

蒙山绿茶和老鹰茶的防紫外线作用研究

陈晓明^{1,2} 任正隆² 张怀渝² 唐宗祥² 罗培高²

¹ (西南科技大学 绵阳 621010)

² (四川农业大学 雅安 625000)

摘要 采用体外培养的人皮肤成纤维细胞为模型,以噻唑蓝 (Thiazolyl blue, MTT) 染色和乳酸脱氢酶 (Lactate dehydrogenase, LDH) 活性为指标,探讨蒙山绿茶和老鹰茶水提取物的防长波紫外线的损伤和修复作用。结果发现,绿茶和老鹰茶水提取液对长波紫外线 (Ultraviolet A, UVA) 损伤有较强的防护作用,且呈浓度效应;在高浓度 (5 mg/mL) 时,两种茶提取液防护作用无显著性差异,而在低浓度 (2.5 mg/mL 和 1.25 mg/mL) 时,同浓度的绿茶提取液的防护作用明显低于老鹰茶;绿茶、老鹰茶水提取液都对 UVA 损伤有修复作用,且皆呈浓度效应,两种提取液之间无显著性差异。它们对 UVA 辐射的这种防护和修复作用可能与茶多酚的抗氧化作用有关。

关键词 绿茶, 老鹰茶, 长波紫外线, 成纤维细胞, 损伤修复

中图分类号 Q274, Q682, Q946.33

由于大气污染的影响,臭氧层日益稀薄,到达地面的紫外线辐射强度不断增加。紫外线根据其波长不同可分为长波紫外线 (Ultraviolet A, UVA, 320—400 nm)、中波紫外线 (Ultraviolet B, UVB, 280—320 nm) 和短波紫外线 (Ultraviolet C, UVC, 200—280 nm)。不同波长的紫外线对人体造成伤害的程度和途径不同,波长越短,能量越大,伤害越严重。由于臭氧层的强烈阻挡和大气、灰尘、水汽等的吸收,UVC 到达地面已极为微弱。UVB 是造成皮肤灼伤、间接色素沉积、使皮肤出现红班的灼伤光照区,其不能穿过深层皮肤,几乎全部被皮肤表皮散射或吸收。UVA 虽不象 UVB 那样引起强烈的皮肤反应,但它占太阳紫外线总能量的 91%,其渗透力极强,有 30%—35% 能够到达真皮,且其光照生理影响具累积性。长期以来,在防晒产品的研究开发中存在一个误区,只注重对 UVB 的防护,而忽视了 UVA 对人体的影响,随着人们对 UVA 危害的认识,加强对中长波紫外线的防护研究,具有重要意义。

绿茶是我国常用的饮料,绿茶的防癌抗癌、保健治病作用屡见报道,但绿茶的防紫外线作用报道较少。老鹰茶是我国南方民间长期饮用的植物代用茶。我们采用体外培养的人皮肤细胞为模型,研究了绿茶和老鹰茶提取液的防长波紫外线作用。

1 材料和方法

1.1 绿茶和老鹰茶水提物的制备

绿茶产自四川蒙山,老鹰茶产自四川雅安,均为当年新茶。称取绿茶和老鹰茶各 5 g,加入煮沸双蒸水各 200 mL 提取两次,每次 30 min,合并滤液,浓缩至 50 mL (浓度为 0.1 g/mL),滤纸过滤,使用前 0.22 μm 除菌过滤。

1.2 UVA 光源

按照 Alapetite 等^[1]的方法,两支 6W UVA 平行灯管 (上海顾村光电仪器厂),光线通过 365 nm 滤光片 (上海顾村光电仪器厂) 过滤,用 UV-M 紫外线辐照计 (北京师范大学光电仪器厂) 测定其功率。UVA 光源 95% 以上能量集中在 365 nm 处。

1.3 细胞处理

1.3.1 细胞培养 成纤维细胞取至正常成年人包皮环切术,由四川大学免疫教研室提供。采用 DMEM 培养基 (GIBCO),加入 10% 小牛血清 (HYCLONE),HEPES (HYCLONE) 20 mmol/L,置 5% CO₂ 孵箱中培养。
1.3.2 处理方法 生长良好的对数期细胞用胰蛋白酶消化后,悬浮于含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液,调整细胞浓度,按 1.0×10^4 cells/孔加入 96 孔培养板,培

