

黑枸杞花青素、EGCG对中波紫外线诱导HaCaT细胞氧化损伤的协同保护作用

朱恒杏, 邵孟茹, 洪天畅, 关颖琳, 林明豪, 潘家荣*

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省特色农产品品质与危害物控制技术重点实验室, 浙江杭州 310018)

摘要: 该研究探讨黑枸杞花青素(BWA)、表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的体外抗氧化能力并通过构建中波紫外线(UVB)诱导永生角质(HaCaT)细胞氧化损伤模型考察两者复配物对细胞氧化损伤的协同保护作用。体外抗氧化实验表明BWA、EGCG对DPPH自由基、羟自由基均具有较强的清除能力和铁离子还原能力。通过Isobologram分析得出在药物安全剂量范围内,不同比例组合物对受损细胞的保护作用均优于单一物质($P<0.05$),其中质量比6:4(BWA:EGCG)复配物具最强协同保护作用,协同率达17.08%,受损细胞存活率达89.71%。相较于模型组,6:4复配物使细胞内过氧化氢酶(CAT)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)活性分别增强2.66、1.91、2.33倍,丙二醛(MDA)含量水平降低40%($P<0.05$)。结果表明BWA、EGCG均具强体外抗氧化能力,两者复配物对细胞氧化损伤具协同保护作用,其机制可能通过增强细胞中抗氧化酶活性从而减轻UVB对HaCaT细胞的氧化损伤实现,可为黑枸杞花青素与EGCG组合物的开发和应用提供理论参考及实验支撑。

关键词: 黑枸杞花青素; 表没食子儿茶素没食子酸酯; 体外抗氧化能力; 永生角质形成细胞; 中波紫外线辐射; 协同保护作用

文章编号: 1673-9078(2024)08-106-115

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.8.0918

Synergistic Protective Effects of the Anthocyanins from Black Wolfberry and EGCG against the UVB-induced Oxidative Damage in HaCaT Cells

ZHU Hengxing, SHAO Mengru, HONG Tianchang, GUAN Yinglin, LIN Minghao, PAN Jiarong*

(Key Laboratory of Specialty Agri-product Quality and Hazard Controlling Technology of Zhejiang Province, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: In this study, the *in vitro* antioxidant capacities of the anthocyanin from black wolfberry (BWA) and epigallocatechin gallate (EGCG) were investigated, and the synergistically protective effect of the combination of the two compounds against the oxidative damage of immortalized human keratinocytes (HaCaT) was investigated through constructing a model of oxidative damage induced by UVB. *In vitro* antioxidant experiments showed that BWA and EGCG

引文格式:

朱恒杏,邵孟茹,洪天畅,等.黑枸杞花青素、EGCG对中波紫外线诱导HaCaT细胞氧化损伤的协同保护作用[J].现代食品科技,2024,40(8):106-115.

ZHU Hengxing, SHAO Mengru, HONG Tianchang, et al. Synergistic protective effects of the anthocyanins from black wolfberry and EGCG against the UVB-induced oxidative damage in HaCaT cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(8): 106-115.

收稿日期: 2023-07-30

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFF0211300)

作者简介: 朱恒杏(1999-),女,硕士研究生,研究方向:功能性成分研究,E-mail: 1048119030@qq.com

通讯作者: 潘家荣(1964-),男,博士,研究员,研究方向:功能性成分研究,E-mail: panjr@263.net

had strong DPPH radical scavenging ability, hydroxyl radical scavenging ability and iron ion reducing ability. Isobologram analysis revealed that within the safe dose range, the combinations with different proportions of BWA and EGCG exhibited greater protective effects on the damaged cells compared with BWA or EGCG alone ($P < 0.05$), and the combination with the mass ratio of 6:4 (BWA:EGCG) exerted the strongest synergistic protection, with the synergistic rate being 17.08% and the survival rate of the damaged cells being 89.71%. Compared with the model group, the 6:4 combination increased the activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPX) by 2.66, 1.91 and 2.33 times, respectively, while decreasing the content of malondialdehyde (MDA) by 40% ($P < 0.05$). The results showed that both BWA and EGCG had *in vitro* strong antioxidant capacities, and their combination exhibited synergistically protective effect against cell oxidative damage. The mechanism might be realized by enhancing the activities of antioxidant enzymes in cells, thereby reducing UVB-induced oxidative damage to HaCaT cells, which may provide a theoretical reference and experimental support for the development and application of the combination of the anthocyanin from black wolfberry and EGCG.

Key words: black wolfberry anthocyanin; epigallocatechin gallate; antioxidant capacity *in vitro*; hacat cells; ultraviolet b radiation; synergistic protection

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 系茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium* L.) 植物, 其果实中富含花青素类天然色素, 现有研究表明其具有抗氧化^[1]、抗辐射^[2]、抗肿瘤^[3]等多种药理作用。茶叶及其提取物中含大量的茶多酚类物质, 儿茶素类化合物为茶多酚中主要成分, 约占总茶多酚 60%~80% 的质量分数^[4]。表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin Gallate, EGCG) 属于儿茶素的一种, 是其中含量最高的单体^[5], 其具有抗氧化^[6]、抗癌^[7]、预防心血管疾病^[8]等多种药理作用。研究表明, 天然活性物质联合的抗氧化能力优于单种物质的抗氧化能力, 如 EGCG、葡萄籽原花青素与二氢杨梅素联用可显著抑制小鼠乳腺癌 4T1 细胞的增殖, 其复配物促癌细胞凋亡作用效果优于单种物质, 具有显著的协同抗氧化增效作用^[9]; 白藜芦醇与 EGCG 联用显著提高小鼠肌肉抗氧化水平^[10]。

皮肤光老化是由于人表皮长期经受过度紫外辐射所致, 其中处于 280~320 nm 波长范围的中波紫外线 (Ultraviolet B, UVB) 是造成皮肤损伤的主要波段。UVB 照射会刺激皮肤中光敏物质增加, 引发自由基大量产生, 使得脂质过氧化产物堆积, 诱导细胞损伤和凋亡, 甚至引起皮肤癌变^[11]。应用天然活性物质作为抗氧化剂预防和减轻 UVB 照射形成的光损伤已是当今研究热点。黑枸杞花青素 (Anthocyanin of Black Wolfberry, BWA) 与 EGCG 均具有较强的抗氧化及抗紫外线能力, 研究表明, 黑枸杞花青素不仅可减轻紫外线辐射后人皮肤成纤维细胞 (HSFs) 氧化损伤^[12]且能显著提高紫外照射果蝇的平均寿命及半数死亡时间^[13], EGCG 可减少

