DOI:10.12441/spyswjs.20241017002　　[文章编号] 1673-1689(2025)07-0074-11

茶树花提取物的体外抗氧化、抗炎活性及其对细胞衰老的抑制作用

虞世帅[1,2]　郝怡宁[1,3,4]　彭　勃[1,4]　刘悠云[2]　曲丽萍[1,3,4*]

(1. 云南贝泰妮生物科技集团股份有限公司,云南 昆明 650106; 2. 上海贝泰妮生物科技有限公司,上海 201702; 3. 云南特色植物提取实验室有限公司,云南 昆明 650106; 4. 上海际研生物医药开发有限公司,上海 201702)

摘要:【目的】研究云南茶树花提取物(TFE)的体外抗氧化、抗炎活性及其对细胞衰老的抑制作用。【方法】通过紫外(UV)-可见分光光度法和高效液相色谱(HPLC)法分析测定TFE的主要活性成分,通过自由基清除试验测定TFE的体外抗氧化能力,利用UV诱导的人永生化表皮角质形成细胞(HaCaT)光老化模型测定TFE的抗炎活性。建立人成纤维细胞衰老模型,通过*β*-半乳糖苷酶(*β*-galactosidase,*β*-gal)染色法检测细胞衰老水平,通过酶联免疫吸附试验检测基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1,*MMP-1*)、基质金属蛋白酶-3(matrix metalloproteinase-3,*MMP-3*)和I型前胶原蛋白(type I procollagen,*PC-1*)基因的表达。【结果】TFE中总黄酮、茶多酚、总蛋白质和总糖的质量分数分别为14.51%、12.83%、9.57%、50.34%,其中茶多酚以酯型儿茶素类化合物为主。DPPH、ABTS自由基清除能力的IC_{50}分别为34.32、227.79 μg/mL,TFE显著抑制了UV诱导的HaCaT细胞中活性氧(reactive oxygen species,ROS)的生成,下调了*IL-6*、*TNF-α*基因的表达,并上调了核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2,*Nrf2*)和血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,*HO-1*)基因的表达。此外,TFE还有效抑制了人成纤维细胞的衰老,下调了*MMP-1*、*MMP-3*基因的表达,上调了*PC-1*基因的表达。【结论】TFE具有较强的体外抗氧化、抗炎活性,可通过抑制*MMP-1*和*MMP-3*基因的表达,提高*PC-1*基因的表达,来延缓细胞衰老,具有潜在的抗衰老活性。

关键词:茶树花;抗氧化;氧化应激;抗炎;基质金属蛋白酶;抗衰老

In Vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Tea Flower Extract and Its Inhibitory Effect on Cell Aging

YU Shishuai[1,2]　*HAO Yining*[1,3,4]　*PENG Bo*[1,4]　*LIU Youyun*[2]　*QU Liping*[1,3,4*]

(1. Yunnan Botanee Bio-technology Group Co., Ltd., Kunming 650106, China; 2. Shanghai Botanee Bio-technology Group Co., Ltd., Shanghai 201702, China; 3. Yunnan Characteristic Plant Extraction Laboratory Co., Ltd., Kunming 650106, China; 4. Shanghai Jiyan Bio-pharmaceutical Development Co., Ltd., Shanghai 201702, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to investigate the *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory activities of Yunnan tea flower extract (TFE) and its Inhibitory effect on cell aging. [**Method**] The main active components in TFE were determined by ultraviolet (UV)-visible spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC). The antioxidant and anti-inflammatory activities of TFE were determined by the free radical scavenging assay and UV-induced photoaging model of human keratinocytes (HaCaT), respectively. After the aging model of fibroblasts was established, the aging level of cells was assessed by the *β*-galactosidase (*β*-gal) staining assay, and the expression of matrix metalloproteinase-1 (*MMP-1*), matrix metalloproteinase-3 (*MMP-3*), and type I

基金项目:云南特色植物筛选与研发服务CXO平台建设项目(2022YKZY001);云南特色植物新原料自主研发及产业化项目(2023YKZY004)。

通信作者:曲丽萍(1976—),女,博士,高级工程师,主要从事功效植物研究与开发应用研究。Email: quliping@botanee.com

收稿日期:2024-10-17　**修回日期:**2025-02-17

procollagen (*PC-1)* were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. [**Result**] The mass fractions of total flavonoids, tea polyphenols, total proteins, and total sugars in TFE were 14.51%, 12.83%, 9.57%, and 50.34%, respectively. Ester-type catechins were the main tea polyphenols. The IC_{50} in scavenging DPPH and ABTS free radicals were 34.32 μg/mL and 227.79 μg/mL, respectively. TFE significantly inhibited reactive oxygen species (ROS) production-induced by UV in HaCaT cells, down-regulated the expression of *IL-6* and *TNF-α*, up-regulated the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (*Nrf2*) and heme oxygenase-1 (*HO-1*). In addition, TFE inhibited the aging of fibroblasts, down-regulated the expression of *MMP-1* and *MMP-3*, and up-regulated the expression of *PC-1*. [**Conclusion**] TFE had strong antioxidant and anti-inflammatory activities. It can down-regulated the expression of *MMP-1* and *MMP-3* and up-regulated the expression of *PC-1* to prevent cell aging, demonstrating potential anti-aging activity.

Keywords: tea flower; anti-oxidation; oxidative stress; anti-inflammatory; matrix metalloproteinase; anti-aging

茶树（*Camellia sinensis*（L.）O. Kuntze）是一种多年生常绿木本植物，原产于我国云贵川地区，是当地重要的经济作物之一，其芽叶常被采摘用于制茶[1]。茶树花作为茶树的繁殖结构，是一种含有雄蕊和雌蕊的双性花，其特点是花期长、开花多、结实少[2]。茶树花在过往被认为是与茶叶竞争营养的不良副产品，其营养价值易被忽视，未得到充分的开发利用。近年来，随着国内外学者对茶树花研究的不断深入，发现其与茶叶一样富含多种天然活性成分，如茶多酚、多糖、黄酮、咖啡碱（caffeine，CA）、氨基酸等[3-5]，但组成比例存在差异。此外，还有研究发现茶树花中的多种有益成分具有抗氧化、降血糖、降血脂和抗衰老等功效[1-3]。