中国工程物理研究院军民两用基金(20040103)资助

第一作者:陈晓明,女,1970年7月出生,2003年在四川农业大学获硕士学位,助理研究员

收稿日期:初稿 2005-01-01,修回 2005-03-18

养 24 h 后吸出上清, 0.01 mol/L PBS 洗涤一次, UVA 照射, 照射完毕, 加入 20% DMEM 培养液继续培养。

1.4 MTT 染色和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测

将细胞培养于 96 孔培养板, 培养结束前吸出上清, 上清进行乳酸脱氢酶活性检测, 细胞加入 100 μ L 5% DMEM 培养基和 20 μ L/孔 MTT 溶液 (SIGMA), 继续培养 3—4 h。吸去上清, 加入 DMSO 100 μ L/孔, 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 在酶标仪 (Labsystems Dragon, Wellscan MK3) 上测定光吸收 (A 值), 测定波长为 490 nm。采用乳酸脱氢酶试剂盒 (四川迈克), 在 7020 Automatic Analyzer (HITACH) 上进行乳酸脱氢酶活性测定。

1.5 UVA 辐射剂量对细胞的影响

细胞置冰上, 在超净工作台上一定距离照射, UVA 功率为 0.5 mW/cm², 分别照射 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h、7 h 和 8 h, 相应的剂量为 1.8、3.6、5.4、7.2、9.0、10.8、12.6、14.4 J/cm², 照射完毕加入 20% DMEM 200 μ L/孔, 24 h 后吸出上清, 细胞进行 MTT 染色。同时设细胞对照和空白对照。细胞对照用双层医用胶布蒙住, 其余处理同处理组; 空白对照除不加细胞外, 其余处理同处理组, 每个处理 6 个复孔 (下同)。

1.6 绿茶和老鹰茶水提取物对 UVA 损伤的防护作用

细胞处理同上, 细胞贴壁 24 h 后吸出上清, PBS 洗涤一次, 用 PBS 将提取物稀释为 5、2.5、1.25 mg/mL, 加入细胞孔 50 μ L/孔, UVA 10 J/cm² 照射, 照射完毕, 吸出上清, 加入 PBS 洗涤一次, 每孔加入 200 μ L 20% DMEM, 培养 24 h 后取上清进行 LDH 检测。同时设细胞对照、阴性对照和空白对照。阴性对照为 UVA 照射, 不加提取物, 以同体积 PBS 代替 (下同)。

1.7 绿茶和老鹰茶水提取物对 UVA 损伤的修复作用

细胞处理同上, 细胞贴壁 24 h 后吸出上清, PBS 洗涤一次, 每孔加入 50 μ L PBS, UVA 10 J/cm² 照射, 照射完毕, 吸出上清, 加入用 DMEM 稀释的浓度分别为 5、2.5、1.25 mg/mL 绿茶和老鹰茶提取物, 培养 24 h 后取上清进行 LDH 检测。同时设细胞对照、阴性对照和空白对照。

1.8 修复率的计算及统计学处理

修复率 = [(样品 LDH 活性 - 细胞对照 LDH 活性) / (阴性对照 LDH 活性 - 细胞对照 LDH 活性)] $\times$ 100%
统计学处理方法: 两样本间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 UVA 照射剂量对细胞的影响

图 1 为采用不同剂量 UVA 照射皮肤成纤维细胞后, 细胞的 MTT 染色值。从图 1 中可看出, 低剂量 (<4 J/cm²) UVA 辐射对细胞增殖有轻微促进作用。随着 UVA 剂量的增加, 对细胞的损伤增大, 10 J/cm² 左右为半致死剂量。

