

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

张素慧^{1①}, 吕俊华², 李校³, 郑青³

(¹上海市药品检验所, 上海 200233; ²暨南大学药学院 广州 510632; ³暨南大学医药生物技术研究开发中心, 广州 510632)

【摘要】 目的: 研究茶多酚、茶色素对紫外线照射致小鼠皮肤光老化的防护作用。方法: 光镜下观察茶多酚、茶色素对真皮弹性纤维的影响; 通过嵌套 PCR 检测皮肤组织线粒体 DNA (mtDNA) 的缺失突变。结果: 茶多酚、茶色素组的弹性纤维断裂、卷曲的程度较模型组轻, 且 mtDNA 的缺失突变也无模型组严重。结论: 茶多酚、茶色素能改善光老化模型小鼠真皮弹性纤维的病变, 两者可不同程度地缓解小鼠皮肤组织 mtDNA 的缺失突变。在延缓皮肤光老化作用茶色素与茶多酚无显著差别。

【关键词】 茶多酚; 茶色素; 紫外线; 弹性纤维; 线粒体 DNA; 防护作用

【中图分类号】 R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)06-0561-04

紫外线照射可引起人体皮肤组织的光老化^[1]。茶多酚是绿茶的主要活性成份, 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重最大, 占多酚类总量的 80%, 通常把黄烷醇类称为儿茶素^[2]。茶色素是红茶的主要活性成份, 它主要是由儿茶素经多酚氧化酶与过氧化物酶的作用, 氧化并聚合而生成的^[2]。以往的实验证实茶多酚、茶色素均具有抗氧化作用^[3,4]。然而有研究者认为后者的抗氧化性不及前者。本研究利用紫外线模拟日光诱发小鼠皮肤光老化模型来观察灌胃或外涂茶多酚、茶色素对小鼠真皮弹性纤维及皮肤组织 mtDNA 的缺失突变的影响; 比较两者抗紫外线损伤作用的强弱。

1 材 料

1.1 动 物

雌性断乳昆明小白鼠(合格证号: 医动字第 26-2001A009)由广东省医学实验动物中心提供, 4 周龄, 平均体重 18 ± 2 g。动物在温度为 24 ± 1 °C 和相对湿度为 (60 \pm 10)% 的条件下饲养, 饲以动物中心提供的颗粒饲料。

1.2 光 源

紫外灯管(北京电光源研究所制造), 6 根 UVA 和 1 根 UVB, 每根 40 W。UVA 和 UVB 剂量用紫外线强度测定仪(北京师范大学光电研究所制造)测定。

1.3 药品与试剂

茶多酚(纯度 98%)、茶色素(纯度约 30%)均由我国农业科学院茶叶科学研究所提供。蛋白酶 K 购自德国 Merck 公司; Taq DNA 聚合酶、dNTP、mtDNA 引物购自上海 Sangon 公司; Marker (#SM0241-10) 购自美国 MBI 公司。

1.4 仪 器

RM2135 型切片机(德国 LEICA 公司); Olympus BH-2 型光学显微镜(日本 Olympus 公司); GeneAmp PCR System 9600(美国 Perkin Elmer 公司); Tiger Gel 凝胶图象分析仪(重庆大学 SCI 研究所); DY-3D 型多功能电泳仪(江苏兴化分析仪器厂); ZF 型紫外透射反射分析仪(上海嘉定康华生化仪器制造厂)。

2 方 法

2.1 小鼠实验性光老化模型的建立

参考 Ian R. Record 等的方法^[5-7]。各组小鼠称重, 做标记, 全价颗粒饲料喂养一周。除对照组外其余各组小鼠将背部毛发剃干净, 面积 $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 。将小鼠置于荧光紫外灯下(UVA+UVB, 模拟日光)照射, 照射距离 100 cm。每天照射 15 min, 连续照射 12 周, UVB(280~320 nm)累积照射剂量是 $1.8 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$, UVA(320~400 nm)累积照射剂量是 $1.2 \times 10^{-4} \text{ W/cm}^2$, 造模完成。

