绿原酸对 UVB 损伤人永生化表皮角质细胞的保护作用

武思敏[1,2]，袁 梅[1,2]，满佳旭[1,2]，高梓琪[1,2]，张冬英[*2]

（1. 云南农业大学 食品科学技术学院，云南 昆明 650225；2. 云南农业大学 普洱茶学教育部重点实验室，云南 昆明 650225）

摘要： 为研究绿原酸(chlorogenic acid，CGA)对中波紫外线(UVB)损伤人永生化表皮角质细胞(HaCaT)的保护作用及机制，通过 MTT 法建立细胞紫外损伤(光老化)模型及绿原酸的处理方式，采用酶标仪检测绿原酸的紫外吸收，流式细胞术检测细胞的凋亡水平，ABTS 法检测绿原酸的自由基清除能力。结果表明：UVB 辐射剂量为 21.6 mJ/cm^2，绿原酸浓度为 100.000、150.000 μmol/L，预处理 1 h 后细胞培养 12 h，绿原酸在 UVB 波段(280~320 nm)内有较强的吸收；100.000 μmol/L 和 150.000 μmol/L 绿原酸均能显著降低 UVB 引起的细胞凋亡；150.000 μmol/L 绿原酸能有效增加 UVB 处理细胞的 ABTS$^+$自由基清除能力，达到了 53%。由此可知，绿原酸在 UVB 诱导的 HaCaT 光老化模型上，具有很强的抗皮肤光老化活性，其机制可能与绿原酸的紫外吸收以及抗氧化能力相关，为富含绿原酸的食品资源开发利用提供科学依据。

关键词： 绿原酸；皮肤光老化；UVB；HaCaT；抗氧化

中图分类号：Q 255　**文章编号：**1673-1689(2023)05-0096-06　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.05.013

Protective Effect of Chlorogenic Acid on UVB Damaged HaCaT Cells

WU Simin[1,2]，*YUAN Mei*[1,2]，*MAN Jiaxu*[1,2]，*GAO Ziqi*[1,2]，*ZHANG Dongying*[*2]

（1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650225, China; 2. Key Laboratory of Pu-er Tea Science, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University, Kunming 650225, China）

Abstract: To investigate the protective effect and mechanism of chlorogenic acid (CGA) on UVB damaged human immortalized epidermal cells (HaCaT), a cellular ultraviolet damage (photo-aging) model and different treatment methods of CGA were established using MTT assay. The UV absorption of CGA was detected by the microplate reader. The level of apoptotic cell death was determined by flow cytometry analysis. The free radical scavenging ability of CGA was detected by ABTS method. The results showed that when the UVB radiation dose was 21.6 mJ/cm^2 and the concentrations of CGA were 100.000 μmol/L and 150.000 μmol/L respectively, after pre-treatment for 1 hour and cell cultivation for 12 hours, CGA exhibited strong absorption in the UVB spectrum range of 280~320 nm. Both 100.000 μmol/L and 150.000 μmol/L CGA could significantly reduce

收稿日期： 2021-07-28

基金项目： 国家自然科学基金项目（31760226）；云南省重大科技项目（2018IA060）；云南农业大学学生科技创新创业行动基金项目（2021ZKY225）。

* **通信作者：** 张冬英(1976—)，女，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事茶及特色植物资源开发利用研究。E-mail：757664982@qq.com

UVB-induced cell apoptosis. The ABTS^{+} free radical scavenging capacity of UVB-treated cells could be effectively increased by 150.000 μmol/L CGA, reaching 53%. Therefore, CGA has strong anti-skin aging activity in the UVB-induced HaCaT photo-aging model, which might be related to its UV absorption and antioxidant ability. This provides a scientific basis for the development and utilization of food resources rich in CGA.