UVB 辐射所致的光产物的产生、加速光产物的清除^[14], 且能减少因 UVB 所致的细胞损伤和凋亡^[15]。

目前对黑枸杞花青素及 EGCG 抗氧化活性研究颇多, 但关于两者的复合抗氧化活性研究相对较少。与单一抗氧化剂相比, 复合抗氧化剂具有极好的应用前景, 其不仅具有活性高、成本低的优点, 且可避免单一抗氧化剂使用剂量过多带来的安全问题^[16]。本实验主要以黑枸杞花青素、EGCG 及其不同比例复配物为研究对象, 建立 UVB 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤模型, 结合 Isobologram 分析法研究两者及其不同比例混合物对细胞模型的协同保护作用, 为黑枸杞花青素、EGCG 组合物的开发和利用提供理论参考及实验支撑。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

黑果枸杞: 购于青海格尔木, 由中国计量大学生命科学学院实验室进行加工, 花青素 $\geq 80\%$ (质量分数); 表没食子儿茶素没食子酸酯 (Epigallocatechin Gallate, EGCG), 纯度为 98% (质量分数)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH), 上海易恩化学技术有限公司; 永生化人角质细胞 (HaCaT), 无锡欣润生物科技有限公司; 最低必需培养基 (Minimum Essential Medium, MEM)、质量分数 0.25% 胰蛋白酶/EDTA 消化液, 普诺赛生命科技有限公司; 磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline, PBS)、胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、双抗 (青霉素/链霉素, Penicillin/Streptomycin, P/S) 溶液、二甲亚砜

(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)、MTT 细胞增殖检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione Peroxidase, GPX) 活性检测试剂盒、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 活性检测试剂盒、丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) 含量检测试剂盒, 上海生工生物工程股份有限公司。其他化学试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器与设备

UV-2600 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司; HF90 二氧化碳细胞培养箱, 上海力申科学仪器有限公司; 超声波细胞破碎仪, 上海沪析实业有限公司; TM-223 紫外线照度仪, 上海彘牛工业科技有限公司; 医献 G15T8E UVB-313 nm 灯管, 东莞市川谷电子商务有限公司; Allegra X-30R 冷冻离心机, 美国贝克曼库尔特有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 黑枸杞花青素、EGCG 体外抗氧化活性测试

1.3.1.1 DPPH 自由基清除能力的测定

参照文献^[17]并做适量修改。分别将黑枸杞花青素冻干粉、EGCG、Vc (阳性对照) 配制质量浓度为 5、15、25、50、100、200、400、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的样品溶液。精密量取上述各浓度溶液 500 μL , 分别加入 2.5 mL 的 0.2 mmol/L DPPH/乙醇标准溶液, 在常温下暗反应 30 min, 于波长 517 nm 处测定吸光值。同法以蒸馏水作为空白对照进行实验, 并测定各样品溶液吸光度。在自由基清除率为 50% 时所消耗的剂量即为半数清除率用 IC_{50} 表示, 按下列公式计算 DPPH 自由基清除率:

$$D = \frac{A_0 - (A_1 - A_2)}{A_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

D —自由基清除率, %;

A_0 —空白对照组吸光值;

A_1 —各样品加入标准液后吸光值;

A_2 —各样品溶液吸光值。

1.3.1.2 羟自由基清除能力测定 (水杨酸法)

参照文献^[18]方法并做适量修改。精密量取各不同质量浓度 (同 1.3.1.1 项) 样品溶液 1.5 mL, 分别加入 0.5 mL 的 2.5 mmol/L FeSO_4 溶液, 2.5 mmol/L 水杨酸钠 / 乙醇溶液和质量分数 0.03% H_2O_2 溶液,

振荡混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 40 min, 于波长 510 nm 处测定吸光值。同法以蒸馏水作为空白对照测定吸光值, 并测定各样品溶液吸光值, 按公式 (1) 计算清除率。

1.3.1.3 铁离子还原能力 (FRAP) 测定

参照文献^[19]方法并做适量修改。FRAP 试液的配制: 将 25 mL 的 0.3 mol/L 醋酸钠缓冲液 (pH 值 3.6)、2.5 mL 的 10 mmol/L TPTZ-40 mmol/L HCl 和 2.5 mL 的 20 mmol/L FeCl_3 充分混合, 现配现用。

硫酸亚铁标准曲线的绘制: 配制 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2、1.6、2.0 mmol/L FeSO_4 溶液, 分别精密移取各浓度 FeSO_4 溶液 150 μL 加入 3 mL FRAP 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 混合 6 min, 于波长 593 nm 处测定吸光值记为 A_1 , 同时以体积分数 70% 的甲醇作为空白对照测定吸光值记为 A_0 , 以吸光度 ($A_1 - A_0$) 为纵坐标, 浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程: $y = 0.5601x + 0.0359$ ($R^2 = 0.9944$), FeSO_4 溶液在 0.10~2.00 mmol/L ($n=6$) 与吸光度呈良好的线性关系。

精密量取不同质量浓度 (同 1.3.1.1 项) 的样品溶液各 150 μL , 分别加入 3 mL FRAP 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 混合 6 min, 于波长 593 nm 处测定吸光值 A_1 , 代入上述标曲计算得还原能力。

1.3.2 BWA、EGCG 对 UVB 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的影响

1.3.2.1 HaCaT 细胞培养

细胞复苏: 迅速将含有细胞悬液的冻存管于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中解冻, 移入含有 4 mL 完全培养基 (MEM 培养基 + 体积分数 15% FBS + 体积分数 1% P/S, 下同) 的 15 mL 离心管中混合均匀。在 1 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 加入 5 mL 培养基后吹匀于培养瓶中培养。细胞传代: 当培养瓶中细胞密度达 80%~90% 时, 弃去培养液上清, 用 PBS 缓冲液润洗细胞 2 次, 加 2 mL 消化液于培养箱 (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 体积分数 CO_2) 中消化 8 min, 后加入完全培养基终止消化, 在 1 000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清并加入培养液后吹打均匀, 以 1:2 比例传代。

1.3.2.2 药物安全剂量的确定

取对数生长期 3~5 代的 HaCaT 细胞接种于 96 孔培养板 (5 000 个 / 孔), 培养 12 h 后, 弃去培养液后用 PBS 洗涤 2 次, 分别加入 50 μL 含不同质量浓度 (0 (即对照组)、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/mL) BWA、EGCG 以及 5 种两者不同比例 (8:2、6:4、5:5、

