

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

林 勇^{1,2*}, 刘仲华^{1,2}, 马 蕊^{2,3}

(1. 国家植物功能成分利用工程技术研究中心, 长沙 410128; 2. 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 长沙 410128; 3. 广西职业技术学院, 南宁 530226)

摘 要: **目的** 研究茶叶中表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对中波紫外线(UVB)诱导的人表皮角质形成细胞(HaCaT)光损伤的保护作用。**方法** 用不同浓度的 EGCG 对 HaCaT 细胞进行预处理 6 h, 采用 60 mJ/cm² 的剂量照射细胞, 用 MTT 法检测细胞生存率, 吸取细胞上清液检测超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、乳酸脱氢酶(LDH)的活性和丙二醛(MDA)含量变化, 用荧光法检测细胞内 ROS 含量。**结果** UVB 辐射对 HaCaT 细胞造成严重损伤, 与对照组相比, 细胞活性下降 21.63%; 与 UVB 辐射模型组相比, EGCG 尤其高剂量可提高 UVB 照射后 HaCaT 细胞的存活率 5.89%, 显著提高 SOD、GSH-Px 活性($P<0.01$), 降低 LDH 活性 ($P<0.01$), 减少自由基 ROS 和 MDA 含量($P<0.01$)。**结论** EGCG 可以减少 UVB 诱导 HaCaT 细胞的损伤和凋亡, 具有光保护作用, 其机制与增强细胞抗氧化能力和加速清除氧自由基有关。

关键词: 表没食子儿茶素没食子酸酯; 中波紫外线; HaCaT 细胞; 氧化损伤

Inhibition effects of epigallocatechin gallate in tea on oxidative damage of HaCaT cells induced by ultraviolet radiation B

LIN Yong^{1,2*}, LIU Zhong-Hua^{1,2}, MA Rui^{2,3}

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

ABSTRACT: Objective To study the photo-protective effect of epigallocatechin gallate in tea on HaCaT cells damaged from ultraviolet radiation B. **Methods** Sub-confluent HaCaT cells were incubated for 6 h with different doses of EGCG, and then irradiated with 60 mJ/cm² doses of UVB. The cell viability was tested by MTT method. The activity of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), lactate dehydrogenase (LDH), and the level of malondialdehyde (MDA) of supernatant were detected with colorimetric methods. The content of ROS was measured with the fluorescence method. **Results** Compared with control group, the UVB irradiation could seriously damage HaCaT cell and gave rise to 21.63% cell viability decline. EGCG, especially this with the high dose, could enhance cell viability by 5.89%, increase SOD and GSH-Px activity in supernatant under UVB irradiation, and decrease LDH activity and the contents of

基金项目: 教育部高校博士点专项基金项目(20114320120004)、湖南省科技计划项目(2014FJ3131)

Fund: Supported by Grants from Specialized Research Foundation for the Doctorial Program of Higher Education of China (20114320120004) and Planned Science and Technology Project of Hunan Province (2014FJ3131)

*通讯作者: 林勇, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为植物功能成分化学及生物活性研究。E-mail: ly2005306@163.com

*Corresponding author: LIN Yong, Doctor, Assistant Researcher, National Research Center of Engineering Technology for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, China, E-mail: ly2005306@163.com

MDA and ROS in dose-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** EGCG can relieve UVB-induced oxidative damage and apoptosis of HaCaT cells, which may be the reasons that they enhance the oxidase activity and clear the oxy-radicals in cells.

KEY WORDS: epigallocatechin gallate; ultraviolet radiation B; HaCaT cell; oxidative damage

1 引言

长期紫外线辐射易导致皮肤光损伤,从而加速皮肤老化。紫外线作用可诱导皮肤细胞产生大量的自由基,造成脂质过氧化产物的堆积,使抗氧化酶活性降低^[1]。此外,自由基造成 DNA 氧化损伤,进而导致 DNA 链断裂和碱基氧化,诱导细胞凋亡,甚至诱发皮肤癌变、免疫抑制等疾病^[2,3]。紫外线辐射中对人体产生作用的主要是中波紫外线(ultraviolet radiation B, UVB)和长波紫外线(ultraviolet radiation A, UVA),相同剂量 UVB 的生物学效应是 UVA 的 800~1000 倍^[4]。大量试验证明,UVB 照射是皮肤癌发生的重要因素^[5]。为了减轻 UVB 辐射引起的光损伤,应用抗氧化剂成为人们保护皮肤的有效措施。茶叶及茶叶提取物中含有大量的茶多酚类物质,具有很强的抗氧化能力和清除自由基的作用^[6,7],尤其表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),是一种非常优良的抗氧化剂,其还原性甚至可达维生素 C 的 100 倍。大量研究^[8-10]表明 EGCG 具有抗癌、抗突变、预防和治疗心脑血管疾病以及调理内分泌、免疫系统等功效。EGCG 对 UVB 损伤人表皮角质形成细胞(HaCaT)的保护作用也已有报道^[11,12],但是仅仅关注了一个或几个抑癌、DNA 损伤修复相关基因或蛋白质表达水平的变化,未详细评估其整体抗氧化和细胞内过量自由基清除能力。基于此,本研究通过 UVB 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤,建立体外光老化模型,观察和评估 EGCG 抗氧化和自由基清除能力以及对细胞氧化损伤和凋亡的抑制作用。