Keywords: chlorogenic acid, skin photoaging, UVB, HaCaT, antioxidant

绿原酸是由一分子咖啡酸和一分子奎尼酸缩合而成的羧酚酸,在植物体内主要由有氧呼吸代谢产生[1],是咖啡豆、金银花、杜仲等植物的主要活性成分[2],在胡萝卜、菠菜等常见蔬菜水果中也有分布。绿原酸具有多种生物学功能,尤其在心血管保护、抗菌、抗病毒等方面有着广泛的应用[3]。Li 等通过体外模拟实验发现绿原酸二聚体可以通过胃肠消化和代谢被充分吸收和分解,并且消化后的绿原酸二聚体具有更强的抗氧化能力[4]。Costa 等的研究发现,在绿原酸的诸多异构体中,油水分配系数的差值越大,对应的绿原酸异构体抗氧化活性越高[5]。近年来有报道金银花、杜仲、咖啡豆提取物可以保护皮肤免受紫外损伤[6-8],还有研究表明在绿茶、咖啡以及茵陈中提取的绿原酸均可以起到很好的抗氧化作用[9],可以显著保护皮肤中的胶原蛋白等免受氧化损伤,有效降低紫外线对皮肤的损伤[8]。李建民等采用 40 J/cm^2 和 70 mJ/cm^2 的 UVA 和 UVB 分别照射人皮肤成纤维细胞后,用不同浓度的绿原酸处理,24 h 后发现绿原酸能显著增强 UVA 和 UVB 诱导的光老化细胞活性[10]。据此可知绿原酸作为多种食物的有效成分对皮肤光老化的防治有一定效果,尤其是在紫外线诱导的细胞氧化损伤方面有一定功效,但是其保护机制尚不明确。

皮肤光老化是皮肤外源性老化中最重要的一类[11],主要指由于日光中紫外线的过量辐射而引起的皮肤干燥、红肿、皱纹、皮屑等老化症状[12],其主要原因是紫外线包括长波紫外线(UVA 320~400 nm)和中波紫外线(UVB 280~320 nm)导致皮肤细胞产生大量的自由基进而引发细胞的氧化应激,造成细胞凋亡[13]。据统计从 1990 年到 2019 年,在东亚和撒哈拉以南非洲等地区皮肤癌患病率居高不下,并且恶性皮肤黑色素瘤的全球死亡率急剧增加,皮肤癌仍然是全球主要的公共卫生威胁,每年全球约有 6 万人因不同类型的皮肤癌而失去生命,其中大部分原因便是受到了过量的紫外线辐射[14]。皮肤光老化是一个复杂且渐进的过程,其受到许多外源因素的影响,紫外线辐射、化妆品或有害的化学物质等都会引起皮肤的光老化,其中紫外线对皮肤产生的影响尤为严重,日光中的紫外线直接照射到皮肤上会引起皮肤的光老化,轻度的紫外辐射会使皮肤产生皱纹、松弛等老化现象。作者研究了绿原酸对 UVB 损伤 HaCaT 细胞的保护效果与机制,旨在为富含绿原酸的食品资源开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与设备

1.1.1 实验材料 HaCaT 细胞:中国科学院昆明细胞库提供。

1.1.2 实验试剂与设备 绿原酸(质量分数≥98%):大连美仑生物科技有限公司产品;四甲基偶氮唑蓝、磷酸盐缓冲液:北京索莱宝生物科技有限公司产品;DMSO:VWR Corporation 公司产品;DMEM 高糖培养基、胎牛血清:Gibco Life Technologies 公司产品;SW-CJ-2FD 超净工作台:苏州净化设备有限公司产品;FlexStation 3 多功能酶标仪:Molecular Devices 公司产品;DHP-9272 电热恒温培养箱:上海一恒科学仪器有限公司产品;UVB-313 紫外灯管:南京雪莱特光电科技公司产品;UVA&UVB 紫外线辐照计:佛山精微特仪器仪表有限公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 绿原酸对 HaCaT 细胞生长的影响 将 HaCaT 细胞以 15 000 个/孔的细胞密度接种至 96 孔板中,待细胞贴壁牢固后,加入无血清培养基和绿原酸,绿原酸终浓度分别为 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、150.000、200.000 μmol/L,每个梯度做 6 个平行。培养 24 h 后每孔加入 20 μL MTT 溶液,4 h 后吸去上清液,每孔加入200 μL DMSO 溶液,室温振荡 10 min,使用酶标仪在492 nm 处测其吸光度,通过公式(1)计算细胞存活率。

