

鸚鵡茶多酚提取物緩解D-半乳糖誘導HaCaT細胞的衰老

陈淥, 王胤翊, 郝可欣, 钟瑞芳, 姜建国*
(华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510640)

摘要: 为探究鸚鵡茶多酚的抗衰老作用, 该研究考察了其纯化组分 PT-1、PT-2 和 PT-3 对 D-半乳糖诱导的 HaCaT 细胞衰老的影响及机制。采用加热回流提取和 HPD600 大孔树脂纯化获得三种多酚组分, 通过建立 D-半乳糖诱导的细胞衰老模型, 检测细胞活力、SOD、CAT 活力和 MDA 含量等指标, 并对 PT-1 进行 ROS 水平、细胞凋亡和基因表达分析。结果显示, 100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的三种组分均能显著改善衰老表型, 其中 PT-1 效果最佳: 在造模条件下, 使细胞活力最高提升 61.79%, SOD 活力提升 22.26 倍, CAT 活力恢复至 $28.62\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$, MDA 含量降低 67.59%, ROS 水平降低 50.25%, 细胞凋亡水平降低 45.7%。分子机制研究表明, PT-1 可上调 SOD 和 CAT 基因表达 10.61 倍和 9.53 倍, 同时下调 *Bax*、*Caspase-9* 和 *Caspase-3* 表达 52.32%、50.52% 和 41.42%, 并抑制 *P53*、*P21*、*PI6* 表达 44.05%、52.18% 和 68.33%。结果表明鸚鵡茶多酚特别是 PT-1 能通过调控氧化应激、细胞周期和凋亡通路等多途径发挥抗衰老作用, 为开发相关抗衰老产品提供了科学依据。

关键词: 鸚鵡茶; 多酚; D-半乳糖; HaCaT 细胞; 衰老模型
文章编号: 1673-9078(2026)07-1-10 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.7.0580

Partridge Tea Polyphenol Extracts Attenuate D-Galactose-induced Aging in HaCaT Cells

CHEN Lu, WANG Yinhong, HAO Kexin, ZHONG Ruifang, JIANG Jianguo*
(College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The anti-aging effects of partridge tea polyphenols were investigated by examining the protective mechanisms of its purified components (PT-1, PT-2, and PT-3) against D-galactose-induced senescence in HaCaT cells. Three polyphenol fractions were obtained through heat reflux extraction followed by purification with HPD600 macroporous resin. A cell senescence model was established, through which cell viability, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities, and MDA content were measured, with additional analyses of reactive oxygen species (ROS) levels, apoptosis, and gene expression performed specifically for PT-1. Significant amelioration of senescent phenotypes was observed for all three fractions (100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), among which PT-1 was found to exhibit the most pronounced effects. Under modeled conditions, cell viability increased by up to 61.79%, SOD activity increased by 22.26-fold, and CAT activity was restored to $28.62\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$, with concurrent reductions observed in MDA content (67.59%), ROS levels (50.25%), and apoptosis rate (45.7%). In terms of molecular mechanisms, PT-1 was found to upregulate SOD and CAT expression by 10.61- and 9.53-fold, respectively, while also downregulating *Bax*, *Caspase-9*, and *Caspase-3* expression by 52.32%, 50.52%, and 41.42%, respectively. Significant suppression was also observed in *P53* (44.05%),

引文格式:
陈淥,王胤翊,郝可欣,等.鸚鵡茶多酚提取物緩解D-半乳糖誘導HaCaT細胞的衰老[J].现代食品科技,2026,42(7):1-10.
CHEN Lu, WANG Yinhong, HAO Kexin, et al. Partridge tea polyphenol extracts attenuate D-galactose-induced aging in HaCaT cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(7): 1-10.

收稿日期: 2025-04-25 ; 修回日期: 2025-07-21 ; 接受日期: 2025-07-28
基金项目: 国家自然科学基金项目 (32372286)
作者简介: 陈淥 (2000-), 女, 硕士, 研究方向: 天然产物与食品营养, E-mail : 1663478328@qq.com
通讯作者: 姜建国 (1964-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 天然产物与食品营养、微藻代谢工程, E-mail : johnjg@scut.edu.cn

P21 (52.18%), and *P16* (68.33%) expression. These findings indicate that partridge tea polyphenols, particularly PT-1, can exert anti-aging effects by coordinating the modulation of oxidative stress and cell cycle and apoptotic pathways, thereby providing a scientific basis for developing anti-aging therapeutics.

Key words: partridge tea; polyphenol; D-galactose; HaCaT cells; aging model

茶叶中的多酚类物质（黄烷醇类、酮类、酚酸类等）占茶叶总质量的 15%~30%，其显著的抗氧化和抗菌活性使其在护肤品和口腔护理产品中得到广泛应用^[1]。近年来，茶叶的抗衰老活性研究已成为生命科学和食品营养领域的热点课题。柳叶刀子刊研究（2023）追踪 1.3 万人发现，每日饮用 3 杯茶（含 6~8 g 茶叶）可使生物年龄减速 20%^[2]。茶多酚通过多途径发挥抗衰老作用：首先，其酚羟基结构能有效清除自由基，阻断脂质过氧化过程。EGCG（表没食子儿茶素没食子酸酯，Epigallocatechin Gallate）作为最具活性的成分，可通过抑制 MMP-1/3 活性减少胶原降解，延缓皮肤皱纹形成^[3]。其次，茶多酚能调控 AMPK/mTOR 和 SIRT1/PGC-1 α 等衰老相关通路，通过增加 AMPK 磷酸化、抑制 mTORC1 活性和诱导自噬来清除受损细胞器^[4]，如改善 1-甲基-4-苯基吡啶诱导的氧化应激发挥神经保护作用^[5]。最后，茶多酚还能通过降低肠道菌群中厚壁菌门与拟杆菌门的比值，增加理研菌科、布劳特氏菌属等有益菌丰度，促进短链脂肪酸合成，表现出优于其他植物多酚的益生特性^[6-8]。

鹧鸪茶（*Mallotus peltatus*）是海南特色药用植物，近年来在抗菌活性和食品开发等领域取得重要进展。异于其他茶叶的茶多酚成分，鹧鸪茶多酚的代表性成分为牡荆素。牡荆素能够通过调控 Nrf2、NF- κ B、COX-2 等通路，发挥抗衰老、抗氧化、免疫调节和认知功能改善等作用^[9-11]。有研究表明鹧鸪茶浸出物对超氧自由基、羟自由基和 DPPH 自由基的清除率可达 40% 以上^[12]，在 D-半乳糖诱导的衰老模型中能显著提高小鼠脑组织 SOD 和 GSH-px 活性（ $P < 0.01$ ）^[13]，并通过增强巨噬细胞吞噬功能等提升非特异性免疫能力^[14]。此外，鹧鸪茶提取物还能改善衰老小鼠的学习记忆能力^[15]。