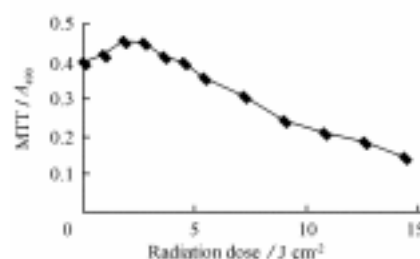


Fig.1 The effect of UVA dose on fibroblasts

2.2 绿茶和老鹰茶水提取物对细胞 UVA 损伤的防护作用

图 2 是不同浓度的绿茶和老鹰茶水提取物对半致死剂量 10 J/cm² UVA 辐射细胞的防护作用。从图中可看出, 与阴性对照相比, 在细胞中加入不同浓度的绿茶和老鹰茶水提取液后, 再进行 10 J/cm² UVA 辐射, 细胞培养物中 LDH 活性都大幅度的下降, 这说明它们都对 UVA 损伤有较强的防护作用, 且呈浓度效应。从图 2 中可计算出, 5、2.5、1.25 mg/mL 绿茶提取物的保护率分别为: 82.0%、59.5%、48.8%; 而老鹰茶提取物的保护率分别为: 分别为: 88.0%、80.0%、61.9%。比较它们的保护效果可以发现, 在高浓度 (5 mg/mL) 时, 两种茶

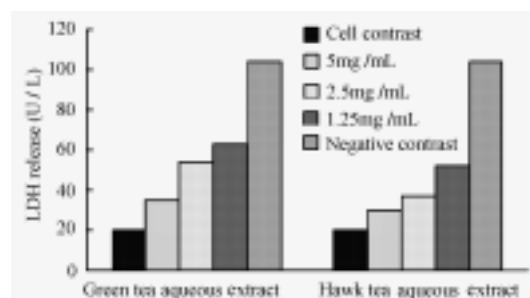


Fig.2 Protective effect of green tea and hawk tea aqueous extracts on fibroblasts from UVA damage

提取液防护作用无显著性差异 ($p>0.1$), 而在低浓度 (2.5 mg/mL 和 1.25 mg/mL) 时, 同浓度的绿茶提取液的防护作用明显低于老鹰茶 ($p<0.05$)。

2.3 绿茶和老鹰茶提取物对细胞 UVA 损伤的修复作用

图3是采用 10 J/cm^2 UVA 辐射细胞后, 加入不同浓度的绿茶和老鹰茶水提取液, 观察它们对细胞 UVA 损伤的不同修复作用。从 LDH 活性检测结果来看, 绿茶、老鹰茶水提取液都对 UVA 损伤有较强的修复作用, 且皆呈浓度效应。5、2.5、1.25 mg/mL 绿茶水提取物的修复率分别为: 55.0%、41.3%、30.0%; 而老鹰茶水提取物的修复率分别为 58.8%、43.8%、33.8%。比较它们的结果可以发现, 同浓度绿茶和老鹰茶水提取液之间无显著性差异 ($p>0.1$)。

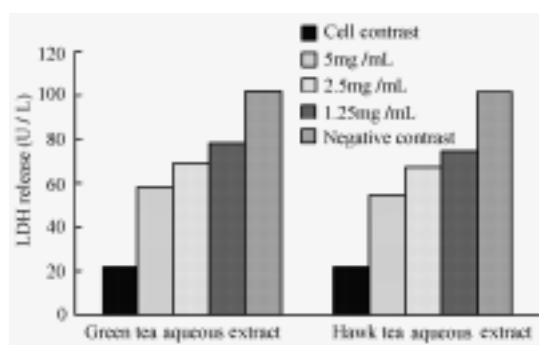


Fig.3 Repair effect of green tea and hawk tea aqueous extracts on fibroblasts after UVA damage

3 讨论

3.1 UVA 对细胞的损伤机理

关于紫外线对人体的伤害以前集中在对 UVC 的研究上, 对 UVB 和 UVA 的研究较少。事实上, 不同波长的紫外线对人体的损伤程度和机理不同。关于不同波长紫外线对体外细胞损伤的机理, 最近几年受到了各国科学家的重视。Kuluncsics 等^[2]认为, 短波段紫外线的能量足够高, 能通过 DNA 的直接吸收产生环丁烷嘧啶二聚体 (CPDs) 和 6, 4-光产物, 其他类型的损伤较少, UVC 和 UVB 能产生这种直接损害; 而 UVA 能量较弱, 产生直接光损害不明显, 它主要是通过产生活性氧自由基 (Reactive oxygen species, ROS) 对细胞造成间接伤害。生理状态下产生的 ROS 很低, 它可被抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等清除。当 UVA 照射所促成的自由基生成量超过清除机制的清除极