$$R_{CV}=\frac{A_1}{A_0} \quad (1)$$

式中:R_{CV} 为细胞存活率,A_0 为空白孔吸光度,A_1 为样品孔吸光度。

1.2.2 细胞光老化模型的建立 当培养皿中的相对细胞密度为 70%时,吸去培养基,加入 1 mL PBS 覆盖细胞,药物处理组为加入对应浓度的绿原酸。然后将细胞置于 UVB 灯管的正下方,处理 10 min 左右至辐射剂量累计为 21.6 mJ/cm^2 时弃去 PBS,加入无血清培养基,继续培养 12 h。

1.2.3 绿原酸的紫外吸收 配制 150.000 μmol/L 绿原酸的水溶液,以 200 μL/孔加入酶标板,并设置去离子水的空白对照孔,使用酶标仪在 200~400 nm 波段测定吸光度。

1.2.4 细胞凋亡检测 将处理后的细胞收集到 15 mL 离心管中,弃去上清液。加入 100 μL 的 1×Buffer 缓冲液重悬细胞,室温避光加入 Annexin V 5 μL 染色 15~20 min,后加入碘化丙啶(propidium iodide,PI) 5 μL 染色 5 min。最后每管补加 300 μL 1×Buffer 缓冲液终止染色,细胞混匀,过滤,通过流式细胞仪检测细胞凋亡状态。

1.2.5 ABTS$^+$自由基清除能力测定 配制 7.4 mmoL/L 的 ABTS 储备液和 2.6 mmoL/L 的 $K_2S_2O_8$ 储备液,将 ABTS 和 $K_2S_2O_8$ 储备液以体积比 1:1 混合,避光室温放置 12 h,使用前用 PBS 稀释至溶液吸光度 $A_{734\ nm}$ 在 0.7 左右,为 ABTS 使用液。将待测样品与 ABTS 使用液以体积比 1:4 混合,避光反应 10 min,于 734 nm 测定其吸光度,按公式(2)测定 ABTS$^+$自由基清除能力。

$$I=\frac{A_2-A_3}{A_2}\times 100\% \quad (2)$$

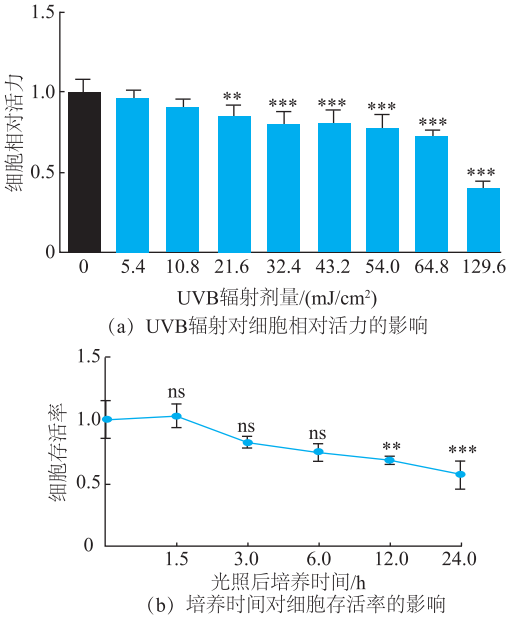
式中:I 为 ABTS$^+$自由基清除率,A_2 为空白样吸光度,A_3 为样品吸光度。

1.2.6 数据处理 所有数据均使用 SPSS 25 进行处理,方差齐时使用 LSD 法、方差不齐时使用 Dunnett′s T3 法。P<0.05 具有统计学意义,应用 GraphPad Prism 6 对实验数据进行作图(* 为 P<0.05,** 为 P<0.01,*** 为 P<0.001,ns 为 P>0.05)。