2.2 动物分组

110 只小鼠随机分为 11 组, 10 只/组, 按给药

途径分为灌胃与外涂两部分: I 组: 对照组(即正常小鼠组); II 组: 蒸馏水(ig)组(模型组); III~V 组: 茶多酚(ig)高剂量(192 mg/kg)、中剂量(96 mg/kg)、低剂量(48 mg/kg)组; VI~VII 组: 茶色素(ig)高剂量(625 mg/kg)、中剂量(312.5 mg/kg)、低剂量(156.25 mg/kg)组。IX 组: 外涂蒸馏水组(模型组); X 组: 外涂 5% 茶多酚水溶液组; XI 组: 外涂 5% 茶色素水溶液组。

2.3 动物处理

对照组: 小鼠饲全价颗粒饲料, 饮清洁自来水。灌胃组小鼠在实验第 2 周开始预防性 ig 2 wk, 第 4 周开始进行紫外线照射, 照射前 30 min ig 1 次, 直至实验结束。外涂组小鼠在实验第 2 周开始照射, 照射前 5 min 在背部外涂受试物 1 次(约 6.25 mg/cm²), 直至实验结束。分别于实验第 13 周末、15 周末断脊处死外涂组和灌胃组小鼠, 取背部皮肤组织以测定指标。

2.4 指标测定

2.4.1 皮肤组织病理切片的制作 颈椎脱臼法处死小鼠, 取每组小鼠背部受照皮肤, 置于 10% 福尔马林溶液中固定 48 h 以上, 脱水, 石蜡包埋, 切片(每个样本切片 4~6 张), 间苯二酚品红法染色和树脂封片。

2.4.2 皮肤组织 mtDNA 缺失突变的检测 先用酚-氯仿抽提法提取皮肤组织 DNA, 抽提出的 DNA 放 4℃ 保存 24 h。在小鼠 mtDNA 基因第 5 外显子上设计两对引物^[8], 引物序列如下: F2, taattcaagccatgtatc(8549~8568); F3, caagtccatgaccattaactgg(8644~8665); R1, gggatgttttaggcttgg(13364~13383); R2, gatttatgggtgtatgcg(13338~13357), 进行 Nested PCR 扩增; PCR 反应总体积为 50 μl, 包括上游引物 F2 和下游引物 R1 各 3 μl(20 μmol/L), dNTP 为 4 μl(2.5 μm), 10× 缓冲液 5 μl, 模板 DNA 5 μl(0.5~1.0 μg)。反应条件: 94℃ 预变性 4 min, 80℃ 加酶(加Taq 酶 2~3 μ); 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 循环 30 次; 72℃ 4 min; 最后 4℃ 保存。取初次 PCR 扩增产物 5 μl 作为 2 次 PCR 反应的模板 DNA, 引物改为上游引物 F3 和下游引物 R2 各 3 μl(20 μmol/L), 其余各反应成分与初次 PCR 扩增体系相同。取二次 PCR 扩增产物 12 μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μg/ml)中电泳 30 min(电压 160 V, 70 mA), 紫外灯下观察电泳结果, 可见