4:6、2:8, BWA:EGCG, m/m , 下同)混合物的完全培养液,继续培养 12 h。采用 MTT 试剂盒测定各样品在波长 570 nm 时吸光值,按公式(2)计算细胞存活率,以确定 BWA、EGCG 以及 5 种两者不同比例组合物对正常细胞的药物安全剂量范围。计算公式为:

$$R = \frac{A_1}{A_0} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R ——细胞存活率, %;

A_1 ——样品实验组吸光值;

A_0 ——空白对照组吸光值。

1.3.2.3 UVB辐射剂量的确定

取对数生长期 HaCaT 细胞接种于 96 孔培养板(5 000 个/孔)培养 12 h,弃去培养液后用 PBS 洗涤 2 次,并加入 100 μL PBS 覆盖细胞,以不同 UVB 剂量 0、30、60、120、240 mJ/cm^2 对细胞进行照射,后加入 150 μL 完全培养基继续培养 6 h,采用 MTT 进行细胞活力分析以确定合适的照射剂量。

1.3.2.4 BWA、EGCG 以及两者不同比例混合物对 UVB 诱导 HaCaT 细胞氧化损伤的影响

参考文献^[20]的方法并略有改动,实验分为空白对照组、模型组、3 个不同浓度药物(BWA、EGCG 及 5 种比例混合物)组。取 HaCaT 细胞以 10^6 个/孔接种于 12 孔培养板,培养 12 h 后,弃去培养液后加入 1 mL PBS 洗涤 2 次,对照组和 UVB 照射组分别加入 0.5 mL 培养基,药物组加入 0.5 mL 含相应质量浓度药物的完全培养基,质量浓度分别为 50、200、350 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。继续培养 12 h,用 PBS 缓冲液清洗 2 次,加入 1 mL PBS 缓冲液覆盖细胞,除空白对照组外,其余各组经 157 mJ/cm^2 强度的 UVB 照射,完成后收集细胞严格按照试剂盒说明进行 MTT、MDA、CAT、SOD、GPX 指标的检测。

1.3.2.5 Isobologram 分析法研究黑枸杞花青素与 EGCG 的相互作用及其协同率的计算

以 BWA 与 EGCG 单种物质对 UVB 辐照后细胞存活率的 IC_{50} 值及其 95% 区间值分别绘制于横、纵坐标上,相连后构成作用相加线及其 95% 可信区间。以不同比例组合物的 IC_{50} 值作为坐标位点绘制于坐标轴内,若坐标点位于相加线的 95% 可信限内,则表示复配效应为相加;若位于可信限下方,则表示具有协同效应;若位于可信限上方,则为拮抗作用^[21]。

相互作用协同率(Synergy Rate, SR)取决于实验测得的 $\text{IC}_{50\text{E}}$ 和理论计算的 $\text{IC}_{50\text{T}}$ 。若 $-5\% \leq \text{SR} \leq 5\%$,表示药物间相互作用为相加;若 $\text{SR} > 5\%$,表示具有协同作用,SR 值越大说明协同作用越强;若 $\text{SR} < -5\%$,表示为相互拮抗作用。以 2 种天然物质 BWA、EGCG 的 IC_{50} 为计算基础,按以下公式计算^[9]:

$$\text{IC}_{50\text{T}} = R_a \times \text{IC}_{50a} + R_b \times \text{IC}_{50b} \quad (3)$$

$$\text{SR} = \frac{\text{IC}_{50\text{T}} - \text{IC}_{50\text{E}}}{\text{IC}_{50\text{T}}} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

$\text{IC}_{50\text{T}}$ ——组合物处理细胞的 50% 存活率所消耗剂量理论值, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

$\text{IC}_{50\text{E}}$ ——组合物处理细胞的 50% 存活率所消耗剂量实际值, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

R_a ——组合物中 BWA 所占比例;

R_b ——组合物中 EGCG 所占比例;

IC_{50a} ——单物质 BWA 处理细胞的 50% 存活率所消耗剂量值, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

IC_{50b} ——单物质 EGCG 处理细胞的 50% 存活率所消耗剂量值, $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.4 数据处理

采用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并使用软件 originpro 2021 绘制统计图。

2 结果与分析

2.1 黑枸杞花青素、EGCG 体外抗氧化能力测试

如图 1a、1b 所示,在测定质量浓度范围内(5~600 $\mu\text{g}/\text{mL}$),BWA 与 EGCG 对 DPPH 及羟自由基都具较好的清除能力,且清除率随质量浓度呈线性递增关系。Vc、EGCG 及 BWA 的 DPPH·清除 IC_{50} 值依次为 10.69、28.08、72.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$,羟自由基清除 IC_{50} 值依次为 85.55、98.30、170.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$,BWA 与 EGCG 自由基清除能力均低于 Vc,其中 EGCG 的自由基清除能力接近于 Vc。DPPH 自由基清除涉及供氢反应,活泼的 DPPH· 接受一个 H· 后形成稳定的 DPPH-H 分子,因此 DPPH· 清除能力可反映抗氧化物的氢原子转移机制(Hydrogen Atom Transfer, HAT)^[22]。花色苷与 EGCG 具有多个酚羟基结构,其结构中的邻二酚羟基易发生鞣裂,失去

H· 后形成相应自由基, H· 与 DPPH· 结合形成稳定的 DPPH-H 分子, 而自由基进一步转化为更稳定的邻苯醌式产物, 其强抗氧化能力可能由此而来^[23]。花色苷与 EGCG 结构中酚羟基可与 OH· 反应生成稳定化合物中断链式反应, 或与铁金属离子络合降低催化反应速率来实现 OH· 清除^[24], 从而具有强抗氧化活性。EGCG 化学结构中邻二酚羟基数量多于花青素, 这可能也是 EGCG 体外抗氧化性强于 BWA 的原因。