2 结果与分析

2.1 UVB 处理对 HaCaT 细胞活力的影响

角质形成细胞是皮肤细胞类群中的重要组成部分,对于皮肤抵御外界刺激起着不容忽视的作用,在机体内通过分裂分化最终形成角质层,因此角质形成细胞的增殖能力下降是皮肤光老化的特征之一[15]。如图 1(a)所示,不同剂量的 UVB 辐射均能够不同程度地抑制 HaCaT 细胞活力,抑制其增殖。其中 UVB 辐射剂量为 21.6 mJ/cm^2 时细胞相对活力已显著下降,约为空白对照组(UVB 辐射剂量为 0)的 80%。这与夏济平的研究[16]基本一致,即在 21 mJ/cm^2 UVB 处理下细胞相对活力约为 80%。如图 1(b)所示,随着 UVB 辐射后培养时间的延长,细胞的增殖能力减弱,12.0 h 时已经明显抑制细胞增殖。因此,在 UVB 辐射剂量 21.6 mJ/cm^2 处理后培养 12.0 h,细胞光老化相关症状明显,但是细胞受损还不是特别严重,后续实验将采用此剂量和培养时间对细胞进行建模。



(a) UVB辐射对细胞相对活力的影响

(b) 培养时间对细胞存活率的影响

** 为各剂量组与空白对照组相比 P<0.01,*** 为各剂量组与空白对照组相比 P<0.001,ns 为各剂量组与空白对照组相比 P>0.05。

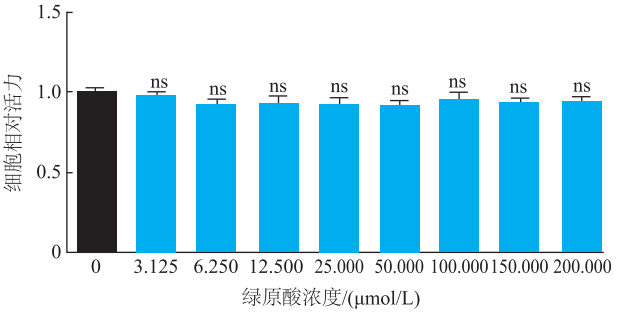
图 1 UVB 辐射对 HaCaT 细胞活力的影响

Fig. 1 Effects of UVB radiation on the viability of HaCaT cells

2.2 绿原酸浓度及处理时间对 UVB 损伤 HaCaT 细胞的保护作用

不同的预处理时间和绿原酸浓度对 UVB 损伤 HaCaT 细胞的保护效果不尽一致,为了寻找绿原酸的最佳处理浓度和处理时间,通过 MTT 实验探究绿原酸的最佳处理方式。如图 2 所示,绿原酸在 3.125~200.000 μmol/L 剂量时各剂量组对 HaCaT 细胞的增殖均无明显抑制作用,表明绿原酸对 HaCaT

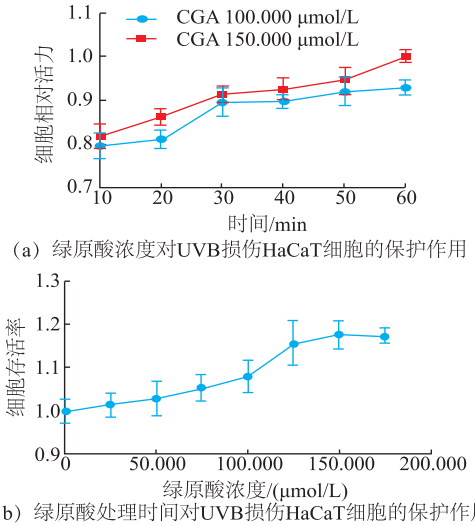
细胞无明显毒副作用。图 3 中展示了不同浓度绿原酸和处理时间对 UVB 损伤 HaCaT 细胞的保护作用。如图 3(a)所示,100.000、150.000 μmol/L 绿原酸组细胞相对活力均随着预处理时间的增加而增加,但是鉴于防晒类产品的使用便捷性,不便增加过长的预处理时间,因此后续实验均采用 1 h 的预处理时间。如图 3(b)所示,随着绿原酸浓度的增加,细胞存活率也不断增加,并且曲线后段明显呈现为增长减缓,150.000 μmol/L 绿原酸对于 21.6 mJ/cm² 紫外线造成的损伤细胞已经达到了最佳的修复效果。因此,后续实验选用 100.000、150.000 μmol/L 的绿原酸,预处理时间为 1 h。