特异性扩增片段。

3 实验结果

3.1 皮肤组织切片观察

在光镜(×400)下观察真皮弹性纤维的病理学改变: 对照组小鼠真皮层可见波浪状弹性纤维, 纤维无卷曲扭结、聚集成团。模型组小鼠的弹性纤维发生变性、破坏乃至消失, 纤维呈嗜碱性变、无定形、颗粒状, 出现断裂、破碎, 变粗、卷曲扭结、聚集成团, 甚至消失; 说明本实验成功建立了小鼠皮肤光老化模型, 同时也说明长期紫外线照射可加速皮肤老化。ig 组小鼠真皮层可见波浪状弹性纤维, 纤维少见断裂、破碎, 卷曲扭结、聚集成团, 与模型组比较有所改善; 其中茶多酚或茶色素高剂量组的弹性纤维受损程度较各自的中、低剂量组轻, 而中、低剂量组之间无显著差别。外涂组小鼠真皮层可见完整的波浪状弹性纤维, 少见断裂、破碎, 未出现卷曲扭结, 与模型组比较有明显改善; 充分说明茶多酚与茶色素的应用(ig 或外涂)能有效地改善小鼠皮肤弹性纤维的病变, 延缓皮肤的光老化。另观察到茶多酚、茶色素无论 ig 或外涂给药, 两者之间均无显著差别。

3.2 各组小鼠皮肤组织 mtDNA 的缺失突变

小鼠线粒体基因缺失的鉴定: 在小鼠皮肤标本中, 采用单纯随机抽样的方法, 每组分别随机抽取 6 例标本进行鉴定, 结果见图 1 和图 2: 对各组小鼠皮肤标本的 mtDNA 进行扩增, 其扩增产物的琼脂糖凝胶分析结果均显示标本的基因有缺失, 且 mtDNA 突变率接近 100%。对照组可见两条 mtDNA 条带; 模型组可见四条 mtDNA 条带, 说明在紫外线的照射下, 小鼠皮肤组织中的 mtDNA 的缺失突变程度增加。灌胃茶多酚或茶色素组与外涂茶多酚组均是三条 mtDNA 条带, 外涂茶色素组可见两条 mtDNA 条带, 都比模型组的条带少, 说明在茶多酚、茶色素的作用下, 小鼠线粒体 DNA 的缺失突变有所缓解。参照 Marker, 所有 PCR 产物长度在 100~400 bp 之间。

4 讨论

UVA 主要作用于真皮, 实验结果提示, 模拟日光照射可损伤真皮弹性纤维, 同时, 应用茶多酚、茶色素可有效地改善小鼠皮肤弹性纤维的受损, 茶色

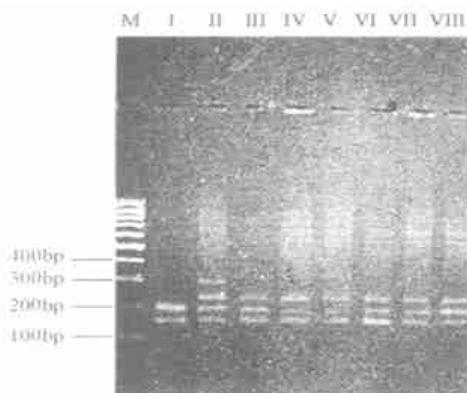


Fig 1 Results of mtDNA deletion mutagenesis of mice skin administrated by gavage

M. Marker; I . Control group; II . model group; III ~ V. Tea polyphenols administered by gavage at high, media, low dose; VI ~ VIII. Tea pigments administered by gavage at high, media, low dose

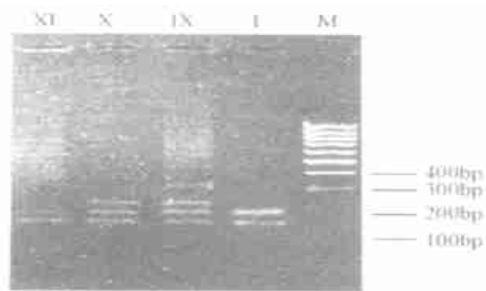


Fig 2 Results of mtDNA deletion mutagenesis of mice skin administrated topically.