限时, 发生自由基积累, 而自由基在体内可引起 DNA 损伤, 造成单双链断裂以及碱基损伤、DNA 分子交联等, 造成对细胞的伤害^[3]。从结果 2.1 中可看出, 本实验中, 低剂量的 UVA 对细胞增殖有轻微促进作用, 此结果与索伟等^[4]描述的一致, 这可能是因为低剂量紫外线促进细胞代谢加强, 刺激细胞 DNA、RNA 的合成, 促进细胞有丝分裂、生长繁殖; 也可能是低剂量紫外线照射, 促进膜流动性增加, 促进了细胞内外物质的运输和信号转换, 从而使细胞的代谢活动变得旺盛^[5]。但随着紫外线剂量的加大, 细胞的损伤逐渐增加。

3.2 绿茶提取液的防 UVA 损伤和修复机理

除水以外, 茶是世界上消费最多的饮料。茶叶的品种很多, 主要包括绿茶、红茶和乌龙茶。我国居民饮用的主要是绿茶。绿茶是新鲜的茶叶经过蒸青和晒青后制成, 化学成分与新鲜茶叶基本相同。绿茶主要活性成分为茶多酚, 占茶叶干重的 30%, 包括黄烷醇类、黄烷双醇、黄酮类和酚酸, 其中黄烷醇类所占比例最大, 占多酚类总量的 80%。通常把黄烷醇类称为儿茶素, 包括表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)、表儿茶素没食子酸酯 (ECG)、表没食子儿茶 (EGC) 和表儿茶素 (EC)、没食子儿茶素等^[6]。

目前对茶多酚的应用研究较多, 茶多酚是一种抗氧化能力很强的天然抗氧化剂。Seymour 等^[7]以兔和角鲨鱼眼球角膜为模型, 研究了绿茶多酚 ECG 对 UVA 诱发的光氧化的保护作用, 研究发现 ECG 能有效保护眼球角膜内过氧化氢酶活性, 防护 UVA 诱发的损伤。符移才等^[8]以大鼠皮肤角朊细胞为模型, 研究了茶多酚对细胞长波紫外线损伤的保护作用。结果表明, 茶多酚能比较明显地抑制 UVA 对细胞的破坏作用, 能明显地拮抗 UVA 引起的脂质过氧化产物丙二醛、谷胱甘肽过氧化物酶水平改变, 同时较明显地抑制 ROS 系统引起的脂质过氧化反应, 提示茶多酚的保护作用与其清除自由基和抗脂质过氧化作用有关。另外研究还发现, 绿茶中的茶黄素和茶褐素可以通过抑制氧化作用和细胞色素 P450 的表达来减少 DNA 的损伤^[9]。

在本实验结果中, 绿茶提取液对 UVA 的防护和修复作用可能也是通过茶多酚阻断了自由基的产生和清除自由基, 阻止自由基链式反应的作用来达到对 UVA 损伤的防护和修复。

3.3 老鹰茶提取液的防 UVA 损伤和修复机理

老鹰茶也称白茶, 是我国南方民间长期饮用的植物代用茶。其以樟科植物川黔润楠 (Machilus

Chuanchienensis S.Lee) 为原料, 采其幼嫩枝叶, 经过翻炒杀青, 揉搓、发酵、烤干等而制得。这是一种无毒副作用、无污染、风味较佳的纯天然野生饮品, 主要分布在我国贵州、四川及重庆一带。老鹰茶主要含氨基酸、矿质元素、维生素、黄酮、多酚等物质, 与绿茶相比, 老鹰茶总黄酮含量远高于绿茶, 多酚类含量低于绿茶, 水溶性蛋白、水浸出物量均低于绿茶, 未检出咖啡因, 总糖含量与绿茶接近, 此外, 老鹰茶皂甙含量较高^[10]。老鹰茶的应用研究较少, 它的抗紫外线活性可能与它的生物活性物质黄酮、多酚、皂甙类有关。