基于现有研究，鹧鸪茶多酚的抗衰老机制有待进一步完善。本研究旨在深入探究鹧鸪茶多酚纯化物的抗衰老作用机制，为鹧鸪茶的深度开发提供科学依据。通过系统研究其抗氧化、抗炎及调控衰老相关信号通路的作用，有望开发出新型抗衰老制剂，为功能性食品和化妆品原料的开发提供新选择。

1 材料与方法

1.1 实验材料、试剂与仪器

本实验所使用的鹧鸪茶叶子为 2021 年 10 月采集，产地为海南省定安县。

人角质形成细胞（HaCaT）为广州中医药大学朱伟研究员惠赠。PBS 缓冲液、基础培养基（DMEM）、胎牛血清（FBS）、胰蛋白酶-EDTA（1 $\times$ ）、双抗（青霉素/链霉素）溶液，均购于 Gibco（Thermo Fisher Scientific）。D-半乳糖，Sigma Aldrich 公司；超氧化歧化酶（SOD）活力测定试剂盒、过氧化氢酶（CAT）检测试剂盒、脂质氧化（MDA）检测试剂盒、ROS 试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒，均购于碧云天生物技术。RNA 提取试剂盒，逆转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒，EZBioscience 公司。

FA1104N 型电子分析天平，上海精密仪器仪表有限公司；101AB-2 型电热鼓风干燥箱，吴江德顺电热设备厂；TC-15 型套式恒温器，海宁市新华医疗器械厂；SY-2000 型旋转蒸发仪，上海亚荣生化仪器厂；SHZ-D III 型循环水式真空泵，上海越众仪器设备有限公司；Infinitepro2000 型多功能酶标仪，瑞士 Tecan 公司；WCI-180 型二氧化碳培养箱，上海朗喜工业科技有限公司；HR30-IIA2 型生物安全柜，青岛海尔生物医疗股份有限公司；IC-1000 型 Countstar 自动细胞计数仪，上海思默生物科技有限公司；DT5-3 型低速台式离心机，河北医众医疗器械有限公司；Nano Drop 2000C 型微量紫外可见分光光度计，Thermo Fisher Scientific 公司；NovoCyte Quanteon 型流式细胞仪，Agilent Technologies 有限公司；QuantStudio7 型实时荧光定量 PCR 仪，Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 鹧鸪茶多酚的提取纯化

将鹧鸪茶叶子自然晒干后，粉碎，于 50 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱烘干至恒重。向粉末加入 30 倍体积的体积分数 60% 乙醇（ $m/V=1:30$ ），在 85 $^{\circ}\text{C}$ 下加热回流 140 min，回收上清液，药渣继续重复上述加热步骤，合并两次提取液，减压浓缩至原来体积的 1/10，冻干后得到鹧鸪茶多酚

粗提物 PTP。随后使用大孔树脂 HPD600 对多酚粗提物进行纯化,分别用体积分数为 30%、50% 和 70% 的乙醇洗脱得到三个纯化组分,命名为 PT-1、PT-2 和 PT-3,4 °C 冰箱保存以备用。

1.2.2 细胞培养

完全培养基的配置:按照体积分数将体积分数 95% 的 DMEM,体积分数 4.5% 的 FBS 和体积分数 0.5% 的双抗溶液混合配置成完全培养基。将 HaCaT 细胞接种于含有完全培养基的细胞皿中,置于 37 °C,体积分数 5% 的 CO₂ 细胞培养箱中培养,待其达到生长对数期且融合率为 70%~80%,弃去原来的培养基,用 PBS 清洗一次,使用胰蛋白酶消化细胞,离心后将细胞接种回新鲜的完全培养基中,以完成传代。

1.2.3 样品安全浓度的筛选及 D-半乳糖造模浓度的确定

待细胞的融合率为 70%~80% 时,将细胞以 1×10^4 的密度接种于 96 板中(每孔 100 μL),置于 37 °C,体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后,弃去原来的培养基,分别加入终浓度为不同质量浓度的 PT-1、PT-2、PT-3 和 D-半乳糖,其中完全培养基为正常对照组,继续置于细胞培养箱中培养 24 h,弃去原来的培养基,参照文献方法^[6],每孔加入 100 μL 的体积分数 5% MTT 溶液,培养箱中孵育 4 h 后,弃去 MTT 溶液,每孔加入 150 μL 的 DMSO 溶液,震荡摇匀后,酶标仪下 490 nm 测定其吸光值。细胞活力(CV, Cell Viability)按以下公式计算。

$$B = \frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B ——细胞活力(CV), %;

A_{sample} ——样品组在 490 nm 下的吸光值;

A_{blank} ——空白组在 490 nm 下的吸光值。

1.2.4 SOD, CAT 和 MDA 的测定

参考文献的方法^[17],待细胞的融合率为 70%~80% 时,将细胞以 2×10^5 的密度接种于 6 板中(每孔 1 500 μL),置于 37 °C,体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养 24 h 后,弃去原来的培养基,加入含有最终质量浓度为 100、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品和终浓度为 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 D-半乳糖的完全培养基,培养箱培养 24 h 后,弃去原来的培养基,每孔使用 1 000 μL PBS 清洗一遍,再加入 200 μL 胰酶将细胞消化,离心后留细胞沉淀并收集至 1.5 mL 离心管,按照碧云天 SOD, CAT 和 MDA 试剂盒说明书对细胞氧化还原系统的相

关酶活和产物进行测定。

1.2.5 ROS 水平测定

根据 1.2.4 的细胞处理方法,收集细胞至 1.5 mL 离心管,离心后得细胞沉淀,按照碧云天 ROS 试剂盒说明书,往沉淀中加入 DCFH-DA 荧光探针,避光孵育 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min,每隔 3~5 min 颠倒混匀一下,使探针和细胞充分接触。使用 PBS 溶液洗涤细胞三次,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,随后使用流式细胞仪对细胞荧光强度进行检测。

1.2.6 细胞凋亡水平测定

根据 1.2.4 的细胞处理方法,收集细胞至 1.5 mL 离心管,按照碧云天 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,使用 195 μL Annexin V-FITC 结合液轻轻重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀,再加入 10 μL 碘化丙啶染色液,轻轻吹匀后,室温(20~25 °C)避光孵育 10~20 min,随后置于冰浴中,使用流式细胞仪对细胞的凋亡情况进行检测。

1.2.7 RT-qPCR 分析

RNA 提取:根据 1.2.4 的细胞处理方法,按照 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞的 RNA,使用 Nano Drop 2000C 型微量紫外可见分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,其中,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 代表 RNA 的纯度,其比值范围应在 1.8~2.1 之间,如果 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值小于 1.8,表明所提 RNA 中含有过多的杂蛋白,将会对后面的扩增实验结果有干扰。如果 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大于 2.2,表明所提 RNA 样品发生了部分降解。测得的 Total RNA 浓度如果太高,则 RNA 溶液需要用 DEPC 无酶水继续进行稀释,最佳质量浓度应为 100~200 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 之间。