2 材料与方法

2.1 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。

2.2 仪器与试剂

超净工作台(苏州净化设备有限公司); CO₂ 培养箱(美国 Nuair 公司); 紫外交联仪(英国 UVP); 倒置

显微镜(德国 Leica 公司); 离心机(德国 Rotina 公司); 紫外分光光度计(日本 Shimadzu 公司); 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司)。

四甲基偶氮唑蓝 MTT 粉、DMSO、PBS 粉剂(美国 Amresco 公司); 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA) (美国 Sigma 公司); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司); MEM 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 丙二醛 MDA、超氧化物歧化酶 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px、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); 甲醇、N,N-二甲基甲酰胺、冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂公司)。

2.3 细胞培养及分组处理

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% CO₂ 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 1×10^5 个/mL,接种到 96 孔板培养板,待细胞长至 70%~80%融合后,分为空白对照组(HaCaT 细胞给予 MEM 完全培养基培养 6 h,不接受紫外线辐射)、UVB 辐射模型组(HaCaT 细胞给予 MEM 完全培养基培养 6 h,接受紫外线辐射)、EGCG 给药组(分别给予 2.5、5.0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 个浓度药物的 MEM 完全培养基培养 6 h,接受紫外线辐射,分别记作 EGCG-2.5、EGCG-5.0、EGCG-10 组); 各组细胞均设 6 个复孔。弃培养基,加入适量 PBS 覆盖细胞,进行辐射,剂量为 60 mJ/cm^2 ,空白对照组用铝箔覆盖。弃 PBS,加入含 10%胎牛血清培养液,放入培养箱继续培养 24 h。

2.4 指标测定及方法

HaCaT 细胞增殖活性的测定:向每孔加入 20 μL 浓度为 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,酶标仪测定各孔在 570 nm 处吸光值($OD_{570 \text{ nm}}$ 值)。

MDA、SOD、GSH-Px 和 LDH 含量的测定:各

组细胞按照 2.3 步骤处理后, 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 MDA、SOD、GSH-Px 及 LDH 含量。

细胞内 ROS 含量的检测: 紫外线辐射细胞后 0.5 h 收集细胞, 弃培养基, 加入含 10 $\mu\text{mol/mL}$ 二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)的无血清培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 20 min 后, 用无血清细胞培养液洗涤 3 次, 以充分去除未进入细胞的 DCFH-DA^[13]。使用 488 nm 激发波长, 525 nm 发射波长检测氧化型二氯荧光素(DCF)的平均荧光强度。

2.5 数据分析

以 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。采用 ANOVA 进行单因素方差分析。

3 结果与分析

3.1 各处理组 HaCaT 细胞的活性

由表 1 可见, 与空白对照组相比, 模型组细胞活性明显降低, 二者具有极显著性差异($P < 0.01$)。随着 EGCG 组给药浓度剂量的逐渐增大, 细胞活性明显提高, 其中 EGCG-2.5 组与模型组呈显著差异($P < 0.05$), 另外两组有极显著差异($P < 0.01$), 从而表明 EGCG 能够一定程度上抵抗 UVB 对细胞活性的抑制。

表 1 不同处理下 HaCaT 细胞的活性
Table 1 Activity of HaCaT cells at different treatment conditions

处理组别	各剂量组 $OD_{570\text{ nm}}$	细胞活性(%)
空白对照组	0.883 \pm 0.035	100 \pm 0.00
辐射模型组	0.692 \pm 0.025**	78.37 \pm 2.83**
EGCG-2.5 组	0.711 \pm 0.015**#	80.52 \pm 1.70**#
EGCG-5 组	0.732 \pm 0.029***	82.90 \pm 3.28***
EGCG-10 组	0.744 \pm 0.036***	84.26 \pm 4.08***