皮肤衰老是一个受内、外因素影响的生物学过程。内源性衰老主要由mRNA和激素引起，外源性衰老则由环境污染和紫外线辐照引起，这些因素共同加速了皮肤衰老[6]。角质细胞是表皮层中的主要细胞，起到抵御外部环境的物理屏障作用[7]。成纤维细胞存在于真皮层中，是疏松结缔组织的主要细胞成分，具备合成胶原蛋白、黏连蛋白以及分泌胶原纤维、弹性纤维、网状纤维的能力[8]。紫外线的过度辐照会导致皮肤稳态失衡，引发氧化应激，从而触发基质金属蛋白酶的过度表达来破坏皮肤真皮层中的胶原蛋白组成，加速皮肤老化过程，甚至引起皮肤疾病，如炎症、皱纹形成、不规则色素沉着和水分流失[9]。茶树花中的抗氧化成分，如茶多酚、黄酮类化合物等，是抵抗外源性衰老因素的有效成分。这些抗氧化成分能够中和自由基，减轻氧化应激对皮肤的损害，从而保护皮肤免受紫外线和环境污染的侵害，减缓皮肤老化的速度[3-4,10]。

目前国内外已有研究报道了茶树花具有较强的抗氧化活性，而其潜在的抗衰老活性鲜有报道。因此，作者选用HaCaT细胞和人成纤维细胞作为体外试验模型，系统评估了TFE的抗氧化、抗炎与抗衰老活性，探索TFE在抑制氧化应激、炎症反应和延缓细胞衰老方面的作用机制，为茶树花在功能性食品和大健康领域的多元化开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

茶树花：采摘于云南省普洱市景谷茶区，贮存于云南云科特色植物提取实验室有限公司；PBS缓冲液（pH 7.2）、3-没食子酰基奎宁酸（3-galloylquinic acid，3-GQA）、没食子酸（gallic acid，GA）、表没食子儿茶素（epigallocatechin，EGC）、儿茶素（catechin，CAT）、表儿茶素（epicatechin，EC）、表没食子儿茶素没食子酸酯（epigallocatechin gallate，EGCG）、没食子儿茶素没食子酸酯（gallocatechin gallate，GCG）、表儿茶素没食子酸酯（epicatechin gallate，ECG）：色谱纯（纯度≥98%），上海源叶生物科技有限公司；CA：色谱纯（纯度≥98%），上海纯优生物科技有限公司；甲醇、乙腈：色谱纯，上海麦克林生化科技有限公司；其余试剂均为分析纯；试验用水为经Mili-Q纯化的超纯水；ROS检测试剂盒、CCK-8试剂盒、细胞衰老β-gal染色试剂盒：上海碧云天生物技术股份有限公司；DPPH自由基清除能力测定试剂盒、ABTS自由基清除能力测定试剂盒：南京建成生物工程研究所有限公司；HaCaT细胞、人包皮成纤维（HFF）细胞，人真皮成纤维（HDFa）细胞：中国科学院细胞库；DMEM培养基、胎牛血清（FBS）、质量分数0.25%胰酶溶液：美国Gibco公司。

1.2 主要仪器

HPLC：Agilent 1260 型，美国 Agilent 公司；全波长酶标仪：Multiskan SkyHigh 型，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；高速冷冻离心机：Fresco 21 型，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；流式细胞仪：FACSCanto II型，美国 BD 公司；实时荧光定量 PCR（real-time quantitative PCR，qPCR）仪：LightCycler 96 型，瑞士 Roche 公司。

1.3 方法

1.3.1 TFE 的制备

称取干燥后的茶树花置于提取罐中，按照料液比 1 g∶20 mL 加入超纯水，进行加热回流提取，提取 2 次后，经过滤、浓缩、灭菌、冷冻干燥得到 TFE。

1.3.2 主要营养成分测定

参照 GB/T 15672—2009《食用菌中总糖含量的测定》，测定 TFE 中总糖质量分数。按照参考文献[1]中的方法，采用分光光度计法测定 TFE 中总黄酮的质量分数。参照 GB/T 8313—2018《茶叶中茶多酚和儿茶素类含量的检测方法》，采用福林酚法测定 TFE 中茶多酚的质量分数。参照 GB 5009.5—2025《食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定》，采用凯氏定氮法测定 TFE 中总蛋白质的质量分数。

1.3.3 TFE 中主要酚类物质的 HPLC 分析

采用 HPLC 法对 TFE 中的 CA、GA、3-GQA、EGC、CAT、EC、EGCG、GCG、ECG 进行定量分析。参照师梦楠等[1]的方法并稍加改动，HPLC 检测条件：选取 Agilent ZORBAX SB-Aq 色谱柱（250 mm×4.6 mm×5 μm）；流动相 A 为体积分数 0.1% 的甲酸水溶液，流动相 B 为乙腈；流量为 1 mL/min，进样量为 10 μL，波长设置为 280 nm。梯度洗脱程序：在 3~8 min，流动相 A 体积分数由 99.5% 降至 98.0%；在 8~15 min，流动相 A 体积分数由 98.0% 降至 90.0%；在 15~25 min，流动相 A 体积分数由 90.0% 降至 80.0%；在 25~35 min，流动相 A 体积分数由 80.0% 降至 70.0%；在 35~45 min，流动相 A 体积分数由 70.0% 降至 50.0%。

1.3.4 DPPH 自由基清除能力测定

选用维生素 C（VC）作为阳性对照，样品和阳性对照溶液配制均以 1.00 mg/mL 为起始质量浓度，依次向下稀释 5 个梯度。根据 DPPH 自由基清除能力测定试剂盒说明书进行操作，96 孔板避光反应 30 min 后，在波长 517 nm 处测定 OD 值，DPPH 自由基清除率按照式（1）计算。

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

式中：

X——自由基清除率，%；

A_1——样品组 OD 值；

A_2——对照组 OD 值；

A_0——空白组 OD 值。

1.3.5 ABTS 自由基清除能力测定

选用 VC 作为阳性对照，样品和阳性对照溶液配制均以 1.00 mg/mL 为起始质量浓度，依次向下稀释 5 个梯度。根据 ABTS 自由基清除能力测定试剂盒说明书进行操作，96 孔板避光反应 6 min 后，在波长 734 nm 处测定 OD 值，ABTS 自由基清除率按照式（1）计算。