RNA 逆转录:本实验采用 EZB 反转录试剂盒,反应体系为 20 μL ,按说明书,将各试剂置于冰上配制反应混合液,随后将其置于逆转录仪中按 42 °C 反应 15 min,95 °C 反应 30 s 的条件进行反应,得到相应的 cDNA。

RT-PCR 扩增反应:采用 RT-PCR 试剂盒,将各试剂置于冰上配制 PCR 反应体系,离心使反应混合液聚集至 384 孔板的底部。然后 384 孔板置于荧光定量 PCR (ABI ViiA 7) 扩增仪上进行反应,扩增完成后使用 Relative Quantification ($\Delta\Delta\text{Ct}$) Study 法进行数据自动分析以获得目的基因的相对表达量。引物根据 NCBI 中发布的基因序列,通过 PrimerExpress 软件设计,内参基因是 GAPDH,具体序列见表 1。

表 1 相关基因的引物序列	
Table 1 The primer sequences of related genes	
Genes	Primer sequences (5'-3')
GAPDH	Forward: CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT
	Reverse: AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC
P16	Forward: ACCAGAGGCAGTAACCATG
	Reverse: CCTGTAGGACCTTCGGTGAC
P21	Forward: TAGCAGCGGAACAAGGAG
	Reverse: AAACGGGAACCAAGGACAC
P53	Forward: TAGTGTGGTGGTGCCCTATG
	Reverse: CCAGTGTGATGATGGTGAGG
SOD	Forward: TGTGGCCGATGTGTCTATTG
	Reverse: GACTTCCAGCGTTTCCTGTC
CAT	Forward: TGTTGCTGGAGAATCGGGTTC
	Reverse: TCCCAGTTACCATCTTCTGTGTA
Bax	Forward: GGGACGAAGTGGACAGTAACA
	Reverse: TTGAGGAGTCTCACCCAACC
Caspase-3	Forward: CCTGGTTCATCCAGTCGCTT
	Reverse: TCTGTTGCCACCTTTCGGTT
Caspase-9	Forward: TTGGTGATGTCGGTGCTCTT
	Reverse: GGACTCACGGCAGAAGTCA

1.2.8 统计学方法

每个实验均设置三组平行，数据以平均数 ± 标准差（mean±SD）表示，实验结果以平均值 ± 标准偏差表示。采用 IBM SPSS Statistics 22.0 对数据进行 ANVOA 分析，LSD 与 Duncan 法对数据进行显著性检验， $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 为显著性检验标准，采用 Origin 2021 进行绘图。

2 结果与分析

2.1 D-半乳糖诱导细胞衰老模型条件的确定

分别用质量浓度为 50、100、200、400、800 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鸕鸕茶多酚提取物 PT-1、PT-2、PT-3 处理 HaCaT 细胞，进行样品安全浓度的筛选。如图 1a 所示，随着样品浓度的升高，细胞存活率呈下降趋势。在不同质量浓度梯度处理下，PT-1 处理的细胞存活率依次为 103.62%、94.76%、91.41%、82.43% 和 62.52%，PT-2 处理的结果显示存活率分别为 100.16%、98.16%、90.37%、88.11% 及 80.73%，而 PT-3 处理的细胞存活率数据为 95.06%、90.88%、84.96%、82.51% 以及 69.79%。基于以上结果，100~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度范围内的 PT-1、PT-2 和 PT-3 处理对细胞活力影响较小（变化幅度 $<20\%$ ），不会显著干扰实验结果的解读，由此确定 100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三个质量浓度梯度是测定鸕鸕

茶多酚提取物生物活性的最适浓度范围，后续的实验将以这三个浓度对 PT-1、PT-2 和 PT-3 进行分析。

分别用浓度为 100、200、300、400、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-半乳糖处理 HaCaT 细胞，用 MTT 法检测细胞存活率，根据细胞存活率确定 D-半乳糖造模浓度。根据图 1b 的实验结果，不同浓度 D-半乳糖对 HaCaT 细胞存活率的影响存在显著差异。其中，100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-半乳糖处理组的细胞存活率为 89.42%，表明低浓度处理对细胞活力影响较小；当浓度升高至 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，细胞存活率急剧下降至 29.08%，显示出明显的细胞毒性作用。值得注意的是，400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的细胞存活率为 54.89%，这一浓度既能诱导足够的细胞衰老效应，又保持了相对稳定的细胞存活状态，因此被选定为后续 HaCaT 细胞衰老模型构建的最佳处理浓度。

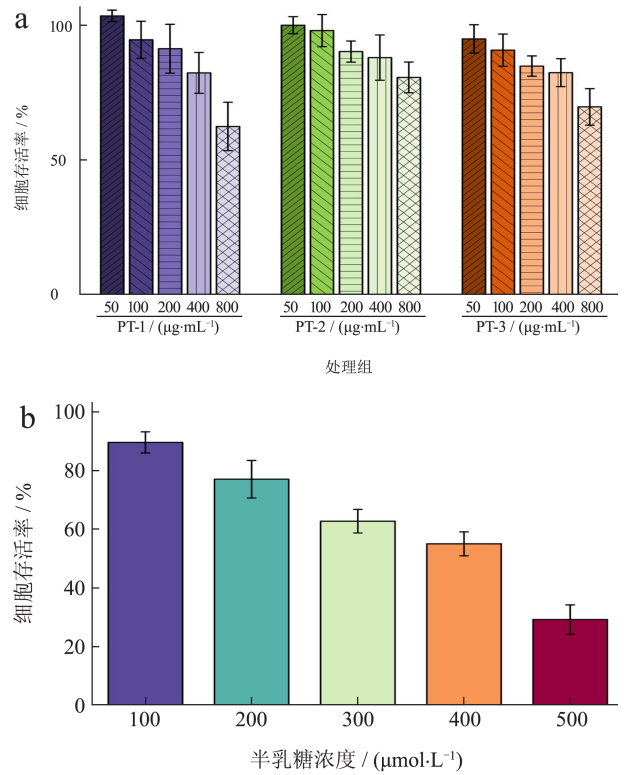


图 1 多酚提取物及 D-半乳糖用于细胞衰老模型的安全浓度

Fig. 1 Safe concentration of polyphenol extracts and D-galactose for cellular senescence model

注：a 为多酚提取物安全浓度的确定；b 为半乳糖诱导细胞衰老模型的浓度确定。

2.2 鸕鸕茶多酚提高HaCaT衰老细胞的增殖能力

增殖抑制是衰老的典型特征之一。茶多酚通常具有抑制癌细胞增殖、促进组织细胞增殖的活性，如通过灭活 PI3K/Akt 信号来抑制结肠癌细胞增殖^[18]、通过抗炎途径促进成骨细胞生成^[19]、通过耳蜗神经干细胞中的 PI3K/Akt 信号通路促进细胞生长和神经元分