ns 为各剂量组与空白组相比 $P>0.05$。

图 2　绿原酸对 HaCaT 细胞增殖毒性

Fig. 2　Chlorogenic acid toxicity on HaCaT cell proliferation



(a) 绿原酸浓度对UVB损伤HaCaT细胞的保护作用

(b) 绿原酸处理时间对UVB损伤HaCaT细胞的保护作用

图 3　绿原酸对 UVB 损伤 HaCaT 细胞的保护作用

Fig. 3　Protective effect of chlorogenic acid on UVB damaged HaCaT cells

2.3　绿原酸的紫外吸收

在以上研究中发现绿原酸可以保护 HaCaT 细胞免受 UVB 的损伤,但是其保护机制尚不明确。如图 4 所示,绿原酸在 UVB 波段(280~320 nm)有较强的吸收,证明绿原酸可以作为紫外线吸收剂,对细胞发挥保护作用。这与张英等的研究一致,在其研究中还发现绿原酸虽然能够吸收 UVB 但是由于其存在光活性,并且在 UVA 的波段(320~400 nm)中吸收效率较低[17],因此绿原酸作为天然紫外吸收剂需要与其他物质一起发挥作用。

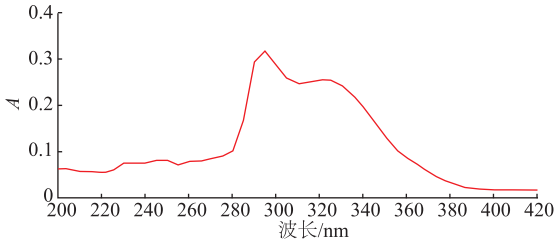


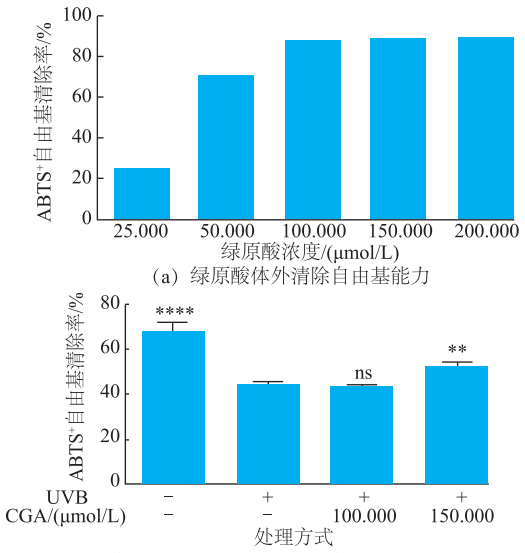
图 4　绿原酸在紫外线波段的吸收

Fig. 4　Chlorogenic acid absorption in the UV band

2.4　绿原酸对 UVB 处理 HaCaT 细胞的 ABTS⁺自由基清除能力的影响