M. Marker; I . Control group; IX. Model group; X. 5% Tea polyphenols administered topically; XI. 5% Tea pigments administered topically
素的作用与茶多酚相似, 两者均对受损的弹性纤维表现出一定程度的保护作用。

mtDNA 体细胞系突变与人类衰老及退行性变化有密切关系^[9~11]。最近研究表明, 在人类皮肤中, mtDNA 突变的发生率与年龄无关, 而与皮肤的光老化程度密切相关^[12]。有学者针对小鼠心、脑、肾组织 mtDNA 的缺失突变进行研究, 发现 989, 846, 476 bp 是最常见的 mtDNA 缺失产物长度, 111, 337, 658, 753, 1251bp 则不如前面三种长度常见^[8]。本实验结果显示: 光老化模型小鼠皮肤组织 mtDNA 缺失产物长度集中在 100 bp ~ 400 bp 之间, 其中包括 111 和 337 bp 这两种长度, 其余基因片段的长度需进一步研究确定。但是无论基因片段长度如何, 模型组的 mtDNA 的缺失突变明显较对照组严重, 说明紫外线照射促进了小鼠皮肤组织 mtDNA 的缺失突变, 主要原因可能是紫外线诱发活性氧自由基

(reactive oxygen species, ROS) 的产生, ROS 在体内的堆积造成线粒体 DNA 的损伤, 最终导致组织功能的不可逆性改变^[8]。

实验结果还表明茶多酚或茶色素作用组 mtDNA 的缺失突变不及模型组严重。可能是因为茶多酚、茶色素是一类氧化还原电位较低的还原剂, 能提供氢质子与紫外线照射产生的 ROS 结合来消除体内过量自由基, 避免生物大分子的损伤^[13]; 茶多酚、茶色素可通过提高 T-AOC、SOD 活性来清除大量 ROS; 脂质过氧化进程中可产生多种具有中等反应活性的脂自由基 L^{\cdot} 、 LO^{\cdot} 、 LOO^{\cdot} , 易穿透并扩散进入细胞核, 直接攻击 DNA 或 RNA, 引起 DNA 突变, 由于 mtDNA 具有半自主性的特点, 它还受细胞核 DNA 的调控, 所以细胞核 DNA 的突变也会引起线粒体 DNA 的相应改变, 以往的实验已经证实茶多酚、茶色素具有明显的抗脂质过氧化的作用, 故茶多酚、茶色素的应用使小鼠皮肤线粒体基因暴露在一个相对较小剂量 ROS 的环境中, 从而缓解了基因缺失引起的 DNA 突变。

此外, 灌胃用药组、外涂茶多酚组对 mtDNA 缺失突变的缓解程度不及外涂茶色素组, 提示茶色素对模拟日光照射引起的慢性皮肤损伤的防治作用与茶多酚相似, 且可能更强。综合形态学观察, 故茶色素的抗紫外线损伤作用与茶多酚一致。

对紫外线的防护主要是屏蔽防护, 也曾有人用内服药来防护 UV 对皮肤的作用^[14]。本实验提示茶多酚、茶色素通过内服或外涂两种作用方式均可达到有效的皮肤防护作用。但内服及外涂剂量及作用机制仍有待深入研究。外用遮光剂可以防止或减轻紫外线照射对皮肤的损伤和防止受损皮肤进一步损伤, 并有利于修复^[15~17]。目前市售的复合性遮光剂缺少对 UVA 防护功能, 长期暴露于日光下, 有可能扩大日光损伤作用, 甚至导致皮肤恶性肿瘤的发生^[18]。

参 考 文 献

- [1] Jurkiewicz BA, Buettner GR. EPR detection of free radicals in UV-irradiated skin: mouse versus human [J]. *Photochem Photobiol*, 1996, 64(6): 918~922.
- [2] Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry [J]. *Prev Med*, 1992, 21(3): 334~350.
- [3] Wei H, Zhang X, Zhao JF, et al. Scavenging of hydrogen peroxide and inhibition of ultraviolet light-induced oxidative DNA damage by