1.3.6 UV 诱导的 HaCaT 细胞光老化模型

1）TFE 对 HaCaT 细胞活力的影响：将复苏后的细胞接种于 10 cm 的细胞培养皿中，加入 10 mL 完全培养基（由 FBS 和 DMEM 培养基按体积比 1∶9 配制），置于 37 ℃、体积分数 5% CO_2 的细胞培养箱中孵育。待细胞生长面积达到培养皿底面积的 80% 以上时，进行传代并开展后续试验。采用 CCK-8 法测定 HaCaT 细胞的细胞活力[11]，避光操作，并使用酶标仪在波长 450 nm 处测定 OD 值。细胞活力根据式（2）计算。

$$V=\frac{A_s-A_k}{A_c-A_k}\times 100\% \quad (2)$$

式中：

V——细胞活力，%；

A_s——样品组 OD 值；

A_c——对照组 OD 值；

A_k——空白组 OD 值。

2）TFE 对长波紫外线（UVA）诱导的 HaCaT 细胞中 ROS 相对含量的影响：将模型组细胞和 TFE 低、中、高质量浓度（分别为 125、250、500 μg/mL）组的细胞暴露在 15 J/cm^2 紫外线辐照下，采用 3T3 NRU 紫外辐照计，剂量为 2 mW/cm^2，辐照时间为 2 h。将空白组置于相同的环境下，但不进行紫外线辐照。紫外线辐照结束后，所有组别均置于细胞培养箱中避光稳定 1 h。按照试剂盒要求以 1∶1 000 稀释 2’,7’-二氯荧光素二乙酸酯（2’,7’-dichlorofuorescin diacetate，DCFH-DA）并进行后续操作，最后使用流式细胞仪检测 ROS 相对含量。

3）TFE 对中波紫外线（UVB）诱导的 HaCaT 细胞中 *IL-6*、*TNF-α* 基因的 mRNA 相对表达量的影

响：将模型组和低、中、高质量浓度组细胞暴露于12 mJ/cm^{2}的UVB辐照（辐照仪处理时间25 s）后，立即更换为对应的培养基，并在37 ℃培养箱中孵育24 h。空白组在相同环境下培养但未进行UVB辐照。收集细胞上清液并按照ELISA试剂盒说明书操作，分别检测上清液中*TNF-α*、*IL-6*基因的mRNA相对表达量。

4）TFE对UVB诱导的HaCaT细胞中*Nrf2*、*HO-1*基因的mRNA相对表达量的影响：对模型组和低、中、高质量浓度组细胞给药处理24 h后，UVB辐照形成光老化损伤模型，提取RNA，逆转录为cDNA后，进行qPCR分析，检测*Nrf2*、*HO-1*基因的mRNA相对表达量。

1.3.7　TFE对人成纤维细胞的相关影响

用*D*-半乳糖（*D*-galactose，*D*-gal）诱导HDFa细胞衰老，将TFE作用于该细胞，通过*β*-gal染色，在普通光学显微镜下观察TFE对细胞衰老的影响。再通过H_2O_2刺激HFF和HDFa细胞，将TFE作用于该细胞，检测细胞外基质相关基因的表达情况。

1）TFE对HDFa和HFF细胞的细胞活力的影响：将TFE样品稀释成不同质量浓度（15~500 μg/mL），同空白组和对照组一起，分别处理对数生长期的HDFa和HFF细胞24 h，按照CCK-8试剂盒说明书测定细胞活力，计算方式与式（2）相同。

2）TFE对细胞衰老的影响：按照参考文献[12]中的方法，根据细胞衰老*β*-gal染色试剂盒说明书步骤检测HDFa细胞衰老情况，通过光学显微镜观察并拍照，使用Image J软件计算细胞中与衰老相关的阳性细胞（蓝色，分泌*β*-gal）的数量。

3）TFE对相关基因表达的影响：按照参考文献[13]中的方法，提取RNA并进行RNA逆转录，然后进行qPCR分析，测定*MMP-1*、*MMP-3*、*PC-1*基因的mRNA相对表达量。

1.4　统计学分析

采用SPSS 26.0软件进行统计学分析，采用GraphPad Prism 8.0软件绘图，采用*t*检验或单因素方差分析处理所有数据，数据以平均值±标准差表示，当$P<0.05$时，表明差异具有统计学意义。

2　结果与讨论

2.1　TFE的营养成分分析

TFE中总糖、总黄酮、茶多酚和总蛋白质的质量分数分别为50.34%、14.51%、12.83%、9.57%。通过HPLC对TFE中的主要营养成分进行测定，结果如图1、表1所示。共检测出9种单体，其中6种是儿茶素单体化合物，包括非酯型儿茶素（EGC、CAT、EC）和酯型儿茶素（EGCG、GCG、ECG）。此外，TFE中还含有较多的GA、3-GQA和CA。已有研究表明[1]，茶树花水提物中主要成分为茶多酚、黄酮、CA和氨基酸等物质，其质量分数范围分别为 7.74%~13.56%、4.21%~8.63%、4.98%~8.46%、1.61%~5.91%。经加热回流提取后的TFE中含有较高的总黄酮、茶多酚及一些单体化合物（CAT、EC、GCG等）。其中酯型儿茶素质量分数为21.35 mg/g，高于非酯型儿茶素（13.70 mg/g），表明TFE中的茶多酚以酯型儿茶素为主，与师梦楠等[1]的研究结果一致，与黄艳等[14]的研究结果相反，推测可能是由于产地、品种和提取方式等不同导致了TFE中各活性成分的差异。

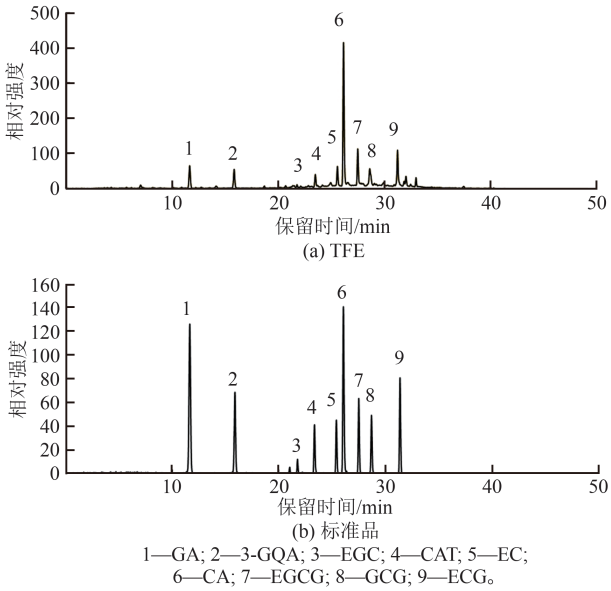


图1　TFE及标准品的HPLC图

Fig. 1　HPLC profiles of TFE and standards

表1　TFE中主要活性成分

Table 1　Main active compounds in TFE

序号	保留时间/min	活性物质	线性方程	R^2	质量分数/（mg/g）
1	11.600	GA	y=20.889x+38.989	0.999 5	2.53±0.02
2	15.738	3-GQA	y=11.043x−10.052	0.999 0	4.60±0.03
3	21.739	EGC	y=1.919 1x+3.897 7	0.999 5	2.29±0.01
4	23.314	CAT	y=6.038 4x+1.698 1	1.000 0	5.25±0.03
5	25.459	EC	y=6.977x−2.045	0.999 7	6.16±0.03
6	26.075	CA	y=21.483x+35.192	0.999 9	14.48±0.02
7	27.590	EGCG	y=11.945x−29.764	0.999 4	7.99±0.03
8	28.804	GCG	y=12.121x−49.839	0.999 6	6.34±0.01
9	31.524	ECG	y=14.65x−18.555	0.999 7	7.02±0.02