化^[20]等。在 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-半乳糖造模条件下,用质量浓度为 100、200、 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PT-1、PT-2、PT-3 处理 HaCaT 细胞。如图 2 所示,经 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 D-半乳糖造模后,HaCaT 细胞增殖能力降低 57.28% ($P<0.01$),而在以上三种浓度下的 PT-1、PT-2、PT-3 处理能以剂量依赖方式使细胞增殖能力有显著回升 ($P<0.01$),三种样品依次最高回升 61.79%、49.40% 和 31.99%。其中,相同浓度下 PT-1 增强 HaCaT 衰老细胞增殖能力的作用最好,表明鸕鸕茶多酚提取物可能具有抵消衰老相关的增殖停滞的潜力。

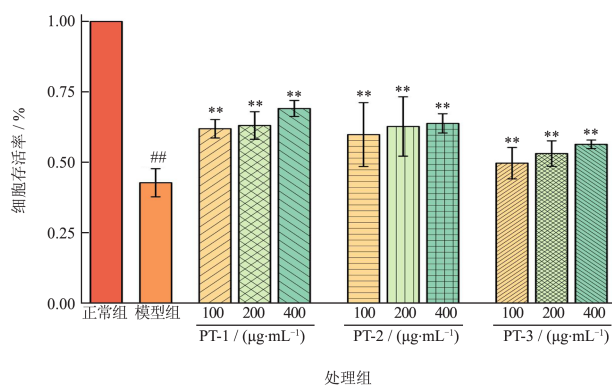


图 2 多酚提取物对 HaCaT 衰老细胞的增殖能力影响

Fig.2 The effect of polyphenol extracts on the proliferation of senescent HaCaT cells

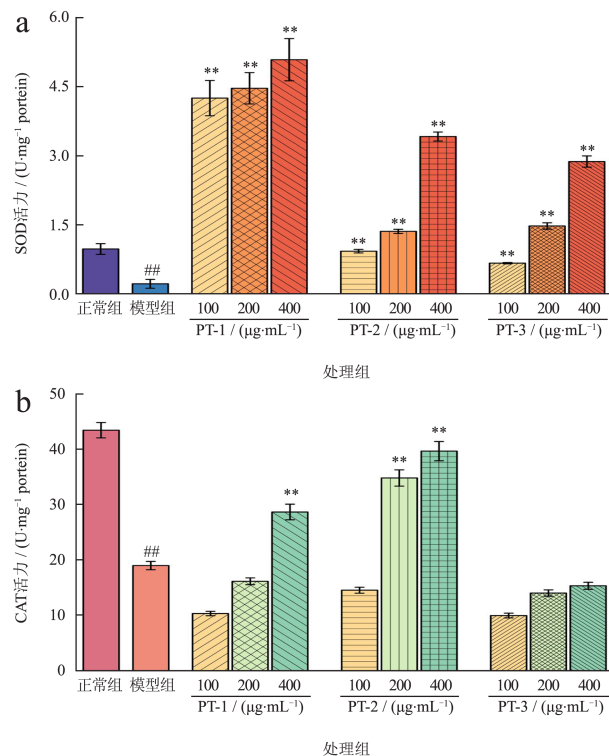
注:##表示当 $P<0.01$,和正常对照组相比有显著差异;
**表示当 $P<0.01$,和模型组相比有显著差异。

2.3 鸕鸕茶多酚增强 HaCaT 衰老细胞的氧化还原系统

不同浓度梯度 PT-1、PT-2、PT-3 处理 HaCaT 衰老细胞的 SOD, CAT 和 MDA 值如图 3a~3c 所示。其中, SOD (超氧化物歧化酶, Superoxide Dismutase) 通过催化超氧自由基的歧化反应维持氧化还原平衡,是抗衰老、抗炎和疾病防御的核心分子。CAT (过氧化氢酶, Catalase) 能够协同 SOD 分解歧化反应产生的过氧化氢,在氧化还原平衡中发挥重要作用。最后,MDA (丙二醛, Malondialdehyde) 是脂质过氧化的终产物,其含量可直接反映生物体内氧化应激水平和细胞膜损伤程度。实验结果显示,与正常对照组 (SOD 活力值为 $0.97\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$) 相比,模型组 SOD 活力显著降低了 77.56% ($P<0.01$) ($0.22\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$)。在给予 100、200、 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三种质量浓度的 PT-1、PT-2、PT-3 干预后,三种样品均表现出显著的剂量依赖性 SOD 活力提升效应 ($P<0.01$)。其中,PT-1 的干预效果最为显著,最高可提升 22.26 倍 ($5.08\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$); PT-2 和 PT-3 分别最高提升 14.63 倍 ($3.42\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$) 和 12.15 倍 ($2.87\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$)。同样,模型

组 ($18.95\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$) CAT 活力值较对照组 ($43.39\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$) 降低 56.32% ($P<0.01$),而质量浓度为 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PT-1、 $200\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 PT-2 处理组 CAT 活力值相较于模型组显著增高 ($P<0.01$),其 CAT 活力值分别为 28.62、34.76 和 $39.60\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$,分别提升 0.51、0.83 和 1.09 倍。模型组的 MDA 含量 ($10.00\ \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$) 较正常对照组 ($3.35\ \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$) 显著升高 ($P<0.01$),表明造模成功诱导了氧化应激损伤。经不同质量浓度 (100、200、 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 PT-1、PT-2 和 PT-3 干预后,各处理组的 MDA 水平均呈剂量依赖性降低趋势 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。其中,PT-1 的抑制作用最为显著,在最高浓度 ($400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 下使 MDA 含量降低 67.59% ($3.24\ \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$); PT-3 和 PT-2 分别使 MDA 含量降低 53.44% ($4.66\ \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$) 和 42.33% ($5.77\ \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\ \text{protein}$)。以上结果表明,三种多酚类物质能够增强 HaCaT 衰老细胞的氧化应激水平,且 PT-1 作用效果优于其他两种样品。

对比动物实验研究发现,绿茶茶多酚对衰老介导的老年小鼠肝脏、肾脏和大脑氧化还原失衡具有保护作用^[21,22]。而在 D-半乳糖诱导的小鼠衰老模型中,心、肝、脑组织以及血清中的 SOD 活性降低与 MDA 升高等趋势与细胞实验一致,而茶多酚干预可逆转这些指标^[23,24]。这一结果进一步支持了多酚类物质通过调控氧化应激通路发挥抗衰老作用的普适性,但细胞实验提示鸕鸕茶多酚 PT-1 在 D-半乳糖模型中展现出更强的剂量依赖性效应。基于以上结果,后续对 PT-1 进行深入研究。