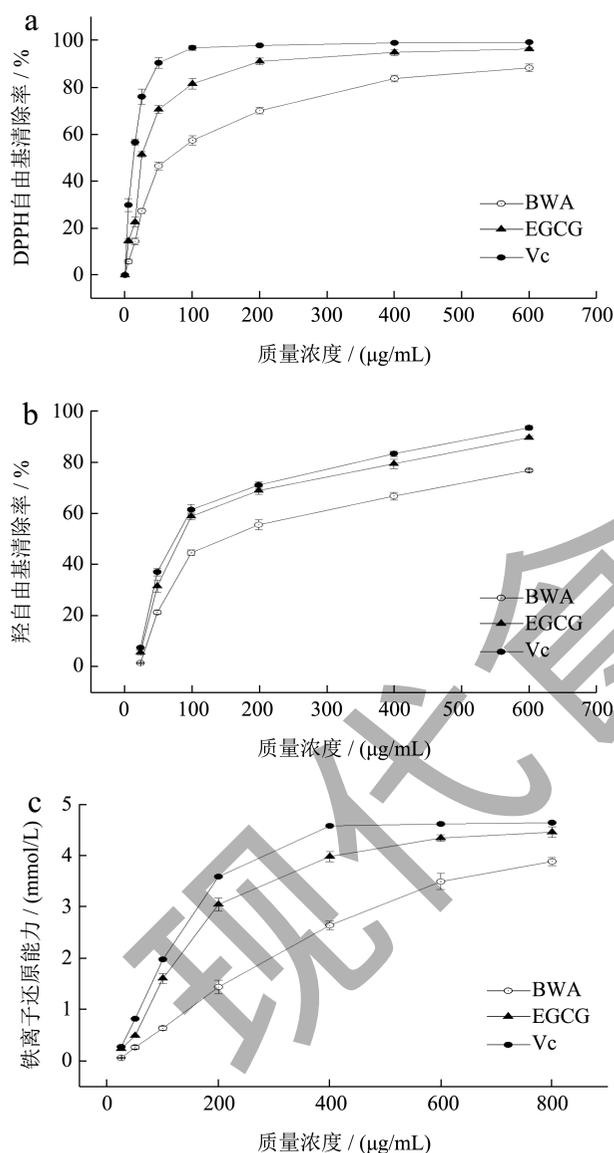


图1 BWA、EGCG的体外DPPH (a)和OH (b)自由基清除能力及铁离子还原能力(c)量效曲线

Fig.1 *In vitro* DPPH (a) and OH (b) free radical scavenging ability and iron ion reducing ability (c) dose-effect curve of BWA and EGCG

FRAP检测法是基于 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} 的还原反应, 整个过程无自由基参与, 其通过电子转移

(Electron Transfer, ET)能力间接反映出体外抗氧化能力的强弱。图1c显示, BWA与EGCG都具有较强的铁离子还原能力, 随着质量浓度的增加, 其铁离子还原能力也随之增强。结合DPPH·清除能力及OH·清除能力分析, 说明BWA、EGCG均具较强的体外抗氧化活性, 其抗氧化活性可能通过氢原子转移及电子转移机制实现。

2.2 BWA、EGCG及两者不同比例混合物对HaCaT细胞活力的影响

由图2可知, 随着药物浓度的增加, HaCaT细胞存活率逐渐降低。当质量浓度低于0.4 mg/mL时, BWA、EGCG以及不同比例混合物处理的HaCaT细胞存活率大于80%, 仅质量浓度为0.2 mg/mL时EGCG与2:8比例混合物处理的细胞活力小于80%, 当细胞活力大于80%时可视为药物在此浓度下对细胞无毒性。当质量浓度增至0.8 mg/mL时, 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$), 细胞存活率均小于80%。根据结果分析, 选择50、100、200 µg/mL作为低、中、高3个药物质量浓度进行后续实验。

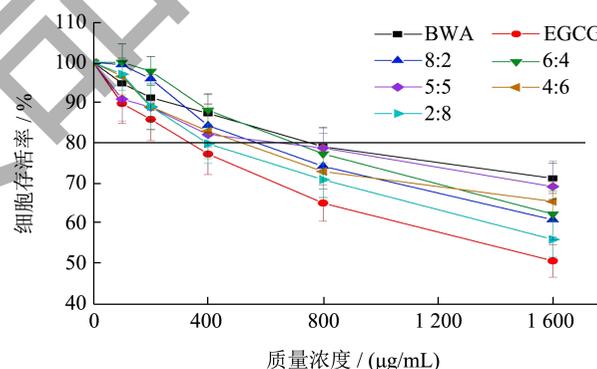


图2 不同质量浓度的BWA、EGCG以及不同比例混合物对HaCaT细胞活力的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of BWA, EGCG and mixtures of different proportions on the viability of HaCaT cells

2.3 不同UVB辐照强度对HaCaT细胞活力的影响

由图3可知, HaCaT细胞活力随着UVB辐照强度增加呈降低趋势, 差异具有显著性 ($P < 0.05$), 当辐照剂量为240 mJ/cm²时达最低存活率为29.20%, 表明UVB辐照对HaCaT细胞有较严重的氧化损伤作用。将所得数据进行线性拟合, 结果表明细胞活力为50%时的照射剂量为157 mJ/cm², 以此辐射强度建立UVB辐照损伤细胞模型进行后续实验。

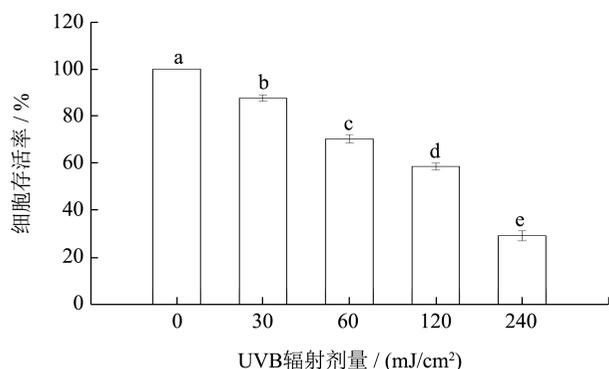


图3 UVB 辐照剂量对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig.3 Effects of UVB irradiation doses on the viability of HaCaT cells

注：图中不同字母表示细胞活性在不同 UVB 辐射剂量影响下相互之间的差异均具有显著性 ($P < 0.05$)。

2.4 BWA、EGCG 以及不同比例混合物对 UVB 诱导 HaCaT 细胞活力的影响

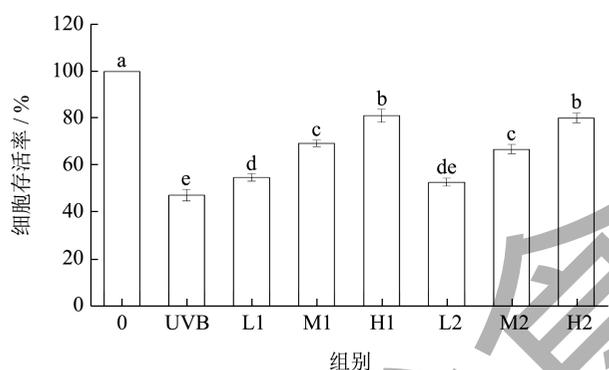


图4 单物质 BWA、EGCG 对 UVB 诱导 HaCaT 细胞活力的影响

Fig.4 Effects of BWA and EGCG on UVB-induced viability of HaCaT cells

注：图中组别 0 代表空白对照组，组别 UVB 代表模型组，组别 L1、L2 分别代表质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 BWA、EGCG，组别 M1、M2 分别代表质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 BWA、EGCG，组别 H1、H2 分别代表质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 BWA、EGCG；图中不同字母表示不同组别样品的细胞存活率相互之间的差异具有显著性 ($P < 0.05$)，相同字母间则表示无显著性差异 ($P > 0.05$)。