2.2 TFE 的体外抗氧化活性分析

DPPH 和 ABTS 自由基清除能力的大小常用来反映样品的抗氧化活性强弱。如图 2 所示，在 TFE 质量浓度为 31.25~1 000.00 μg/mL 时，TFE 与 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力呈现出剂量依赖性。当质量浓度达到 1 000.00 μg/mL 时，TFE 的 DPPH 与 ABTS 自由基清除率分别达到了 88.69% 和 85.35%，IC_{50} 分别为 34.32 μg/mL 和 227.79 μg/mL。已有研究报道了 10 余种云南不同地区 TFE 的体外抗氧化活性，其 DPPH 和 ABTS 自由基清除率分别为 41.85%~80.98% 和 59.63%~86.73%[1]，这一结果与 TFE 中茶多酚（EGCG、ECG）质量分数的差异有关，茶多酚质量分数越高，抗氧化效果越好。另有研究表明，TFE 中的黄酮类成分具有较强的自由基清除能力，且主要以黄酮苷的形式存在，少量以苷元的形式存在[14]。在本工艺条件下得到的 TFE 具有较强的体外抗氧化活性，可能与其富含茶多酚和黄酮类物质有关。

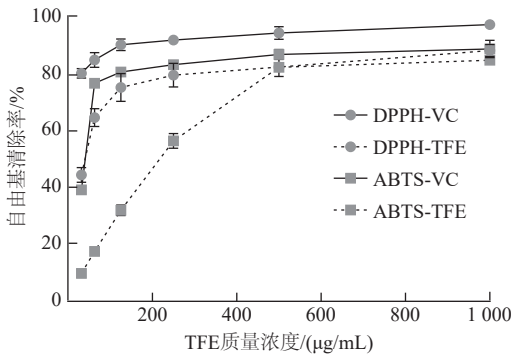


图 2 TFE 的体外抗氧化活性

Fig. 2 *In vitro* antioxidant activity of TFE

如图 3 所示，在试验质量浓度范围内，HaCaT 细胞生长状态稳定；经 UVA 辐照后，HaCaT 细胞内 ROS 相对含量极其显著增加（P<0.001）。与模型组相比，低质量浓度 TFE 对 ROS 的产生具有显著的抑制效果（P<0.05），使其相对含量下降了 54.23%。紫外线辐照是造成皮肤生物性损伤的重要原因之一，其中波长范围在 320~400 nm 的 UVA 具有极强的穿透性，长久的辐照会导致皮肤细胞中 ROS 增加，使皮肤细胞内部稳态失衡，造成蛋白质发生氧化性损伤，进而诱导皮肤衰老[15]。结果表明，TFE 可通过减少氧化应激造成的 ROS 过度产生，减轻紫外线辐照对表皮层中 HaCaT 细胞的损害。已有研究表明，EGCG 可通过激活 *Nrf2* 基因，促进抗氧化基因的转录，从而提高过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的酶活力，维持正常的 ROS 水平，保护细胞免受氧化应激损伤[16]。EGCG 是茶树花多酚中质量分数最高的单体化合物，因此推测 TFE 的抗氧化机制可能与激活 *Nrf2* 基因有关。

2.3 TFE 的体外抗炎活性

紫外线中除了穿透力较强的 UVA 以外，还存在波长为 290~320 nm 的 UVB，其致红斑作用比 UVA 强千倍。UVB 能在短时间内使皮肤晒伤、晒红，造成严重的皮肤炎症[17]。如图 4 所示，经 UVB 辐照后，HaCaT 细胞内 *IL-6*、*TNF-α* 基因的 mRNA 相对表达量均极其显著上升（P<0.001）。与模型组相比，高质量浓度组、中质量浓度组的

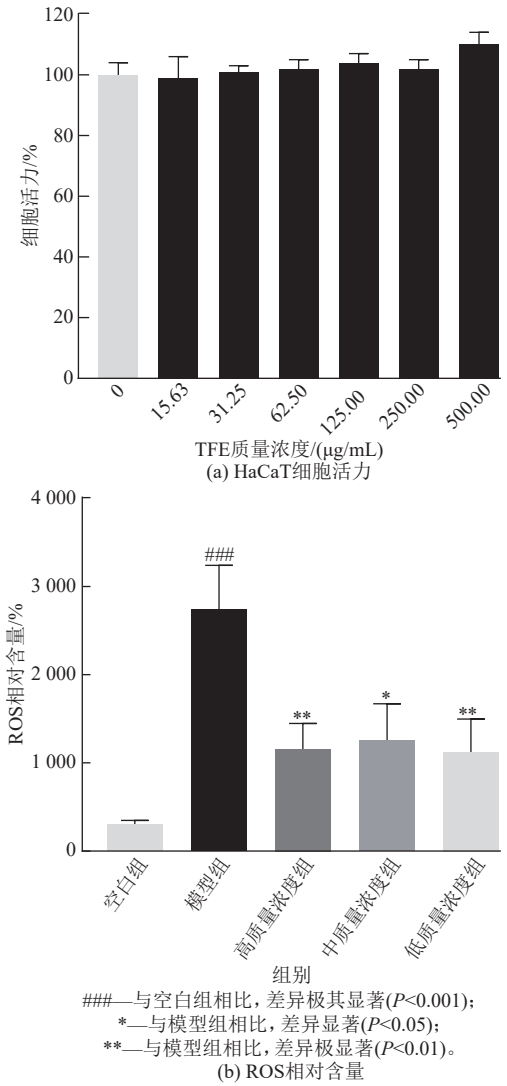
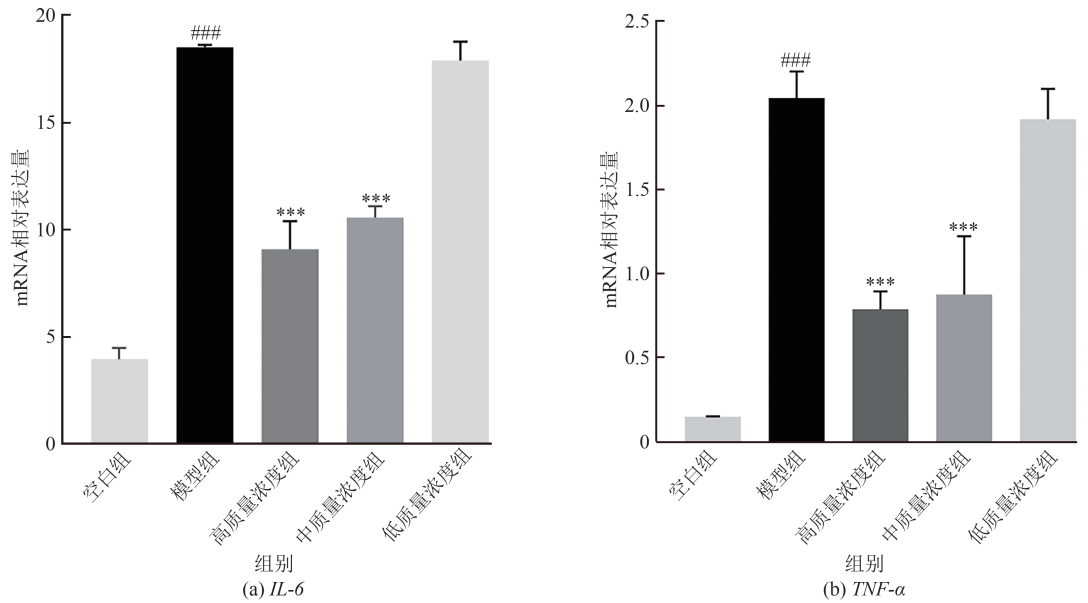