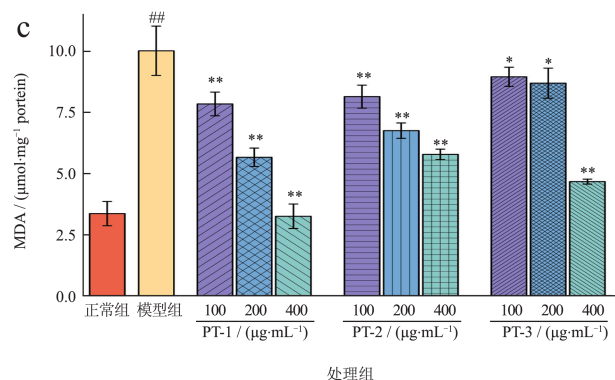


图3 多酚提取物对 HaCaT 衰老细胞的 SOD、CAT 和 MDA 的影响

Fig.3 The effect of polyphenol extracts on SOD, CAT, and MDA in senescent HaCaT cells

注: ## 表示当 $P < 0.01$, 和正常对照组相比有显著差异; * 表示当 $P < 0.05$ 有显著差异; ** 表示当 $P < 0.01$, 和模型组相比有显著差异。

活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 是一类含氧的化学活性分子, 包括超氧阴离子、过氧化氢、羟基自由基等, 主要由线粒体电子传递链泄漏的电子与氧气反应生成。正常生理状态下, ROS 参与细胞信号传导和免疫防御, 但过量积累会引发氧化应激, 加速衰老。ROS 对机体衰老的负面影响主要包括 DNA 损伤、线粒体功能障碍、凋亡激活、促进炎症性衰老等。有研究表明, 茶多酚能够增强 ROS 防御能力, 同时降低炎症反应, 发挥抗衰老和细胞保护作用^[25,26]。用质量浓度分别为 100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT-1 处理 D-半乳糖造模的 HaCaT 衰老细胞, 并设置正常对照组和模型组, 如图 4a、4b 所示, 结果表明各浓度 PT-1 均能降低 D-半乳糖造模导致的 HaCaT 细胞 ROS 水平升高, 且 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT-1 处理能够使 ROS 水平较造模组降低 50.25% ($P < 0.05$), 较正常组降低 39.05%。对比相关研究, 茶多酚在 UVA 损伤的 HSF 细胞中同样表现出 ROS 清除能力 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 即有效, $P < 0.05$)^[27], 同时茶多酚能有效地将 H_2O_2 诱导的 HepG2 细胞内 ROS 降低至正常水平 ($P < 0.01$)^[28], 表明不同衰老或氧化损伤模型中, 茶多酚类物质均能通过清除 ROS 发挥保护作用, 而鸚鵡茶多酚 PT-1 可能具有更显著的靶向增效潜力。

2.4 鸚鵡茶多酚降低 HaCaT 细胞的凋亡水平

如图 5a、5b 所示, PT-1 能够显著降低 D-半乳糖诱导的 HaCaT 衰老细胞凋亡, 其中 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT-1 处理降低 HaCaT 细胞凋亡的作用最佳, 较模型组降低 45.7% ($P < 0.01$)。研究表明, 茶多酚能够抑制细胞凋亡、

发挥神经保护作用^[29,30]。茶多酚在 D-半乳糖与 $\text{A}\beta$ 诱导的脑神经细胞凋亡模型中也表现出保护作用 (凋亡率从 31.5% 降至 12.6%~24.1%, $P < 0.05$)^[31]。而 PT-1 在皮肤细胞模型中展现出更显著的抗凋亡效果。衰老过程中, HaCaT 细胞可能因氧化应激或线粒体功能障碍导致异常凋亡增加, 但需要充分的机制研究判断 PT-1 是否有可能单纯抑制凋亡而导致衰老细胞未被清除、反而促进炎症性衰老。