如图 5 (a) 所示,绿原酸在体外具备极强的 ABTS⁺自由基清除能力,绿原酸浓度为 100.000 μmoL/L 时的清除率已经达到了 88%,这与其多酚羟基的结构密不可分,一分子绿原酸含有 5 分子酚羟基,绿原酸分子中的活性羟基可以形成具有抗氧化作用的氢自由基,从而消除羟自由基的活性,保护组织免受氧化作用的损伤。王文华等的研究表明,从蒲公英和葵花子中提取的绿原酸对 ABTS⁺自由基清除率分别高达 91.78%和 90.51%[18]。此外有研究表明饲料中添加绿原酸可以提高动物机体的抗氧细胞清除自由基的能力,并且膳食中补充绿原酸可以通过激活肉鸡肌肉中的 NRF2 途径来增强抗氧化酶活性,改善肉鸡的增长性能和肉质特性[19-20],与本研究有一定相通之处。有研究表明,绿原酸对活性氧和脂质过氧化的引发剂有显著的抑制作用,进而发挥抑制脂质过氧化的功能[21]。如图 5(b)所示,UVB 处理显著降低了 HaCaT 细胞的 ABTS⁺自由基清除能力,而绿原酸则逆转了 UVB 诱导的氧化应激,提高了细胞清除自由基能力。细胞抗氧化体系分为非酶类抗氧化体系和酶类抗氧化体系,有研究表明绿原酸对机体抗氧化能力的提升是多方面的。如有研究者在成纤维细胞和 HaCaT 细胞中对绿原酸进行了抗紫外线研究,结果表明绿原酸单体可以进入细胞作为非酶类抗氧化物质,有效降低了蛋白质羰基化水平,起到保护皮肤细胞免受紫外损伤

的作用[9]。此外,李建民等的研究表明绿原酸可以提高细胞中 SOD 的活性,降低 MDA 的含量,以抵御 UVB 诱发的细胞氧化损伤[10]。因此,绿原酸对于细胞清除自由基能力的提升应该是多方面共同作用的结果。



(a) 绿原酸体外清除自由基能力

(b) 绿原酸和UVB处理对HaCaT细胞ABTS⁺自由基清除能力

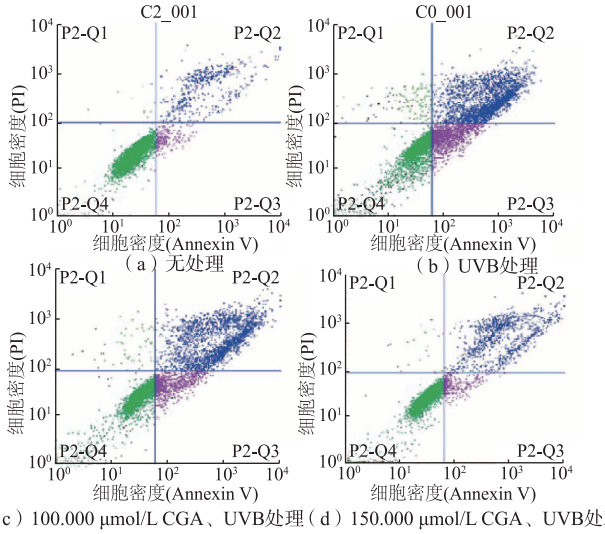
** 为各剂量组与仅 UVB 处理组相比 $P<0.01$,*** 为各剂量组与仅 UVB 处理组相比 $P<0.001$,ns 为各剂量组与仅 UVB 处理组相比 $P>0.05$。