图 3 TFE 对 HaCaT 细胞活力和 ROS 相对含量的影响

Fig. 3 Effects of TFE on the viability of HaCaT cells and the relative content of ROS

细胞中*IL-6*、*TNF-α*基因的mRNA相对表达量均极其显著下降（P<0.001），其在中质量浓度组中分别下降了37.80%和56.15%。结果表明，TFE可通过下调炎症因子IL-6、TNF-α的表达，来缓解紫外线辐照引起的表皮层中HaCaT细胞的炎症反应。相关研究表明，黄酮类化合物具有显著的抗炎作用，其作用机制与影响前列腺素、抑制炎性细胞因子产生、影响细胞信号传导途径等有关[4]。吴海英等[18]发现金花茶提取物能显著降低小鼠耳肿胀模型血清中*IL-6*、*TNF-α*基因的表达，具有一定的抗炎作用，且其成分与TFE相似，主要为黄酮类化合物。



###—与空白组相比，差异极其显著(P<0.001)；***—与模型组相比，差异极其显著(P<0.001)。

图4　TFE对炎症因子*IL-6*、*TNF-α*基因的mRNA相对表达量的影响

Fig. 4　Effects of TFE on the mRNA relative expression of *IL-6* and *TNF-α* genes

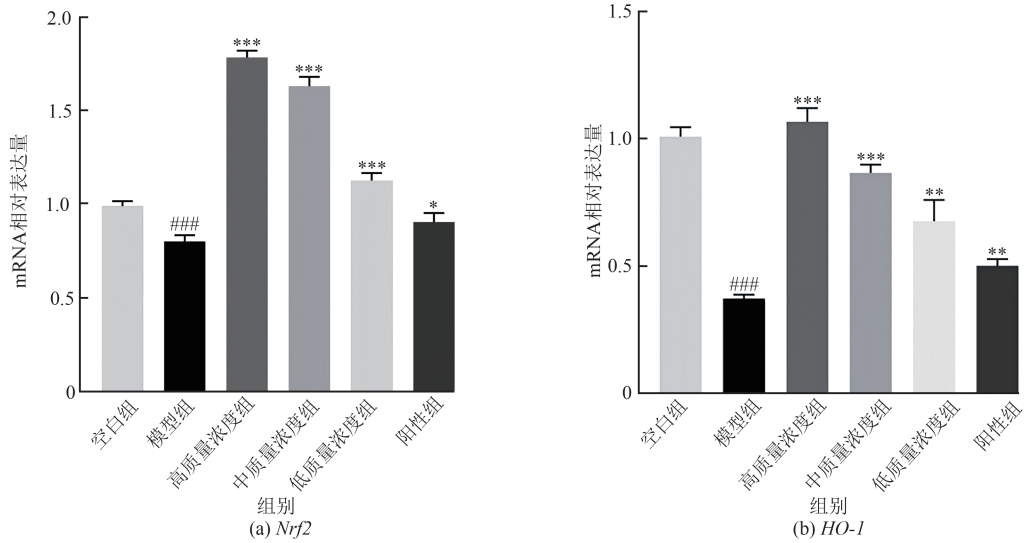
2.4　TFE对Nrf2/HO-1信号通路的影响

Nrf2作为一种关键的氧化应激响应性转录因子，具有高度敏感性，它能够在细胞受到氧化应激时迅速被激活[19-20]。Nrf2通过与下游的HO-1等细胞核中的抗氧化反应元件相结合，促进一系列抗氧化基因的高效转录，维持细胞内部的氧化还原稳态[21-23]。激活*Nrf2*基因可在一定程度上减缓细胞衰老，而下调*Nrf2*基因表达则会加重氧化应激并上调炎症因子的表达，进而加速细胞衰老[24-25]。为明确TFE是否通过调控Nrf2/HO-1通路发挥作用，作者进一步检测了该通路中关键基因的mRNA相对表达量，见图5。经UVB辐照后，细胞中*Nrf2*、*HO-1*基因的mRNA相对表达量极显著降低（P<0.001）。相比于模型组，中、高质量浓度组细胞中*Nrf2*、*HO-1*基因的mRNA相对表达量均极其显著上升（P<0.001），低质量浓度组细胞中*Nrf2*基因的mRNA相对表达量也极其显著上升（P<0.001），*HO-1*基因的mRNA相对表达量极显著上升（P<0.01）。*Nrf2*、*HO-1*基因的表达均呈剂量依赖性，且在低质量浓度组中的mRNA相对表达量分别上升了40.42%、81.08%。结果表明，TFE可通过激活Nrf2/HO-1信号通路发挥抗衰老活性。此外，张颖杰等[26]的研究发现，EGCG可同时上调*Nrf2*、*HO-1*基因的表达及其对应蛋白质的表达，下调衰老相关蛋白质（P53、P21）的表达量，通过激活Nrf2/HO-1信号通路延缓内皮细胞衰老。