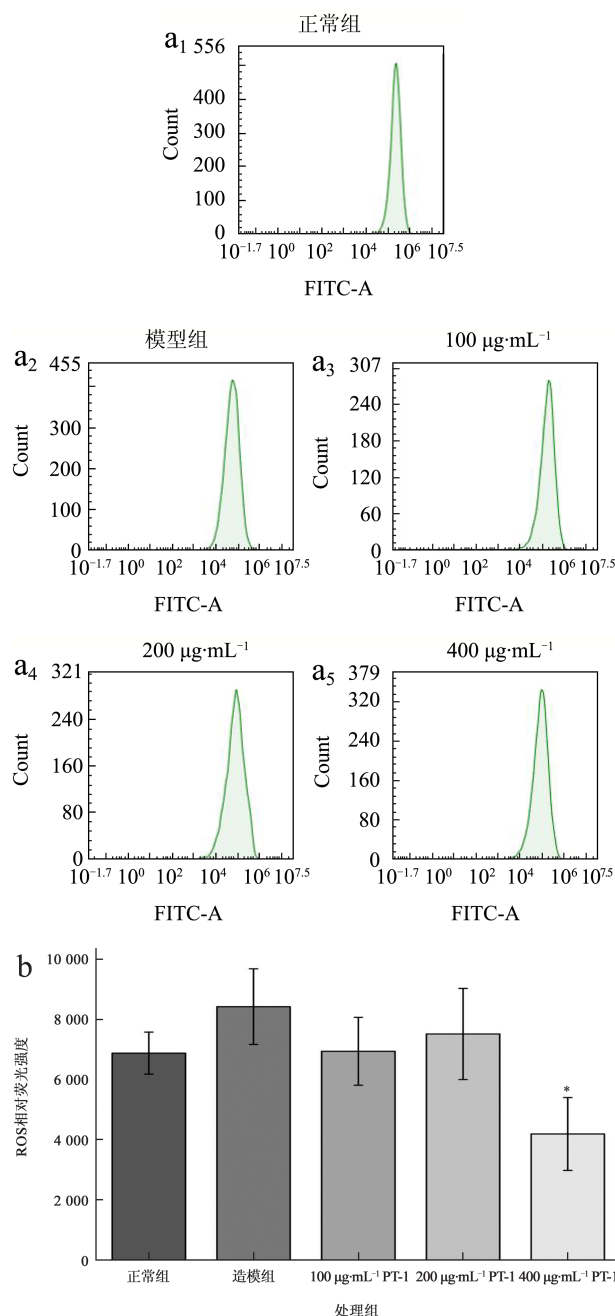


图4 PT-1 对 HaCaT 衰老细胞 ROS 水平的影响

Fig.4 The effects of PT-1 on ROS levels in senescent HaCaT cells

注: * 表示当 $P < 0.05$, 和模型组相比有显著差异。

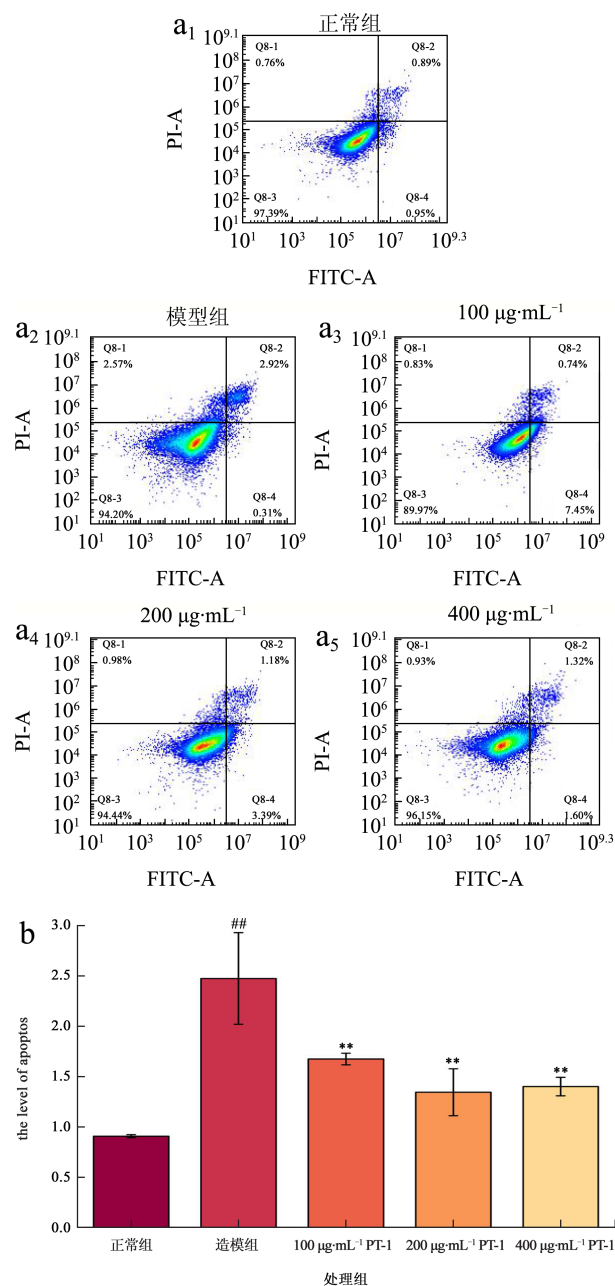


图5 PT-1 对 HaCaT 细胞凋亡水平的影响

Fig.5 The effects of PT-1 on apoptosis in HaCaT cells

注: ## 表示当 $P < 0.01$, 和正常对照组相比有显著差异;
** 表示当 $P < 0.01$, 和模型组相比有显著差异。

2.5 鸢尾素多酚调控HaCaT衰老细胞相关基因的表达

本文从基因表达水平探究了 PT-1 对于 HaCaT 衰老细胞的氧化系统 (*SOD* 和 *CAT*), 细胞周期 (*P21*、*P16* 和 *P53*) 以及细胞凋亡 (*Bax*、*Caspase-3* 和 *Caspase-9*) 的影响。如图 6a 和 6b 所示, 与正常对照组相比, 造模处理后 HaCaT 细胞的 *SOD* 和 *CAT* 表

达水平分别显著降低了 88.89% ($P < 0.01$) 和 82.85% ($P < 0.01$), 表明模型组细胞的氧化还原系统功能受到明显抑制。经不同质量浓度 (100、200、400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) PT-1 干预后, *SOD* 表达上调: 其中 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组较模型组显著升高 10.61 倍 ($P < 0.01$), 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组升高 6.67 倍 ($P < 0.05$); *CAT* 表达在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组显著增加 9.53 倍 ($P < 0.01$), 200 和 400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组分别增加 4.29 和 5.70 倍 (均无统计学差异)。这些结果与前期酶活力检测数据相互印证, 并与之前报道的抗氧化机制相符^[32,33], 共同表明 PT-1 能够通过上调氧化还原系统关键酶的表达, 有效增强衰老细胞的抗氧化防御功能, 并以质量浓度 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 处理最佳。

根据图 6c、6d 和 6e 的结果, PT-1 能够调控衰老细胞的凋亡基因 *Bax*、*Caspase-3* 和 *Caspase-9* 的表达。*Bax* 的激活会导致线粒体膜间隙中促凋亡因子的释放, 进而引发 *caspase* 级联反应, 最终导致细胞凋亡^[34]。因此, 降低 *Bax* 表达, 可能保护线粒体完整性, 延缓细胞死亡。与正常对照组相比, 模型组细胞凋亡相关蛋白基因表达发生显著变化, 其中 *Bax*、*Caspase-3* 和 *Caspase-9* 的表达水平分别上调 8.21 倍、3.61 倍和 9.06 倍 (均 $P < 0.01$)。经 PT-1 干预后, 不同浓度处理组表现出差异化的调控效果: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT-1 对 *Caspase-3* 的抑制作用最为显著, 使其表达较模型组下调 41.42%; 而 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT-1 则对 *Bax* 和 *Caspase-9* 的抑制作用最强, 分别下调 52.32% ($P < 0.01$) 和 50.52% ($P < 0.01$)。这些结果提示, PT-1 可能通过特异性调控 *Bax*-*Caspase* 凋亡通路关键蛋白的表达, 有效抑制衰老细胞的凋亡进程^[35]。

此外, *P53*、*P21* 和 *P16* 是调控细胞周期阻滞的关键调节因子。细胞永久退出分裂周期是衰老的核心特征。在衰老细胞中, DNA 会发生损伤, *P53*、*P21*、*P16* 在 DNA 损伤时均上调, 使细胞停止在染色体的复制期^[27,28], 其中 *P16* 的上调与细胞衰老强相关, 明确指示细胞进入不可逆衰老状态^[36]。如图 5f~5h 所示, 模型组细胞周期调控关键蛋白 *P53*、*P21* 和 *P16* 的表达水平较正常对照组显著上调, 分别升高 3.23 倍 ($P < 0.01$)、2.63 倍 ($P < 0.01$) 和 3.44 倍 ($P < 0.01$)。PT-1 处理可逆转这一趋势, 其中 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT-1 的干预效果最为显著: *P53* 表达下调 44.05% ($P < 0.05$), *P21* 表达下调 52.18% ($P < 0.01$), *P16* 表达下调幅度达 68.33% ($P < 0.01$)。这些数据表明, PT-1 能够通过调控 *P53*-*P21*/Rb 信号通路有效改善 D-半乳糖诱导的细胞周期阻滞现象^[37]。