由图 4 可知，BWA、EGCG 对受损细胞的氧化损伤均有一定保护作用，细胞存活率随着药物浓度的增加而增加。与模型组相比，50 $\mu\text{g/mL}$ EGCG 处理的细胞存活率为 52.81%，差异不显著 ($P > 0.05$)，其余浓度组别药物均显著提高细胞存活率 ($P < 0.05$)。质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时 BWA、EGCG 细胞存活率分别为 81.16%、80.15%，分别为模型组细胞存活率

的 1.72 倍及 1.70 倍，但相同浓度下 BWA 与 EGCG 两者间对细胞活力的影响不具有显著性差异 ($P > 0.05$)。现有研究表明，质量浓度为 2 mg/mL 的黑枸杞水提取物对经 30 mJ/cm^2 UVB 照射 40 min 后的细胞存活率为 85.61%，为模型组细胞存活率的 1.30 倍^[25]；质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的茶叶中 EGCG 对经 60 mJ/cm^2 UVB 诱导后细胞存活率为 84.26%，为模型组细胞存活率的 1.07 倍^[15]，均能不同程度地提高氧化损伤细胞的存活率。

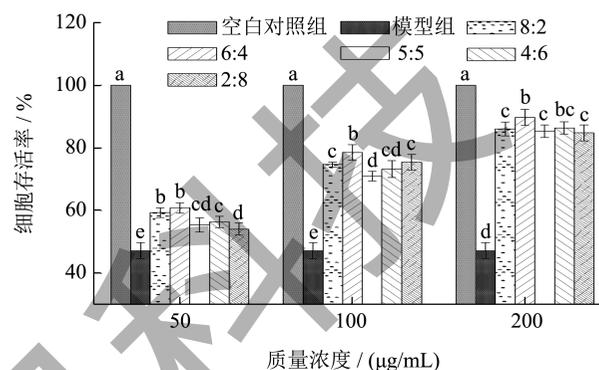


图5 BWA、EGCG 不同比例混合物对 UVB 诱导 HaCaT 细胞活力的影响

Fig.5 Effects of BWA and EGCG mixtures with different proportions on UVB-induced HaCaT cell activity

注：图中不同字母表示在同一质量浓度下的不同组别样品的细胞存活率相互之间的差异具有显著性 ($P < 0.05$)，相同字母间则表示无显著性差异 ($P > 0.05$)。

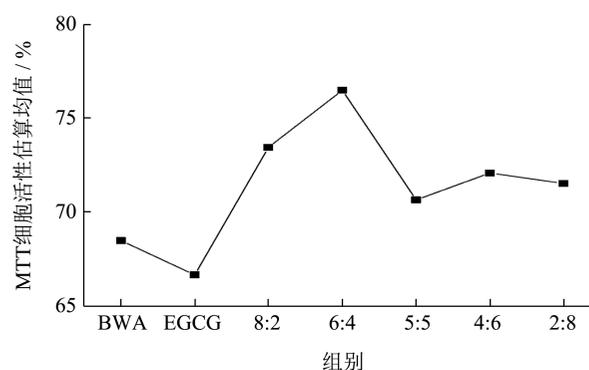


图6 不同药物组对 UVB 诱导 HaCaT 细胞活力影响均值分析

Fig.6 Effects of different drug groups on UVB-induced HaCaT cell viability analysis of means

由图 5 可知，不同比例组合物对 UVB 损伤的 HaCaT 细胞存活率均显著提高 ($P < 0.05$)，且呈剂量依赖性，但其影响程度各不相同，在质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时，6:4 比例组合物使细胞存活率达到最大为 89.71%。同时对 3 个浓度下 BWA、EGCG 及

不同比例混合物的细胞活力数据进行 SPSS 方差均值分析, 结果如图 6 所示, 对细胞活性影响大小依次为 6:4>8:2>4:6>2:8>5:5>BWA>EGCG, 由此可知, 比例组合物对细胞活性影响程度显著高于单物质 ($P<0.05$), 其中 6:4 比例混合物对受损细胞活性影响最强, 说明 BWA 与 EGCG 在此比例下对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞具有最强抗氧化保护作用。

2.5 Isobologram分析法研究BWA与EGCG的相互作用

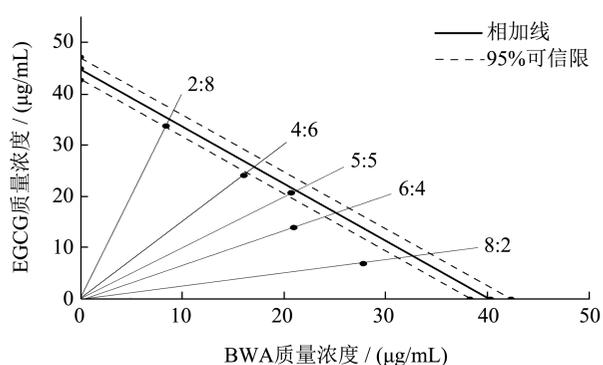


图 7 BWA、EGCG 组合物对 UVB 诱导 HaCaT 细胞相互作用 Isobologram 分析图

Fig.7 Isobologram analysis diagram of BWA and EGCG composition on UVB-induced HaCaT cell interaction

表 1 BWA、EGCG复配物处理UVB辐照HaCaT细胞的存活率 IC_{50} 值及协同率

Table 1 IC_{50} value and synergistic rate of survival rate of HaCaT cells irradiated by UVB treated with BWA and EGCG complex

组合	比例	$IC_{50T}/(\mu\text{g/mL})$	$IC_{50E}/(\mu\text{g/mL})$	SR/%
BWA:EGCG	8:2	41.23 ± 3.30 ^a	34.78 ± 2.16 ^b	15.65
	6:4	42.15 ± 2.08 ^a	34.95 ± 3.05 ^b	17.08
	4:6	43.07 ± 1.16	40.20 ± 2.02	6.67
BWA:EGCG	5:5	42.61 ± 1.54	41.48 ± 2.87	2.67
	2:8	43.99 ± 1.42	42.17 ± 4.00	4.16