2.5　TFE的体外抗衰老活性分析

2.5.1　TFE对由*D*-gal诱导的HDFa细胞衰老的影响

细胞衰老是皮肤衰老的主要原因之一。随着成纤维细胞的衰老，*β*-gal活性增加，使用*D*-gal作为底物进行原位染色后，会生成深蓝色产物，标识为SA-*β*-gal阳性细胞[27-28]。通过观察*β*-gal染色结果评价TFE对人成纤维细胞衰老的延缓作用。如图6（a）所示，在试验质量浓度范围内，HDFa细胞生长状态稳定。空白组、模型组、TFE组细胞的*β*-gal染色情况见图6（b），SA-*β*-gal阳性细胞计数结果见图6（c）。*D*-gal处理后，蓝色的SA-*β*-gal阳性细胞显著增加，

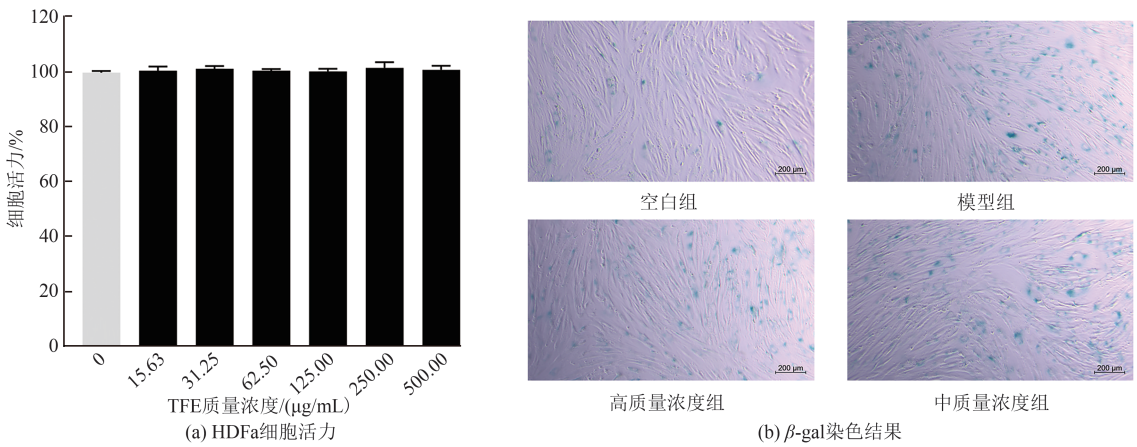


(a) *Nrf2* (b) *HO-1*

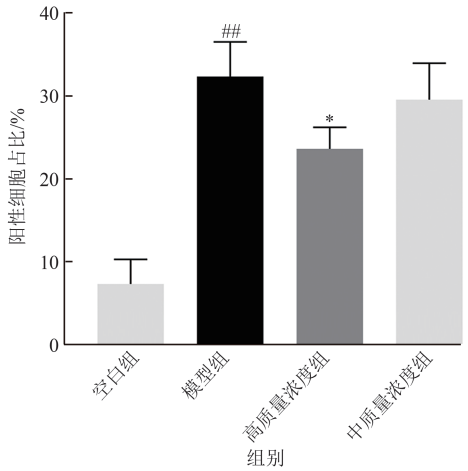
###—与空白组相比, 差异极其显著(P<0.001)；*—与模型组相比, 差异显著(P<0.05)；
—与模型组相比, 差异极显著(P<0.001)；*—与模型组相比, 差异极其显著(P<0.001)。

图 5　TFE 对 Nrf2/HO-1 信号通路的影响

Fig. 5　Effects of TFE on the Nrf2/HO-1 signaling pathway



(a) HDFa细胞活力　(b) β-gal染色结果



##—与空白组相比, 差异极显著(P<0.01)；
*—与模型组相比, 差异显著(P<0.05)。
(c) SA-β-gal阳性细胞占比

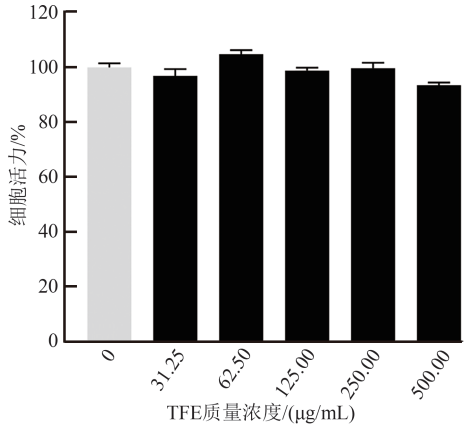
图 6　TFE 对 HDFa 细胞活力和 β-gal 染色结果的影响

Fig. 6　Effects of TFE on the viability and β-gal staining results of HDFa cells

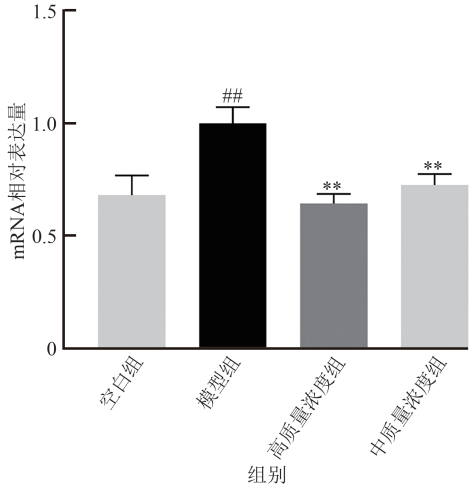
占比上升至32.43%，符合细胞衰老特征，表明模型建立成功。经高质量浓度（500 μg/mL）TFE处理后，*β*-gal催化下生成的蓝色产物显著减少（$P<0.01$），占比降至23.68%，下降了26.98%，说明细胞衰老状态减轻。由此可见，TFE有效降低了*D*-gal刺激下HDFa细胞产生的SA-*β*-gal阳性细胞的数量，对细胞衰老具有延缓作用。Baeeri等[29]发现，GA可显著降低大鼠胚胎成纤维细胞中SA-*β*-gal阳性细胞数量，减少炎症因子和氧化应激标记物的表达，并提高线粒体复合物的水平，发挥抗细胞衰老的作用。因此，TFE抵抗细胞衰老的作用机制还可能与GA调节线粒体复合物有关。

