sub> 组除外),且绿茶提取物清除氧自由基的能力优于红茶提取物。

## 2.5 各处理细胞的凋亡情况

由图1 可见,CK 组的正常细胞(第三象限)占 91.42%,T<sub>U</sub> 组占 74.03%,T<sub>G-10</sub>、T<sub>B-10</sub> 组分别占 80.38%、77.40%。可见,与 CK 相比,T<sub>U</sub> 组 HaCaT 细胞存活率下降了 19.02%,T<sub>G-10</sub>、T<sub>B-10</sub> 组细胞存活率分别下降了 12.08%、15.34%;与 T<sub>U</sub> 组相比,T<sub>G-10</sub>、T<sub>B-10</sub> 组细胞存活率分别提高了 6.94%和 3.68%,说明绿茶、红茶提取物可以有效抑制紫外辐射引起的细胞凋亡,且绿茶提取物的作用效果比红茶提取物的好。

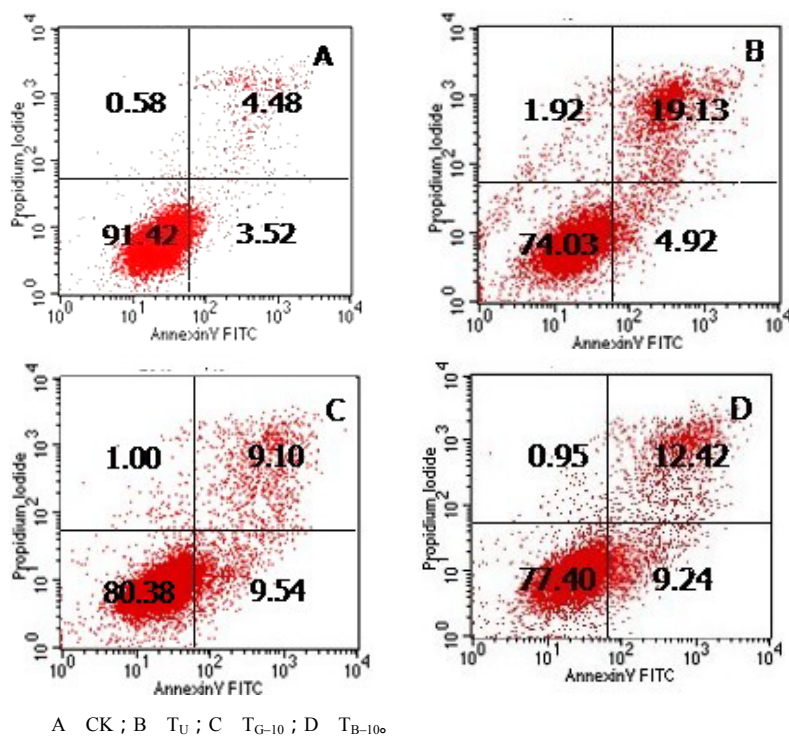


图 1 各处理 HaCaT 细胞的凋亡情况

Fig.1 Effects of different treatments on the flow cytometric diagram of annexin V/PI staining of UVB-irradiated HaCaT cells

### 3 结论与讨论

本试验结果表明,UVB 辐射损伤 HaCaT 细胞呈典型的凋亡改变,而经绿茶、红茶提取物预孵育的 HaCaT 细胞损伤程度明显减轻,表明绿茶、红茶提取物对 UVB 辐射损伤的角质形成细胞具有光保护作用。绿茶、红茶提取物可以提高 SOD、GSH-Px 活性,加速氧自由基的清除和减少氧自由基的产生,使 UVB 辐射诱导的 HaCaT 细胞脂质过氧化损伤程度降低,也使 HaCaT 细胞培养基中 LDH 的活性降低,保护了细胞膜结构和功能的完整。此外,绿茶、红茶中的主要抗氧化物质是茶多酚,其中含量最多的是儿茶素类物质,尤其是 EGCg。化学成分分析显示,绿茶中总儿茶素含量及 EGCg 含量明显高于红茶,因此绿茶的抗氧化性能高于红茶。

#### 参考文献:

- [1] 李春雨,张丽宏,张宁,等.紫外线诱导皮肤光老化的形成机制[J].中国美容医学,2008,18(3):416-419.
- [2] 丁振华,范建中.紫外辐射生物学与医学[M].北京:人民军医出版社,2001.
- [3] Ryoo Y W, Suh S I, Mun K C, et al. The effects of the melatonin on ultraviolet-B irradiated cultured dermal fibroblasts[J]. J Dermatol Sci, 2001, 27(3): 162-169.
- [4] 李立.紫外线辐射对人类皮肤健康的影响[J].国外医

- 学:卫生学分册,2008,3(4):198-202.
- [5] 康顺爱,王志成.姜黄素对 UVB 辐射诱导 HaCaT 细胞凋亡的抑制作用[J].辽宁中医杂志,2008,36(8):1153-1154.
- [6] 侯冬岩,回瑞华.绿茶、红茶和乌龙茶抗氧化性能的比较[J].食品科学,2007,27(3):90-93.
- [7] Yang-Hee Hong, Eun Young Jung, Kwang-Soon Shin, et al. Photoprotective effects of a formulation containing tannase-converted green tea extract against UVB-induced oxidative stress in hairless mice[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166: 165-175.
- [8] 张素慧,吕俊华.茶多酚和茶色素对紫外线照射致小鼠皮肤光老化的防护作用[J].中国药科大学学报,2003,34(6):561-564.
- [9] 黄意欢.茶学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1995:115-116.
- [10] 吴朝比.黑茶降血脂功效评价及其对模型大鼠蛋白质差异表达的影响[D].长沙:湖南农业大学园艺园林学院,2012.
- [11] 高明清,杜卫.扇贝多肽(PCF)抑制紫外线诱导的 HaCaT 细胞凋亡[J].高技术通讯,2007,17(12):1283-1289.
- [12] 黄静红,李德如.萝卜硫素对中波紫外线损伤 HaCaT 的保护作用的研究[J].中国中西医结合皮肤性病杂志,2009,8(6):338-341.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库