注: 表中每行字母不同表示该行理论 IC_{50T} 与实际 IC_{50E} 值之间差异具有显著性 ($P<0.05$)。

Isobologram 分析图可快速直观地判断物质之间复配效应关系。由图 7 可知, 比例为 8:2、6:4 及 4:6 的复配组对应坐标点均位于 95% 可信限下方, 表明 BWA、EGCG 按比例 8:2、6:4、4:6 复配后对 UVB 损伤的 HaCaT 细胞具有协同保护作用, 但其协同效应强度不同。表 1 显示, 各比例的理论 IC_{50E} 值均小于 IC_{50T} 值, 经 t 检验分析得出仅比例 8:2、6:4 复配组理论值与实验值存在显著性差异 ($P<0.05$), 其中

复配比例为 6:4 时协同率大于 8:2 复配组合, 并且协同率达到最大为 17.08%, 说明 BWA 与 EGCG 在此比例复配下对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞氧化损伤具有最强的协同保护作用, 因此选择 6:4 固定比例进行后续指标的检测。

2.6 BWA、EGCG及组合物对UVB诱导HaCaT细胞CAT活性的影响

CAT 是内源性抗氧化酶, 是机体抗氧化体系的关键酶之一, 能够分解 H_2O_2 从而防止活性氧基团损伤细胞膜系统^[26]。由图 8 可知, UVB 辐照显著抑制 HaCaT 细胞中 CAT 的酶活性。经不同浓度 BWA、EGCG 及比例混合物处理后, 受损细胞内 CAT 的酶活性逐渐增高, 与模型组相比具有显著性差异 ($P<0.05$)。经高质量浓度 BWA、EGCG 及比例混合物 (200 $\mu\text{g/mL}$) 分别处理后, 细胞内 CAT 酶水平分别为 21.02、20.77、23.70 U/mL, 较模型组分别增高 2.36、2.33 及 2.66 倍。其中比例组合物处理的损伤细胞内 CAT 酶活性显著高于单一物质处理组 ($P<0.05$)。以上结果表明, BWA、EGCG 及其组合物均可增高 UVB 照射导致的细胞中低水平的 CAT 酶活性, 其中组合物对损伤细胞保护作用更强, 具加成协同作用。

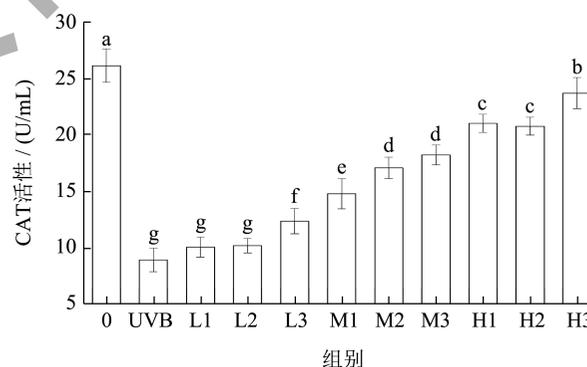


图 8 BWA、EGCG 及组合物对 UVB 诱导 HaCaT 细胞 CAT 活性的影响

Fig.8 Effects of BWA, EGCG and their compositions on CAT activity induced by UVB in HaCaT cells

注: 图中组别 0 代表空白对照组, 组别 UVB 代表模型组, 组别 L1、L2、L3 分别代表质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 BWA、EGCG 及 6:4 比例混合物, 组别 M1、M2、M3 分别代表质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的 BWA、EGCG 及 6:4 比例混合物, 组别 H1、H2、H3 分别代表质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 BWA、EGCG 及 6:4 比例混合物, 下同。图中不同字母表示不同组别样品间的细胞活性数据具有显著性差异 ($P<0.05$), 相同字母间则表示无显著性差异 ($P>0.05$), 下同。

2.7 BWA、EGCG以及组合物对UVB诱导HaCaT细胞MDA含量的影响

MDA是细胞内不饱和脂肪酸发生过氧化反应所产生的氧化终产物，能引起细胞代谢及功能障碍甚至死亡，其常用于评估细胞氧化损伤程度的生物指标之一，具有较强的生物毒性^[27]。如图9所示，UVB照射显著造成HaCaT细胞中MDA含量升高($P<0.05$)。经不同浓度各药物处理后，损伤细胞内的MDA含量随药物浓度增加而减少，且较模型组具显著性差异($P<0.05$)。经高质量浓度(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) BWA、EGCG及比例混合物处理后，细胞中MDA含量分别为2.33、2.15、1.88 nmol/mL，较未加药的模型组中MDA水平分别降低26%、31%和40%，其中组合物处理的损伤细胞内MDA含量显著低于单一物质处理组($P<0.05$)，说明BWA、EGCG组合物较单种物质更能降低细胞氧化损伤。

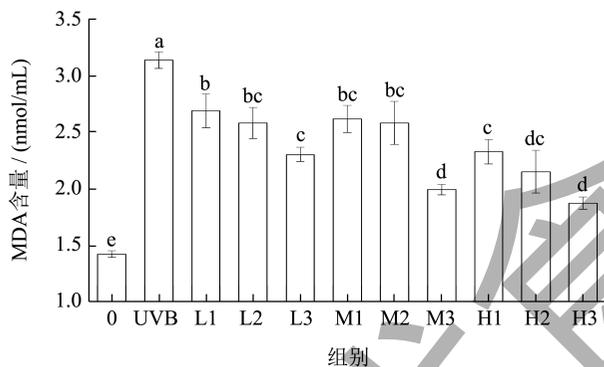


图9 BWA、EGCG及组合物对UVB诱导HaCaT细胞MDA含量的影响

Fig.9 Effects of BWA, EGCG and their compositions on MDA content in HaCaT cells induced by UVB

2.8 BWA、EGCG以及组合物对UVB诱导HaCaT细胞SOD活性的影响

SOD是机体内重要的抗氧化酶，其不仅可直接将细胞内积聚的自由基清除，还可阻断细胞内不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应，以此抑制细胞毒性物质的生成，从而达到保护细胞的作用^[28]。图10显示，与空白对照组相比，模型组的HaCaT细胞中SOD活性显著降低($P<0.05$)。与模型组相比，不同浓度BWA、EGCG及比例混合物能显著提高受损细胞内SOD活性($P<0.05$)，并呈剂量依赖性。与模型组相比，高浓度BWA、EGCG及比例混合物(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)使受损细胞内SOD水平分别增长至