2.5.2　TFE对人成纤维细胞相关的mRNA表达的影响

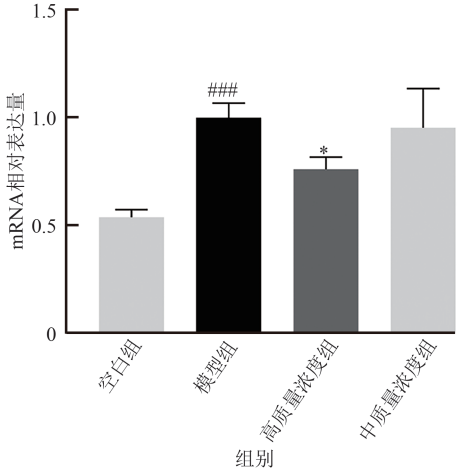
MMP-1是降解I型和III型胶原蛋白的最主要的酶，当其过度表达时，会使真皮细胞外基质中的胶原蛋白降解和弹性蛋白纤维恶化，导致皮肤出现皱纹等衰老表现[30]。MMP-3能进一步降解被MMP-1剪切的胶原蛋白片段，导致人皮肤中I型胶原蛋白的流失，从而加速皮肤衰老过程，两者通常协同作用，共同破坏皮肤结构的完整性[31-32]。因此，进一步对*MMP-1*、*MMP-3*基因的表达进行了研究，探究TFE延缓细胞衰老是否与抑制其表达相关。如图7所示，在试验质量浓度范围内，HFF细胞生长状态稳



(a) HFF细胞活力



##—与空白组相比，差异极显著（$P<0.01$）；
**—与模型组相比，差异极显著（$P<0.01$）。
(b) *MMP-1*



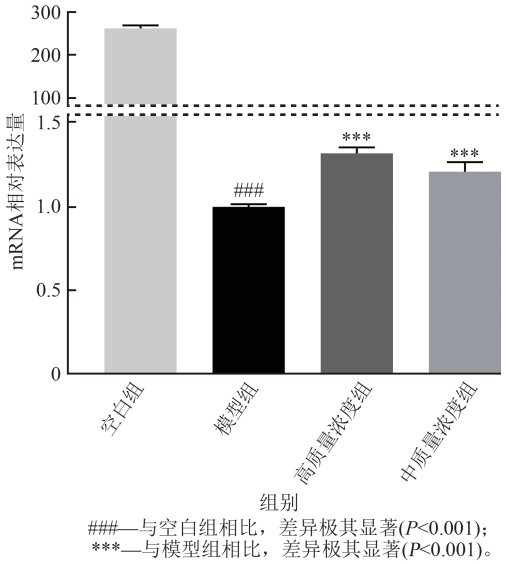
###—与空白组相比，差异极其显著（$P<0.001$）；
*—与模型组相比，差异显著（$P<0.05$）。
(c) *MMP-3*

图7　TFE对HFF细胞活力、*MMP-1*和*MMP-3*基因的mRNA相对表达量的影响

Fig. 7　Effects of TFE on the viability and the the mRNA relative expression of *MMP-1* and *MMP-3* genes of HFF cells

定；经 H_2O_2 诱导后，HFF 细胞中 *MMP-1* 基因的 mRNA 相对表达量极显著上升（$P<0.01$），*MMP-3* 基因的 mRNA 相对表达量极其显著上升（$P<0.001$）。在加入高质量浓度（500 μg/mL）TFE 后，与模型组相比，*MMP-1*、*MMP-3* 基因的 mRNA 相对表达量显著下降，分别下降了 35.73%（$P<0.01$）和 23.87%（$P<0.05$）。结果表明，TFE 能够有效抑制 H_2O_2 诱导的 HFF 细胞中 *MMP-1*、*MMP-3* 基因的表达，从而对预防真皮层中胶原蛋白的降解和流失造成的皮肤衰老发挥积极作用。相关研究表明，TFE[33]和石榴提取物[34]中的儿茶素类化合物对 UV 诱导的人成纤维细胞中 *MMP-1* 基因的表达具有显著的抑制作用，且山茶花提取物中的 EGCG 和 GCG 的抑制效果尤为突出。作为 TFE 的主要活性成分，EGCG 和 GCG 是有效预防胶原蛋白降解和流失的重要物质，但其作用机制仍需进一步研究。

成纤维细胞是皮肤真皮层中的主要细胞，负责合成前胶原蛋白并转化为胶原蛋白，而胶原蛋白是维持皮肤弹性和张力的重要成分[35]。除了 MMP-1、MMP-3 能引起胶原蛋白降解外，PC-1 合成的减少也是影响细胞衰老的重要原因之一[36-37]，因此进一步研究了 TFE 对 *PC-1* 基因表达的影响。如图 8 所示，与空白组相比，H_2O_2 诱导后的 HDFa 细胞中 *PC-1* 基因的 mRNA 相对表达量极其显著下降（$P<0.001$），表明造模成功。与模型组相比，加入中、高质量浓度（250、500 μg/mL）TFE 后，极其显著上调了 *PC-1* 基因的 mRNA 相对表达量（$P<0.001$），中质量浓度组增加了 21.25%，且随着 TFE 质量浓度的升高，*PC-1* 基因的 mRNA 相对表达量持续上升。结果表明，TFE 可有效上调 H_2O_2 诱导的 HDFa 细胞中 *PC-1* 基因的表达，具有促进 PC-1 的合成和延缓皮肤衰老的潜力。相关研究发现[38]，富含多酚和黄酮的龙葵提取物虽可显著抑制 H_2O_2 刺激的成纤维细胞的 *MMP-1*、*MMP-3* 基因的表达，却不能上调 *PC-1* 基因的表达。Bravo 等[39]对西番莲提取物的抗衰老活性进行了研究，发现其原花青素和黄酮类成分可通过促进 PC-1 分泌来减轻成纤维细胞衰老。



###—与空白组相比，差异极其显著（$P<0.001$）；
***—与模型组相比，差异极其显著（$P<0.001$）。

图 8　TFE 对 *PC-1* 基因的 mRNA 相对表达量的影响

Fig. 8　Effects of TFE on the mRNA relative expression of *PC-1* gene

3　结论

综上所述，云南 TFE 富含黄酮、茶多酚等物质，其中茶多酚以酯型儿茶素类化合物为主。TFE 具有较强的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力，显著抑制 HaCaT 细胞中 ROS 的生成和 *IL-6*、*TNF-α* 基因的表达，并上调 *Nrf2*、*HO-1* 基因的表达。在人成纤维细胞中，TFE 有效抑制了 *D*-gal 诱导的 SA-*β*-gal 阳性细胞的产生，下调 *MMP-1*、*MMP-3* 基因的表达，并上调 *PC-1* 基因的表达。TFE 通过发挥抗氧化、抗炎活性，减缓紫外线对皮肤表皮层主要细胞的损伤，并通过阻止胶原降解和促进 PC-1 的合成，对真皮层中主要细胞的衰老起到延缓作用。基于这些活性，TFE 在抗衰老产品中具有潜在的应用价值，特别是在缓解氧化应激和炎症反应、维持皮肤屏障功能，以及促进真皮层结构完整性方面。此外，TFE 作为一种天然来源的功能性成分，未来可应用于抗氧化补充剂或美容食品中。