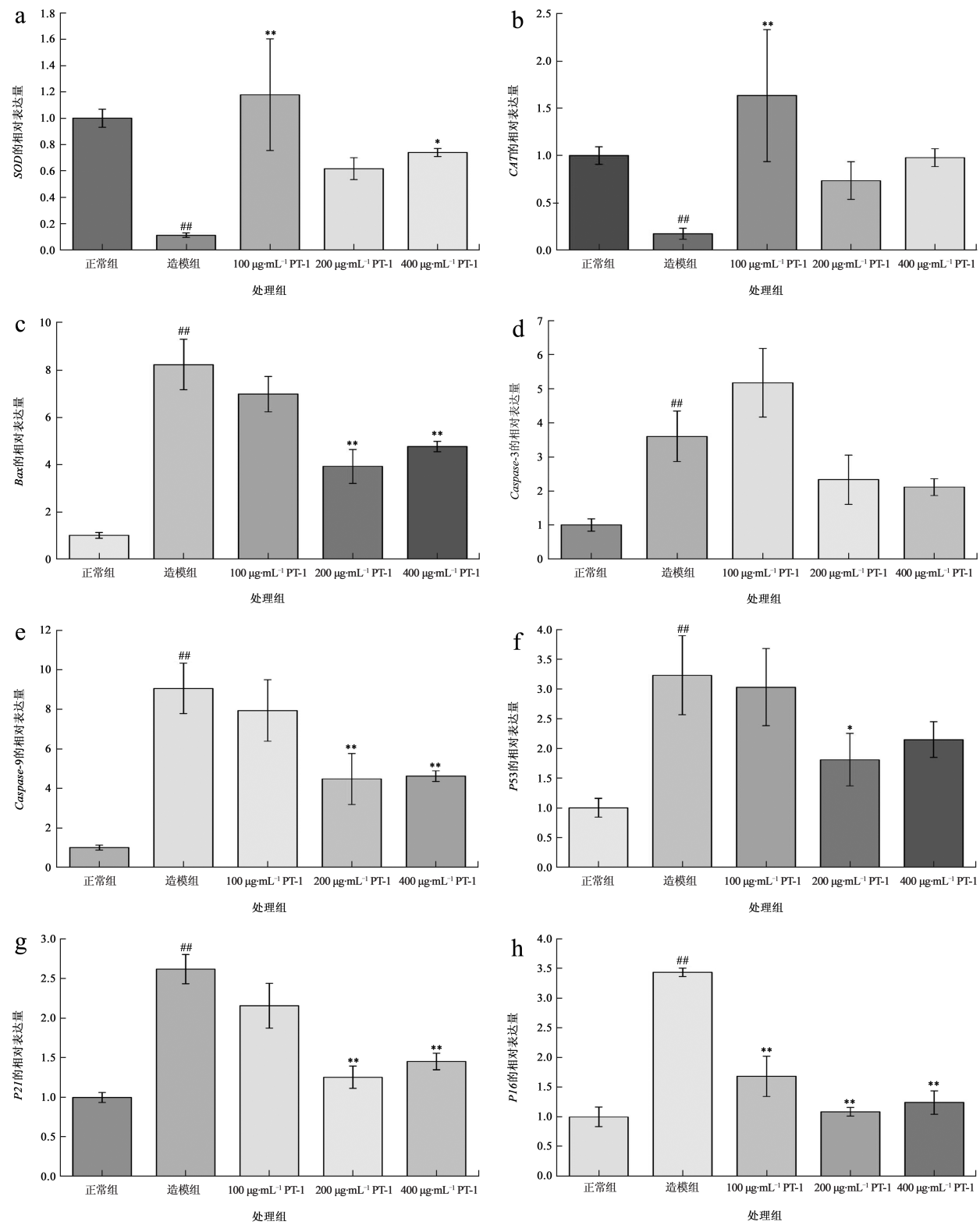


图 6 PT-1 对 HaCaT 衰老细胞相关基因表达的影响

Fig.6 The effects of PT-1 on the expression of senescence-related genes in HaCaT cells

注：##表示当 $P<0.005$ ，和正常对照组相比有显著差异；*表示当 $P<0.05$ 有显著差异；**表示当 $P<0.01$ ，和模型组相比有显著差异。

3 结论

本研究系统探讨了鹧鸪茶叶中三种多酚提取成分(PT-1、PT-2、PT-3)对D-半乳糖诱导的HaCaT细胞衰老模型的保护作用及其潜在机制。实验结果表明,在 $400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-半乳糖诱导的衰老模型中,三种多酚物质均能以剂量依赖方式显著改善细胞增殖能力,初步证实鹧鸪茶多酚能逆转细胞衰老导致的增殖停滞,其中PT-1效果最为突出。在抗氧化应激方面,PT-1在 $400\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下表现出最强的抗氧化效果,使SOD的活力较模型组提升22.26倍,MDA含量较模型组降低67.59%,且能显著恢复CAT活力至 $28.62\ \text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ protein}$ (较模型组升高51.04%、较正常组降低34.03%)。此外,PT-1能够有效降低ROS水平(较正常组降低39.05%,较造模组降低50.25% ($P<0.05$)),表明其强化内源性抗氧化防御、阻断ROS积累的源头性损伤的作用。抗细胞凋亡方面,200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ PT-1处理组细胞凋亡水平较模型组显著降低45.7%。细胞凋亡率的降低不足以证明抗衰老作用,需进一步检测PT-1是否通过抑制Caspase通路、减少ROS积累等途径特异性逆转衰老相关凋亡。分子机制研究表明,PT-1在100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下能显著上调衰老细胞中SOD和CAT基因表达,与造模组相比分别提高10.61倍和9.53倍。SOD、CAT上调表明PT-1强化抗氧化防御、保护线粒体功能、抑制氧化损伤产生衰老表型的抗衰老活性。在细胞凋亡调控方面,PT-1可显著抑制D-半乳糖诱导的HaCaT衰老细胞中促凋亡因子表达,其中Bax、Caspase-3和Caspase-9的mRNA表达水平分别最大下调52.32%、41.42%和50.52%,表示PT-1通过抑制Bax-Caspase-9-Caspase-3通路,阻断线粒体凋亡途径、与抗氧化通路协同、维持细胞稳态的作用。更重要的是,PT-1在200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度时使造模条件下细胞的P53、P21和P16表达分别下调44.05%、52.18%和68.33%。其中,p21能够导致可逆的周期停滞,由p53激活;p16则能够独立于p53,触发细胞的永久性生长停滞和不可逆的衰老程序。综合各项指标,PT-1在改善细胞增殖、增强抗氧化能力、抑制凋亡和缓解周期阻滞等方面均表现出良好的效果。研究结果不仅阐明了PT-1通过调控氧化应激、细胞凋亡和周期阻滞等多途径发挥抗衰老作用的分子机制,也为进一步开发高效、安全的抗衰老产品奠定了理论基础。

参考文献

[1] 张秀芬,陈荣锋,刘连军,等.茶多酚在食品中的应用[J].生物加工

过程,2019,17(4):424-429.