本实验采用人皮肤成纤维细胞为模型, 探讨了绿茶和老鹰茶对长波紫外线的防护作用, 得到了一些初步结论。但也有很多地方需要进一步研究。如茶叶的组成成分复杂, 茶叶提出物的有效成分与抗紫外线活性的关系; 本实验中采用的 UVA 剂量为半致死剂量, 而茶叶的抗紫外线活性与紫外线剂量之间的关系也是我们要进一步探讨的内容。

中国有广阔的茶叶资源, 用茶提取物取代全部或部分化学防晒剂制备防晒霜, 能降低防晒用品的刺激性, 从而也拓展了茶叶的新用途。

致谢 本文数据由四川农业大学王之盛、曾静康、苟琳老师提供。在此表示感谢。

参考文献

- 1 Alapetite C, Wachter T, Sage E, *et al.* Radiat Biol, 1996, **69**(3): 359-369
- 2 Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, *et al.* Photochem Photobiol, B: Biol, 1999, **49**(1): 71-80
- 3 Christopher, Kielbassa, Len Roza, *et al.* Carcinogenesis, 1997, **18** (4): 811-816
- 4 索伟, 王兴林. 中华理疗杂志, 2001, **24**(2): 115-117
SUO Wei, WANG Xinglin. Chin J Phys Ther, 2001, **24**(2): 115-117
- 5 张红锋, 陈树德, 王耀发, 等. 细胞生物学杂志, 1998, **20**(2): 82-85
ZHANG Hongfeng, CHEN Shude, WANG Yaofa, *et al.* Chin J Cell Biology, 1998, **20**(2): 82-85
- 6 何弘. 国外医学皮肤性病学分册, 2002, **28**(2): 123-125
HE Hong. For Med Sci(Sec Der Ven), 2002, **28**(2): 123-125
- 7 Seymour Zigman, Nancy S Rafferty, Keen A Rafferty, *et al.* The Biological Bulletin, Woods Hole, 1999, **197**(2): 285-286
- 8 符移才, 金锡鹏, 张英. 中华劳动卫生职业病, 2000, **18**(6): 333-335
FU Yicai, JIN Xipeng, ZHANG Ying. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2000, **18**(6): 333-335
- 9 李志铭, 刘宗潮, 管忠震. 癌症, 1999, **18**: 增刊: 140-142
LI Zhiming, LIU Zongchao, GUAN Zhongzhen. Chin J Cancer suppl, 1999, **18**: 140-142
- 10 郁建平, 古练权. 植物资源与环境学报, 2001, **10**(3): 61-62
YU Jianping, GU Lianquan. J Plan Resou Envi, 2001, **10**(3): 61-62

Protective effects of mengshan green tea and hawk tea against UV-ray irradiation

CHEN Xiaoming^{1,2} REN Zhenglong² ZHANG Huaiyu² TANG Zongxiang² LUO Peigao²

¹(Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010)

²(Sichuan Agriculture University, Yaan 625000)

ABSTRACT A group of cultured normal human skin-derived fibroblasts was used as the cell model to investigate protective and repair effects of aqueous extracts of Mengshan green tea and Hawk tea against 320—400nm UV-ray irradiation, with the methods of MTT colorimetry and LDH release. It was found that the aqueous extracts had strong protective effect on fibroblasts against the UV-rays with dose dependence. There were no significant differences between the two kinds of tea aqueous extracts in a higher concentration of 5mg/mL, whereas at lower concentrations of 2.5 and 1.25mg/mL the, green tea aqueous extract was less effective than the hawk-tea aqueous extract in protecting fibroblasts from the UV-ray damage. Meanwhile, it was discovered that the green tea and hawk-tea aqueous extract could repair damages induced by the UV irradiation with dose dependence. But there were no statistically significant differences between the two kinds of aqueous extract. The effects may be related to antioxidant effect of tea polyphenol.

KEYWORDS Green tea, Hawk-tea, Ultraviolet radiation A, Fibroblast, Damage and repair

CLC Q274, Q682, Q946.33