33.33、30.23、36.56 U/mL，分别是模型组的1.74、1.58及1.91倍。其中比例组合物处理的损伤细胞内CAT酶活性显著高于单一物质处理组($P<0.05$)。结果表明，组合物可抑制UVB诱导的HaCaT细胞氧化损伤，且效果优于单一物质处理组。

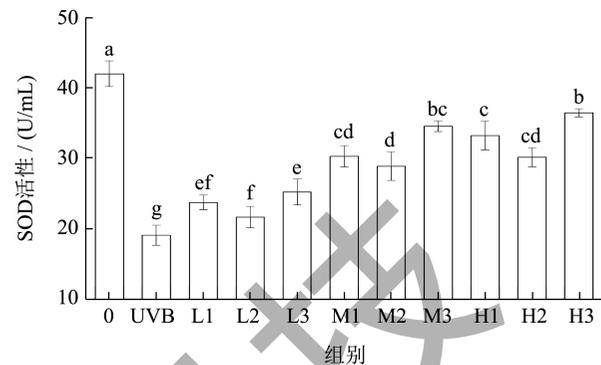


图10 BWA、EGCG及组合物对UVB诱导HaCaT细胞SOD活性的影响

Fig.10 Effects of BWA, EGCG and their compositions on SOD activity induced by UVB in HaCaT cells

2.9 BWA、EGCG以及组合物对UVB诱导HaCaT细胞GPX活性的影响

GPX是一种过氧化物分解酶，可使细胞中的非酶抗氧化物谷胱甘肽(GSH)转化为氧化型谷胱甘肽(GSSG)，同时将具有毒性的过氧化物还原为无毒化合物，促进过氧化氢的分解，维持细胞膜结构和功能完整性来抵抗氧化应激损伤^[29]。如图11所示，UVB辐照显著抑制HaCaT细胞中GPX活性($P<0.05$)。经不同浓度BWA、EGCG及比例混合物处理后，受损细胞内GPX的酶活性逐渐增高，呈剂量依赖性，与模型组相比具显著性差异($P<0.05$)。经高浓度BWA、EGCG及比例混合物(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别处理后，细胞内GPX酶水平分别为31.68、28.01、35.05 U/mL，分别是模型组的2.10倍、1.86倍、2.33倍。结果表明，BWA、EGCG及其混合物均可在一定程度上保护细胞免受UVB所致的氧化损伤，其中两者组合物保护作用最强($P<0.05$)，组合物具有一定加成效果。

既往研究表明，质量浓度为1 mg/mL的柴达木黑枸杞花青素对经30 mJ/cm^2 UVB照射30 min后的细胞内CAT、SOD和GPX的酶活性分别为模型组的1.74、1.89、1.31倍($P<0.05$)，细胞内MDA含量水平降低33.23%($P<0.05$)^[12]；质量浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的茶叶中EGCG对经60 mJ/cm^2 UVB诱导后细胞的细胞内SOD和GPX的酶活性分别为模

型组的 1.49、2.23 倍 ($P<0.05$), 细胞内 MDA 含量水平降低 50.71% ($P<0.05$)^[15], 说明黑枸杞花青素与 EGCG 均具不同程度地细胞抗氧化损伤保护能力。同时本实验中经 BWA 与 EGCG 的 6:4 组合物处理后细胞内 CAT、SOD 和 GPX 的酶活性分别为模型组的 2.66、1.91、2.33 倍 ($P<0.05$), 细胞内 MDA 含量水平降低 40% ($P<0.05$), 与本研究及以往研究中单物质结果相比较, 表明 BWA 与 EGCG 联用对 UVB 损伤的细胞具有更强的抗氧化保护作用。

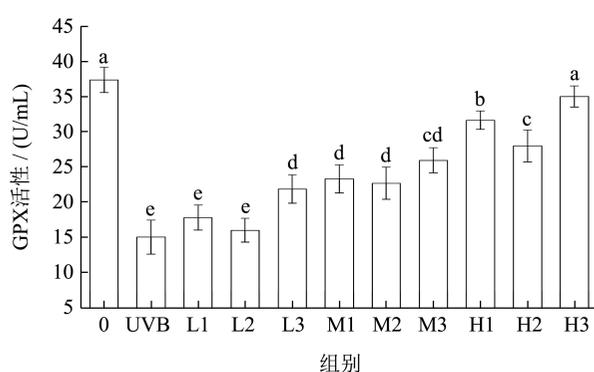


图 11 BWA、EGCG 及组合物对 UVB 诱导 HaCaT 细胞 GPX 活性的影响

Fig.11 Effects of BWA, EGCG and their compositions on UVB-induced GPX activity in HaCaT cells

3 结论

本研究考察了黑枸杞花青素及 EGCG 的体外抗氧化能力, 并利用 UVB 诱发永生人角质 HaCaT 细胞氧化损伤模型来研究黑枸杞花青素、EGCG 及其比例组合物对氧化应激损伤细胞的协同保护作用。结果显示, 黑枸杞花青素、EGCG 均具有较强的自由基清除能力及铁离子还原能力, 两者的强体外抗氧化能力可能通过氢原子转移及电子转移机制实现。在细胞研究水平上, 黑枸杞花青素、EGCG 及其组合物能显著抑制 UVB 所引起的 HaCaT 细胞死亡, 提高受损细胞的生存率 ($P<0.05$), 且黑枸杞花青素、EGCG 的不同比例组合物处理的细胞生存率均优于单一物质的处理结果 ($P<0.05$), 按不同比例进行复配得到的细胞活性也存在明显差异, 而其中 6:4 比例组合物的保护作用最强, 在 200 $\mu\text{g/mL}$ 高浓度处理下使细胞存活率达到了 89.71%。结合 Isobologram 分析得出 BWA、EGCG 在 8:2 及 6:4 比例复配下对受损细胞具有协同保护作用, 其中 6:4 组合物协同性最强, 协同率达到 17.08%。此外, 黑

枸杞花青素、EGCG 及其 6:4 比例组合物不仅能够显著提高受损细胞中 CAT、SOD 和 GPX 的酶活性, 同时还显著抑制模型细胞中氧化毒性物质 MDA 的生成。综上可知, 黑枸杞花青素、EGCG 及其比例组合物可减轻 UVB 对 HaCaT 细胞的氧化损伤, 且复配后物质对细胞氧化损伤保护作用更强, 说明黑枸杞花青素、EGCG 对氧化损伤的细胞具有协同保护作用, 而其中增强细胞内源性抗氧化物酶的活性可能是黑枸杞花青素、EGCG 及其组合物抑制 UVB 诱导的氧化应激损伤的潜在机制之一。