*表示与空白对照组比较在 $P < 0.05$ 水平差异显著; **表示与空白对照组比较在 $P < 0.01$ 水平差异显著; #表示与模型组比较在 $P < 0.05$ 水平差异显著; ##表示与模型组比较在 $P < 0.01$ 水平差异显著。下同。

表 2 各处理 HaCaT 细胞培养液的 MDA 含量和 SOD、GSH-Px、LDH 活力
Table 2 Effects of different treatments on anti-oxidation ability of UVB-irradiated HaCaT cells

处理组别	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)	LDH(U/L)
空白对照组	2.970 \pm 0.129	27.08 \pm 1.60	48.57 \pm 1.57	414.81 \pm 27.96
辐射模型组	6.931 \pm 0.113**	15.69 \pm 0.53**	17.71 \pm 0.71**	825.93 \pm 6.42**
EGCG-2.5 组	4.307 \pm 0.074***	21.54 \pm 1.07***	29.14 \pm 0.43***	496.30 \pm 50.10***
EGCG-5 组	4.103 \pm 0.121***	24.02 \pm 0.84***	32.08 \pm 1.31***	525.90 \pm 38.16***
EGCG-10 组	3.416 \pm 0.074***	23.38 \pm 0.92***	39.43 \pm 0.62***	581.48 \pm 44.91***

3.2 各处理组 HaCaT 细胞的 MDA 含量和 SOD、GSH-Px、LDH 活力检测

如表 2 所示, 抗氧化指标测定表明, 与空白对照组比较, 模型组细胞培养液中脂质过氧化产物 MDA 含量显著升高, 而 SOD 和 GSH-Px 的含量显著降低, LDH 活力明显升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$), 表明 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。与模型组相比, EGCG 组随着给药浓度的逐渐增大, 细胞培养液中 SOD 和 GSH-Px 活力均呈现上升趋势, 而 MDA 含量呈现下降趋势, LDH 活性呈现下降趋势, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。从而表明 EGCG 的处理能一定程度地修复 UVB 对 HaCaT 细胞的氧化损伤。

3.3 各处理组 HaCaT 细胞 ROS 的含量

表 3 结果表明, 与空白对照组比较, 模型组细胞内 ROS 含量升高了一倍, 差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。EGCG 组可剂量依赖性的降低细胞体内 ROS 含量, 与模型组相比, 均具有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 结论与讨论

紫外线辐射后, 会产生高反应活性的氧自由基, 从而使皮肤抗氧化系统遭到损伤^[14], 使机体的氧化与抗氧化体系严重失衡, 进一步产生大量的自由基, 过量的自由基攻击细胞, 导致氧化产物 MDA 增加, 引起脂质过氧化, 干扰机体正常代谢活动, 并引起突变增加、诱导细胞凋亡的发生、甚至可能引起皮肤癌。SOD、GSH-Px 等构成了机体重要的抗氧化酶系统, 可以减少氧自由基产生, 减轻细胞氧化损伤。此外, 过量的紫外线照射会损伤细胞膜的脂层结构, 细胞膜通透性变大, 从而造成细胞内乳酸脱氢酶(LDH)的外泄^[15]。LDH 漏出率成为反映细胞膜损伤的重要指标。

表 3 不同处理下 HaCaT 细胞内 ROS 含量
Table 3 Effects of different treatments on the content of ROS in HaCaT cells

处理组别	ROS(荧光值)	ROS(荧光值/蛋白*100)
空白对照组	1.163±0.035	100.00±2.975
辐射模型组	1.945±0.009**	218.14±0.980**
EGCG-2.5 组	1.826±0.027**#	194.18±1.085**#
EGCG-5 组	1.641±0.014***#	159.22±0.287***#
EGCG-10 组	1.398±0.027***#	121.28±0.635***#

本研究中, UVB 辐射损伤 HaCaT 细胞呈典型的凋亡形态学改变, 而经 EGCG 预孵育的 HaCaT 细胞损伤程度明显减轻。说明 EGCG 对 UVB 辐射损伤的角质形成 HaCaT 细胞具有光保护作用, 并可能与 EGCG 抑制 UVB 辐射引起的细胞氧化损伤和凋亡, 增强其抗氧化能力有关。随后抗氧化指标的结果显示, EGCG 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。同时 EGCG 也降低 HaCaT 细胞培养液中 LDH 的活性, 保护了细胞膜结构和功能的完整性。