- aqueous extracts from green and black teas[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, **26**(11-12): 1427-1435.
- [4] Hasaniya N, Youn K, Xu M, et al. Inhibitory activity of green and black tea in a free radical-generating system using 2-amino-3-methylimidazol-4,5-f quinoline as substrate[J]. *Japanese Journal of Cancer Research*, 1997, **88**(6): 553-558.
- [5] Record IR, Dreosti IE. Protection by black tea and green tea against UVB and UVA+B induced skin cancer in hairless mice[J]. *Mutation Research*, 1998, **422**: 191-199.
- [6] Record IR, Dreosti IE. Protection by against UVA+B-induced skin cancers in hairless mice[J]. *Nutrition and Cancer*, 1998, **32**(2): 71-75.
- [7] Ichihashi M, Ahmed NU, Budiyanto A, et al. Prevention effect of antioxidant on ultraviolet-induced skin cancer in mice[J]. *Journal of Dermatological Science*, 2000, **23**(1): S45-S50.
- [8] Endi Wang Alvar Wong Gino Cortopassi. The rate of mitochondrial mutagenesis is faster in mice than humans[J]. *Mutation Research*, 1997, **377**: 157-166.
- [9] Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(2): 514-519.
- [10] Morales A, Miranda M, Sonchez Reyes A, et al. Oxidative damage of mitochondrial and nuclear DNA induced by ionizing radiation in human hepatoblastoma cells[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, **42**(1): 191-203.
- [11] Lenaz G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1366**(1-2): 53-67.
- [12] Birch-Machin MA, Tindall M, Turner R, et al. Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging [J]. *J Invest Dermatol*, 1998, **110**(2): 149-152.
- [13] 杨贤强(Yang XQ), 沈生荣(Shen SR), 候京武(Hou JW), 等. (-)表没食子儿茶素没食子酸脂对活性氧自由基的消除作用 [J]. 中国药理学报(Acta Pharmacol Sin). 1994, **15**(4): 350-353.
- [14] 高玉祥(Gao YX), 朱一元(Zhu YY). 防光的现状[J]. 国外医学·皮肤性病学分册, 1997, **23**(4): 232-234.
- [15] Kligman LH, Kligman AM. The nature of photoaging: its prevention and repair[J]. *Photodermatol*, 1986, **3**(4): 215-227.
- [16] Kligman LH. Photoaging, manifestations, prevention and treatment [J]. *Dermatol Clin*, 1986, **4**(3): 517-528.
- [17] Kligman LH. The ultraviolet-irradiated hairless mouse: a model for photoaging. *J Am Acad Dermatol*, 1989, **21**(3 Pt 2): 623-631.
- [18] Dobak J, Liu FT. Sunscreens, UVA and cutaneous malignancy: adding fuel to the fire[J]. *Int J Dermatol*, 1992, **31**(8): 544-588.

Preventive and Curative Effect of Tea Polyphenols and Tea Pigments on Mice Skin Photoaging Induced by Ultraviolet Irradiation

ZHANG Su-Hui¹, LU Jun-Hua², LI Xiao-Kun³, ZHENG Qing³

¹Shanghai Institute for Drug Control, Shanghai 200233;

²Pharmacology Department, School of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632;

³Biopharmaceutical R&D Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China

【ABSTRACT】 AIM: To study the effect of tea polyphenols and tea pigments on the mice irradiated with ultraviolet rays. METHOD: The morphologic alteration of elastic fibers of dermis was observed. Using a nested PCR method to detect mitochondrial DNA mutagenesis. RESULT: Few broken, convolute, amorphous elastic fibers were observed in the groups treated with tea polyphenols and tea pigments, and some wavy elastic fibers were also observed. The mtDNA deletion mutagenesis in the groups treated with tea polyphenols and tea pigments occurred less frequently than that of model group. CONCLUSION: In the present study both tea polyphenols and tea pigments could ameliorate lesions of elastic fibers of dermis and remiss mtDNA deletion mutagenesis of murine skin. These results suggested that tea pigments and tea polyphenols had similar preventive and curative effects on skin photoaging of mice induced by UV irradiation.

【KEY WORDS】 Tea polyphenols; Tea pigments; Ultraviolet; Elastic fiber; Mitochondrial DNA; Prevention