该研究可为黑枸杞花青素与 EGCG 组合物在营养健康产品及防晒化妆品的开发和应用方面提供实验支持。在今后的研究中, 应从黑枸杞花青素及 EGCG 组合物的协同抗氧化机制出发, 对其具体抗氧化信号通路及对其中关键蛋白表达的影响方面进行研究, 进一步探讨其保护细胞氧化应激损伤的机制。

参考文献

- [1] GAO Q C, SONG Y B, LIANG Y, et al. Dynamics of physicochemical properties, functional compounds and antioxidant capacity during spontaneous fermentation of *Lycium ruthenicum* Murr. (Qinghai-Tibet Plateau) natural vinegar [J]. Foods, 2022, 11(9): 1344.
- [2] 段雅彬,姚星辰,陈湘宏,等.黑果枸杞对辐射损伤小鼠造血系统的保护作用[J].中药材,2015,38(6):1242-1246.
- [3] 王梦杰,李玉林,刘嘉华,等.青藏高原黑果枸杞花青素对人肝癌细胞增殖和自噬的影响[J].天然产物研究与开发,2021,33(1):79-88.
- [4] 姜秋香,唐礼荣,张辉,等.表没食子儿茶素没食子酸酯的化学修饰及生物活性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(23):7496-7506.
- [5] LAI W F, BAIG MMFA, WONG W T, et al. Epigallocatechin-3-gallate in functional food development: from concept to reality [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 102: 271-279.
- [6] CHEN C N, CHANG K C, LIN R F, et al. Nitric oxide pathway activity modulation alters the protective effects of (-) Epigallocatechin-3-gallate on reserpine-induced impairment in rats [J]. Behavioural Brain Research, 2016, 305: 198-211.
- [7] 苟惠,陈平,耿瑞蔓,等.天然产物EGCG作为肿瘤辅助治疗药物的分子机制及其应用研究进展[J].生命科学,2022,34(9):1190-1198.
- [8] 刘聪,吴贵帅,普瑞,等.EGCG通过抑制TGF- β 1/Smads信号通路改善高脂高糖饮食诱导的肥胖大鼠心肌纤维化[J].昆明医科大学学报,2022,43(5):18-26.
- [9] 张姝萍.EGCG、葡萄籽原花青素与二氢杨梅素协同抗

- 氧化及对小鼠乳腺癌4T1细胞的协同抑制作用研究[D]. 杭州:浙江大学,2019.
- [10] 陈敏,周金凤,韦崇万,等.白藜芦醇和EGCG联用对小鼠骨骼肌抗氧化能力的影响[J].南方农业学报,2022,53(9): 2683-2690.
- [11] LUI K H, ZHAO H B, SUN J Q, et al. Analysis of the expression profile of miRNAs related to skin photoaging in the GEO database [J]. Chinese Journal of Plastic and Reconstructive Surgery, 2023, 5(2): 53-59.
- [12] 李响欣,燕华玲,余亚利,等.柴达木黑果枸杞花青素减轻中波紫外线辐射后人皮肤成纤维细胞氧化及炎症损伤的研究[J].西部医学,2023,35(4):501-505.
- [13] ZHANG J J, LIU X, ZHAO Q, et al. Brown black wolfberry on the life-span of UV damaged *Drosophila melanogaster* and its anti-oxidation activities [J]. China Food Additives, 2020, 1: 53-58.
- [14] 林向飞,闵玮,朱晓芳,等.EGCG对中波紫外线辐射后原代人角质形成细胞中光产物产生和清除的影响[J].中国美容医学,2012,21(15):1967-1971.
- [15] 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,2015,6(4):1224-1228.
- [16] 郝晓丽.七种抗氧化剂单一抗氧化活性及其协同作用的研究[D].青岛:青岛大学,2002.
- [17] LIU W, YU Y, YANG R, et al. Optimization of total flavonoid compound extraction from gynura medica leaf using response surface methodology and chemical composition analysis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2010, 11(11): 4750-4763.
- [18] WANG K, XU W Y, TANG X L, et al. Study on the *in vitro* antioxidant activity of different varieties of *Eucommia ulmoides* leaves [J]. China Food Additives, 2021, 32(8): 115-124.
- [19] BENZIE I F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. Analytical Biochemistry, 1996, 239(1): 70-76.
- [20] 董丽红,罗牡康,张名位,等.荔枝果壳原花青素对中波紫外线诱导HaCaT细胞氧化损伤的保护作用[J].食品科学,2022,43(21):233-240.
- [21] EMILIE E, JERME C, JEAN-MICHEL L, et al. The combination of opioid and neurotensin receptor agonists improves their analgesic/adverse effect ratio [J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 848: 80-87.
- [22] LI X, HAN W, MAI W, et al. Antioxidant activity and mechanism of tetrahydroxylflavone *in vitro* [J]. Natural Product Communications, 2013, 8(6): 787-789.
- [23] 谢虹,罗志聪,李熙灿.茶黄素抗氧化化学机制研究[J].食品与机械,2018,34(3):23-26.
- [24] GUO X Y, GU J, CHEN F, et al. Study on antioxidant activity and mechanism of traditional Chinese medicine by methyl violet spectrophotometry [J]. Chemical Engineer, 2021, 35(9): 73-76.
- [25] 加杨娥,任立余,燕华玲.黑枸杞水提物对中波紫外线辐射后人角质形成细胞增殖与凋亡及凋亡相关蛋白表达水平的影响研究[J].中国全科医学,2017,20(27):3400-3404.
- [26] 宋家乐,钱波,王程强,等.紫萼蓉乙醇提物对Caco-2细胞氧化损伤的保护作用[J].现代食品科技,2018,34(6):32-38.
- [27] BEDOYA-RAMÍREZ D, CILLA A, CONTRERAS-CALDERÓN J, et al. Evaluation of the antioxidant capacity, furan compounds and cytoprotective-cytotoxic effects upon Caco-2 cells of commercial Colombian coffee [J]. Food Chemistry, 2017, 219(1): 364-372.
- [28] MAGDALENA K, KATARZYNA P G, ALICJA J, et al. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes [J]. Journal of Muscle Research & Cell Motility, 2016, 36(6): 1-17.
- [29] TAKEBE G, YARIMIZU J, SAITO Y, et al. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(43): 41254-41258.