图 5 绿原酸处理对 ABTS⁺自由基清除能力影响

Fig. 5 Effect of chlorogenic acid treatment on ABTS⁺ radical scavenging capacity

2.5 绿原酸对 UVB 诱导细胞的保护作用

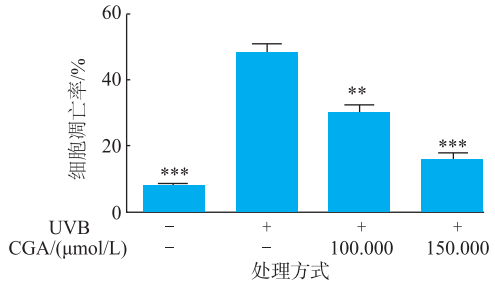
细胞凋亡作为细胞调节生长的重要一环,对于机体的正常运转是不可或缺的。但是紫外线引发的皮肤细胞过早凋亡所带来的皱纹、皮肤弹性下降等也同样困扰着爱美的人们[22]。有研究表明绿原酸在抑制氧化应激引发的细胞凋亡方面有着一定疗效[23-26]。如图 6 流式细胞术的散点图所示,UVB 处理可以显著增加细胞的凋亡水平,而加入绿原酸则可以不同程度地降低细胞的凋亡水平,且第四象限中的坏死细胞数更是得到了明显的抑制。这一实验结果说明,绿原酸能够显著抑制 UVB 引起的 HaCaT 细胞的凋亡。图 7 的量化图更加清晰地展示了这一结论,即 21.6 mJ/cm² UVB 处理可以显著增加 HaCaT 细胞的凋亡水平,抑制细胞的生长,而绿原酸处理则可以降低 UVB 诱导的细胞凋亡,并且 150.000 μmol/L 绿原酸效果明显优于 100.000 μmol/L 绿原酸。原因可能是一方面绿原酸在 UVB 波段的吸收直接减弱了细胞受到的紫外线辐射剂量;另一方面可能是由于绿原酸对细胞酶类抗氧化体系的激活和自身的清除自由基的能力增加了细胞抵御氧化应激的能力。



(a) 无处理 (b) UVB处理 (c) 100.000 μmol/L CGA、UVB处理 (d) 150.000 μmol/L CGA、UVB处理

图 6 流式细胞术散点图

Fig. 6 Scatter plot of flow cytometry



** 为各剂量组与仅 UVB 处理组相比 $P<0.01$,*** 为各剂量组与仅 UVB 处理组相比 $P<0.001$。

图 7 绿原酸对 HaCaT 细胞凋亡的影响

Fig. 7 Effect of chlorogenic acid on apoptosis of HaCaT cells

3 结 语

综上所述,绿原酸对 UVB 诱导的 HaCaT 细胞有显著的保护作用,能够快速恢复细胞的增殖能力。一方面是因为绿原酸对 UVB 有一定的吸收,另一方面是因为绿原酸清除自由基的能力能够有效抑制 UVB 诱导的细胞氧化应激状态,进而保护细胞。此研究结果可为阐明金银花、咖啡、杜仲等提取物抵御皮肤光老化的有效成分提供一定科学依据,同时也为富含绿原酸的食品资源开发利用提供科学基础。

参考文献:

[1] 王玲娜,姚佳欢,马超美. 绿原酸的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2017,36(11):7-16.
[2] 王文全. 中药资源学[M]. 北京,中国中医药出版社,2006:156-164.
[3] NAVEED M,HEJAZI V,ABBAS M,et al. Chlorogenic acid (CGA):a pharmacological review and call for further research[J]. **Biomedicine & Pharmacotherapy**,2018,97:67-74.
[4] LI J,QIN Y,YU X,et al. *In vitro* simulated digestion and *in vivo* metabolism of chlorogenic acid dimer from *Gynura procumbens* (Lour.) Merr.:enhanced antioxidant activity and different metabolites of blood and urine[J]. **Journal of Food Biochemistry**,2019,43(6):1-14.
[5] COSTA M,LOSADA-BARREIRO S,VICENTE A,et al. unexpected antioxidant efficiency of chlorogenic acid phenolipids in fish oil-in-water nanoemulsions:an example of how relatively low interfacial concentrations can make antioxidants to be inefficient[J]. **Molecules**,2022,27(3):34-42.
[6] KURT-CELEP I,CELEP E,AKYÜZ S,et al. *Hypericum olympicum* L. recovers DNA damage and prevents MMP-9 activation induced by UVB in human dermal fibroblasts[J]. **Journal of Ethnopharmacology**,2020,246:1-9.
[7] WANG J,LI J,LIU J,et al. Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced DNA damage in vascular smooth muscle cells[J]. **Molecular Medicine Reports**,2016,14(5):4063-4068.
[8] CHO Y H,BAHUGUNA A,KIM H H,et al. Potential effect of compounds isolated from coffea arabica against UVB induced skin damage by protecting fibroblast cells[J]. **Journal of Photochemistry and Photobiology B–Biology**,2017,174:323-332.
[9] 胡宗福,于文利,赵亚平. 绿原酸清除活性氧和抗脂质过氧化的研究[J]. 食品科学,2006,27(2):128-130.
[10] 李建民,宋丽艳,陈巧云,等. 绿原酸对紫外线致 ESF-1 细胞光老化保护作用的研究[J]. 中医药信息,2013,30(4):25-27.
[11] 武思敏,袁梅,高梓琪,等. 表没食子儿茶素没食子酸酯在皮肤光老化炎症反应中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(7):2513-2519.
[12] 佘金铭,车静,陈聪颖,等. 紫外线致皮肤光老化及光癌变机制的研究进展[J]. 中华整形外科杂志,2021,37(2):220-224.
[13] 何丽,林雪霏,陈慧,等. 皮肤光老化机制及治疗制剂研究进展[J]. 实用皮肤病学杂志,2020,13(5):293-296.
[14] ZHANG W,ZENG W,JIANG A F,et al. Global,regional and national incidence,mortality and disability-adjusted life-years of skin cancers and trend analysis from 1990 to 2019:an analysis of the Global Burden of Disease Study 2019[J]. **Cancer Medicine**,2021,10(14):4905-4922.
[15] CHOI E,YI Y S,LEE J,et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory activities of edible fresh water algae *Prasiola japonica* in UVB-irradiated skin keratinocytes[J]. **The American Journal of Chinese Medicine**,2019,47(8):1853-1868.
[16] 夏济平. 紫外线辐射角质形成细胞导致皮肤光老化的分子机制研究[D]. 南京:南京医科大学,2004.
[17] 张英,林峰,饶长全,等. 金银花中绿原酸防晒作用研究[J]. 日用化学工业,2014,44(8):448-451.
[18] 王文华,郭丽,刘爽. 蒲公英与葵花籽仁提取绿原酸的协同抗氧化作用[J]. 食品工业,2021,42(1):146-150.
[19] ZHANG K,LI X,ZHAO J,et al. Protective effects of chlorogenic acid on the meat quality of oxidatively stressed broilers revealed by integrated metabolomics and antioxidant analysis[J]. **Food & Function**,2022,13(4):2238-2252.
[20] ZHAO J S,DENG W,LIU H W. Effects of chlorogenic acid-enriched extract from eucommia ulmoides leaf on performance,meat quality,oxidative stability,and fatty acid profile of meat in heat-stressed broilers[J]. **Poultry Science**, 2019,98(7):3040-3049.
[21] CHEN J,LI Y,YU B. Dietary chlorogenic acid improves growth performance of weaned pigs through maintaining antioxidant capacity and intestinal digestion and absorption function[J]. **Journal of Animal Science**,2018,96(3):1108-1118.
[22] ALVES G A D,DE SOUZA O R,GHISLAIN R L,et al. Cecropia obtusa extract and chlorogenic acid exhibit anti aging effect in human fibroblasts and keratinocytes cells exposed to UV radiation[J]. **Plos One**,2019,14(5):1-14.
[23] 刘陶,刘洋,夏庆梅,等. 中药及其复方抗皮肤光老化的机制及应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(13):224-230.
[24] KUNCHANA K,JARISARAPURIN W,CHULAROJMONTRI L,et al. Potential use of amla (*Phyllanthus emblica* L.) fruit extract to protect skin keratinocytes from inflammation and apoptosis after UVB irradiation[J]. **Antioxidants**,2021,10:128-168.
[25] PARK H,KIM H,KIM C,et al. synergistic protection by isoquercitrin and quercetin against glutamate-induced oxidative cell death in HT22 cells via activating Nrf2 and HO-1 signaling pathway:neuroprotective principles and mechanisms of *Dendropanax morbifera* leaves[J]. **Antioxidants**,2021,10:156-188.
[26] CHEN L,LI Y,YIN W,et al. Combination of chlorogenic acid and salvianolic acid B protects against polychlorinated biphenyls-induced oxidative stress through Nrf2[J]. **Environmental Toxicology and Pharmacology**,2016,46:255-263.