- [2] XIANG Y, XU H, CHEN H, et al. Tea consumption and attenuation of biological aging: a longitudinal analysis from two cohort studies [J]. *Lancet Regional Health-Western Pacific*, 2023, 42: 100955.
- [3] KE J P, LI J Y, YANG Z, et al. Unraveling anti-aging mystery of green tea in *C. elegans*: chemical truth and multiple mechanisms [J]. *Food Chemistry*, 2024, 460: 140510.
- [4] LIU Y, FANG M, TU X, et al. Dietary polyphenols as anti-aging agents: targeting the hallmarks of aging [J]. *Nutrients*, 2024, 16(19): 3305.
- [5] YE Q, YE L, XU X, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses 1-methyl-4-phenyl-pyridine-induced oxidative stress in PC12 cells via the SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 12(1): 1-7.
- [6] 张一帆,袁懿炜,徐倩倩,等.开化龙顶绿茶对高脂小鼠肝脂肪变性AMPK信号通路和肠道菌群的影响[J].中国食品学报,2024, 24(7):157-171.
- [7] 潘佳妮,洪侃,于雷雷,等.藤茶多酚对小鼠衰老过程中骨质代谢及肠道菌群的影响[J].食品与生物技术学报,2024,43(4):46-53.
- [8] FAN F Y, SANG L X, JIANG M. Catechins and their therapeutic benefits to inflammatory bowel disease [J]. *Molecules*, 2017, 22(3): 484.
- [9] HAO K X, ZHANG Y J, ZHONG R F, et al. Composition of four polyphenol fractions extracted from partridge tea and their mechanisms on ameliorate insulin resistance in HepG2 cells [J]. *Food Bioscience*, 2024, 62: 105380.
- [10] TAO M, LI R, XU T, et al. Vitexin and isovitexin delayed ageing and enhanced stress-resistance through the activation of the SKN-1/Nrf2 signaling pathway [J]. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2023, 74(6): 685-694.
- [11] MUSTAPHA M, MAT TAIB C N. Beneficial role of vitexin in parkinson's disease [J]. *The Malaysian Journal of Medical Sciences: MJMS*, 2023, 30(2): 8-25.
- [12] 闫佳,李跃萍,闫庆峰,等.山苦茶抗氧化功能研究[J].农产品加工(学刊),2012,6:16-18.
- [13] 刘月丽,黄奕弟,林连波.海南山苦茶提取物对衰老小鼠脑组织抗氧化能力的影响[J].海南医学院学报,2012,18(7):872-874.
- [14] 闫佳,李跃萍,闫庆峰,等.山苦茶对小鼠非特异性免疫功能的影响[J].海南医学院学报,2012,18(5):589-591.
- [15] 刘月丽,林连波.海南山苦茶提取物对衰老小鼠学习记忆能力的影响[J].中国热带医学,2012,12(1):21-23.
- [16] SURIN A M, SHARIPOV R R, KRASIL'NIKOVA I A, et al. Disruption of functional activity of mitochondria during MTT assay of viability of cultured neurons [J]. *Biochemistry-Moscow*, 2017, 82(6): 737-749.
- [17] ZHENG S L, WANG Y M, CHI C F, et al. Chemical characterization of honeysuckle polyphenols and their alleviating function on ultraviolet B-damaged HaCaT cells by modulating the Nrf2/NF- κ B signaling pathways [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(3): 294.
- [18] ZHANG X, HUANG H, SUN S, et al. Induction of apoptosis via inactivating PI3K/AKT pathway in colorectal cancer cells using aged chinese hakka stir-fried green tea extract [J]. *Molecules*,

- 2022, 27(23): 8272.
- [19] SHEN C L, KWUN I S, WANG S, et al. Functions and mechanisms of green tea catechins in regulating bone remodeling [J]. *Current Drug Targets*, 2013, 14(13): 1619-1630.
- [20] ZHANG Y, HE Q, DONG J, et al. Effects of epigallocatechin-3-gallate on proliferation and differentiation of mouse cochlear neural stem cells: involvement of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 88: 267-273.
- [21] HSU Y W, CHEN W K, TSAI C F. Senescence-mediated redox imbalance in liver and kidney: antioxidant rejuvenating potential of green tea extract [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(1): 260.
- [22] HSU Y W, TSAI C F, TING H C, et al. Green tea supplementation in mice mitigates senescence-induced changes in brain antioxidant abilities [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 471-478.
- [23] 李明阳, 谢仁厚, 刘波, 等. 茶多酚对D-半乳糖诱导的小鼠拟衰老作用的影响 [J]. *空军总医院学报*, 2000, 4: 18-19.
- [24] 李哲明, 何嘉娜, 刘琼, 等. 安吉白茶茶多酚对D-半乳糖致衰老模型小鼠的抗氧化作用研究 [J]. *贵阳中医学院学报*, 2016, 38(2): 21-24.
- [25] TIAN J, GEISS C, ZARSE K, et al. Green tea catechins EGCG and ECG enhance the fitness and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by complex I inhibition [J]. *Aging-Us*, 2021, 13(19): 22629-22648.
- [26] XIE L W, CAI S, ZHAO T S, et al. Green tea derivative (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) confers protection against ionizing radiation-induced intestinal epithelial cell death both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, 161: 175-186.
- [27] 沈轶昕, 唐礼荣, 张辉. 茶多酚的经皮渗透特征及其对UVA致HSF氧化损伤的保护作用 [J]. *日用化学工业(中英文)*, 2023, 53(9): 1035-1043.
- [28] QI G, MI Y, FAN R, et al. Tea polyphenols ameliorate hydrogen peroxide-and constant darkness-triggered oxidative stress via modulating the Keap1/Nrf2 transcriptional signaling pathway in HepG2 cells and mice liver [J]. *Rsc Advances*, 2017, 7(51): 32198-32208.
- [29] FU Y C, JIN X P, WEI S M. The effects on cell growth of tea polyphenols acting as a strong anti-peroxidant and an inhibitor of apoptosis in primary cultured rat skin cells [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2000, 13(3): 170-179.
- [30] NIE G J, CAO Y L, ZHAO B L. Protective effects of green tea polyphenols and their major component, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), on 6-hydroxydopamine-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Redox Report*, 2002, 7(3): 171-177.
- [31] 吕俊华, 杨文豪, 郭晶. 茶多酚对D-半乳糖与A β 25~35诱导神经细胞凋亡的保护作用 [J]. *中国药科大学学报*, 2006, 3: 251-254.
- [32] LIU B, MA R, ZHANG J, et al. Preventive effect of small-leaved kuding tea (*Ligustrum robustum* (Roxb.) Bl.) polyphenols on D-galactose-induced oxidative stress and aging in mice [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019, 2019: 3152324.
- [33] ESPINOSA C, PEREZ-LLAMAS F, GUARDIOLA F A, et al. Molecular mechanisms by which white tea prevents oxidative stress [J]. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 2014, 70(4): 891-900.
- [34] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2018, 25(3): 486-541.
- [35] HSIEH M H, CUI Z Y, YANG A L, et al. Cerebral cortex apoptosis in early aged hypertension: effects of epigallocatechin-3-gallate [J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2021, 13: 705304.
- [36] D'ARCANGELO D, TINABURRI L, DELLAMBRA E. The role of p16INK4a pathway in human epidermal stem cell self-renewal, aging and cancer [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(7): 1591.
- [37] ENGELAND K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2022, 29(5): 946-960.