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.
Li CY, Zhang LH, Zhang N, *et al.* Ultraviolet induced formation mechanism of photoaging [J]. *Chin J Aesthet Med*, 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.
Ding ZH, Fan JZ. *Ultraviolet radiation biology and medicine* [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2001.
- [3] Ryoo YW, Suh SI, Mun KC, *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.
Li L. Effects of ultraviolet radiation on the human skin health [J]. *Foreign Med Sci Sect Hyg*, 2008, 3(4): 198-202.
- [5] 康顺爱, 王志成, 李艳博, 等. 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.
Kang SA, Wang ZC, Li YB, *et al.* Inhibitory effects of curcum in on HaCaT cell apoptosis induced by UVB irradiation [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2008, 36(8): 1153-1154.
- [6] 侯冬岩, 回瑞华, 刘晓媛, 等. 绿茶、红茶和乌龙茶抗氧化性能的比较[J]. 食品科学, 2006, 27(3): 90-93.
Hou DY, Hui RH, Liu XY, *et al.* Comparison of the antioxidation effects of green tea, black tea and Olong tea [J]. *Food Sci*, 2006, 27(3): 90-93.
- [7] 马蕊, 刘仲华, 黄建安, 等. 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[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, 39(4): 377-381.
Ma R, Liu ZH, Huang JA, *et al.* Comparison the inhibitional effects between extracts of green tea and black tea on oxidative damage and apoptosis of HaCaT cells induced by UVB [J]. *J Hunan Agric Univ (Nat Sci)*, 2013, 39(4): 377-381.
- [8] 毛小强, 那万里, 赵丹, 等. 茶多酚对前列腺癌 PC-3M 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(2): 170-173.
Mao XQ, Na WL, Zhao D, *et al.* Effects of tea polyphenol on proliferation inhibition and apoptosis in human prostate cancer PC-3M cells [J]. *Chin J Laborat Diagn*, 2010, 14(2): 170-173.
- [9] 傅颖, 梅松, 陈建国, 等. 茶多酚对大鼠体重及血清中脂代谢水平的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(11): 2506-2508.
Fu Y, Mei S, Chen JG, *et al.* Effect of tea polyphenol on high-lipid weight and serum levels of lipid metabolism in rats [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2009, 19(11): 2506-2508.
- [10] 陈悦, 刘秋慧. 茶多酚对豚鼠心肌细胞钙电流及动作电位的影响[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(3): 90-192.
Chen Y, Liu QH. Effects of tea polyphenols on calcium electricity and action potential in guinea pig myocardial cells [J]. *Chin Pharm J*, 2010, 45(3): 90-192.
- [11] 林向飞, 闵玮, 朱晓芳, 等. 绿茶多酚对表皮 HaCaT 细胞光损伤的干预作用研究[J]. 中国美容医学, 2014, 23(17): 1401-1403.
Lin XF, Min W, Zhu XF, *et al.* Effects of EGCG on UVB induced the photodamage in HaCaT cells [J]. *Chin J Aesthet Med*, 2014, 23(17): 1401-1403.
- [12] 苏荣键, 金颂良, 骆丹, 等. EGCG 对中波紫外线诱导 HaCaT 细胞 p53 基因和蛋白表达的实验研究[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(3): 187-190.
Su RJ, Jin SL, Luo D, *et al.* Effects of EGCG on UVB-induced p53 gene and protein expression in HaCaT keratinocytes [J]. *China J Lepr Skin Dis*, 2006, 22(3): 187-190.
- [13] 高明清, 杜卫, 郭沈波, 等. 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.

- Gao MQ, Du W, Guo SB, *et al.* Polypeptide from *Chlamys farreri* inhibits ultraviolet-induced apoptosis of HaCaT cells [J]. Chin High Technol Lett, 2007, 17(12): 1283–1289.
- [14] Berton TR, Pavone A, Fischer SM. Ultraviolet-B irradiation alters the cell cycle machinery in murine epidermis in vivo [J]. Invest Dermatol, 2001, 117(5): 1171–1175.
- [15] 王发选, 宋琦如, 杨正贵. 枸杞多糖对中波紫外线致人皮肤成纤维细胞损伤的保护作用[J]. 宁夏医学院学报, 2006, 28(6): 501–503.
- Wang FX, Song QR, Yang ZG. Protective Effects of Lycium

Barbarum Polysaccharides on Fibroblast Damaged by Ultraviolet B [J]. J Ningxia Med College, 2006, 28(6): 501–503.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



林 勇, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为植物功能成分化学及生物活性研究。
E-mail: ly2005306@163.com