参考文献

[1] 师梦楠，彭云，张杰，等. 云南大叶种茶树花生化成分及体外抗氧化活性研究[J]. 食品工业科技，2022，43（16）：298-306.
SHI M N，PENG Y，ZHANG J，et al. Biochemical components and *in vitro* antioxidant activities of large-leaf species tea flowers in Yunnan[J]. Science and Technology of Food Industry，2022，43（16）：298-306.（in Chinese）

[2] 黄阿根，董瑞建，韦红. 茶树花活性成分的分析与鉴定[J]. 食品科学，2007，28（7）：400-403.
HUANG A G，DONG R J，WEI H. Identification and analysis of major bioactive compounds in tea flower[J]. Food Science，2007，28（7）：400-403.（in Chinese）

[3] 李红蝶，肖田，李亦龙，等. 茶树花的功能成分及相关产

品研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2024，15(6)：117-123.
LI H D，XIAO T，LI Y L，et al. Research progress on functional components of *Camellia sinensis* and related products[J]. Journal of Food Safety & Quality，2024，15(6)：117-123.(in Chinese)

[4] 生吉萍，宿文凡，石家豪，等. 茶树花黄酮类化合物研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2022，13(4)：1019-1026.
SHENG J P，SU W F，SHI J H，et al. Research progress of flavonoids in tea flower[J]. Journal of Food Safety & Quality，2022，13(4)：1019-1026.(in Chinese)

[5] MATSUDA H，NAKAMURA S，MORIKAWA T，et al. New biofunctional effects of the flower buds of *Camellia sinensis* and its bioactive acylated oleanane-type triterpene oligoglycosides[J]. Journal of Natural Medicines，2016，70(4)：689-701.

[6] 罗珍，宁初光，李祚禛，等. 番茄、野樱莓提取物抗光老化功效及机制研究[J]. 食品工业科技，2023，44(16)：395-402.
LUO Z，NING C G，LI Z Z，et al. Anti-photoaging effect and mechanism of tomato and *Aronia melanocarpa* extract[J]. Science and Technology of Food Industry，2023，44(16)：395-402.(in Chinese)

[7] 常子怡，王广莲，汤雯珺，等. 光老化对皮肤角质形成细胞中转录组学相关基因表达的影响[J]. 中国皮肤性病学杂志，2024，38(6)：612-619.
CHANG Z Y，WANG G L，TANG W J，et al. Effect of photoaging on transcriptomic-related gene expression in skin keratinocytes [J]. The Chinese Journal of Dermatovenereology，2024，38(6)：612-619.(in Chinese)

[8] 任倩倩，袁永雷，曲丽萍. 影响皮肤光老化信号通路的植物提取物[J]. 日用化学品科学，2023，46(3)：34-41.
REN Q Q，YUAN Y L，QU L P. Plant extracts affecting skin photoaging signaling pathways [J]. Detergent & Cosmetics，2023，46(3)：34-41.(in Chinese)

[9] OH J H，JOO Y H，KARADENIZ F，et al. Syringaresinol inhibits UVA-induced MMP-1 expression by suppression of MAPK/AP-1 signaling in HaCaT keratinocytes and human dermal fibroblasts [J]. International Journal of Molecular Sciences，2020，21(11)：3981.

[10] 陈誉，罗磊，王硕，等. 咖啡果壳多酚的提取及抗氧化和抗炎特性[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(8)：104-111.
CHEN Y，LUO L，WANG S，et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of polyphenols extracted from coffee cherry husks[J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2022，41(8)：104-111.(in Chinese)

[11] 张慧娥，杜连云，初孟瑶，等. 人参叶通过抑制细胞活性氧的积累延缓皮肤衰老[J]. 食品工业科技，2024，45(3)：328-337.
ZHANG H E，DU L Y，CHU M Y，et al. Ginseng folium attenuates skin aging by limiting the accumulation of cellular reactive oxygen species [J]. Science and Technology of Food Industry，2024，45(3)：328-337.(in Chinese)

[12] 蔡春梅，黄玉叶，李丽燕，等. 黄芩提取物抗UVA诱导NIH3T3细胞光老化的作用[J]. 食品工业科技，2024，45(12)：327-333.
CAI C M，HUANG Y Y，LI L Y，et al. *Scutellaria baicalensis* extract inhibits the UVA-induced photoaging in NIH3T3 cells[J]. Science and Technology of Food Industry，2024，45(12)：327-333.(in Chinese)

[13] 陈建芳，刘思思，张彤赫，等. 银耳多糖的抗氧化活性及对成纤维细胞蛋白基因表达的影响[J]. 现代食品科技，2024，40(7)：64-71.
CHEN J F，LIU S S，ZHANG T H，et al. Antioxidant activity of *Tremella* polysaccharide and its effect on fibroblast protein gene expression [J]. Modern Food Science and Technology，2024，40(7)：64-71.(in Chinese)

[14] 黄艳，商虎，朱嘉威，等. 加工工艺对茶树花品质及抗氧化活性的影响[J]. 食品科学，2020，41(11)：165-170.
HUANG Y，SHANG H，ZHU J W，et al. Effects of processing treatments on quality and antioxidant activity of tea plant flower[J]. Food Science，2020，41(11)：165-170.(in Chinese)

[15] QU L P，WANG F F，CHEN Y Y. Protective effect and mechanism research of *Phyllanthus emblica* Linn. fruit extract on UV-induced photodamage in keratinocytes[J]. Photochemical & Photobiological Sciences，2023，22(8)：1945-1959.

[16] 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 H X，SHAO M R，HONG T C，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.(in Chinese)

[17] 武思敏，袁梅，满佳旭，等. 绿原酸对UVB损伤人永生化表皮角质细胞的保护作用[J]. 食品与生物技术学报，2023，42(5)：96-101.
WU S M，YUAN M，MAN J X，et al. Protective effect of chlorogenic acid on UVB damaged HaCaT cells [J]. Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(5)：96-101.(in Chinese)

[18] 吴海英，黄倩倩，李诗华，等. 金花茶花活性组分成分分析及抗炎作用[J]. 食品与发酵工业，2024，50(8)：197-203.
WU H Y，HUANG Q Q，LI S H，et al. Component analysis and anti-inflammatory activity of active ingredients from *Camellia nitidissima* Chi flower [J]. Food and Fermentation Industries，2024，50(8)：197-203.

（in Chinese）

[19] FIORELLI S，PORRO B，COSENTINO N，et al. Activation of Nrf2/HO-1 pathway and human atherosclerotic plaque vulnerability：an *in vitro* and *in vivo* study[J]. Cells，2019，8(4)：356.

[20] NITURE S K，KHATRI R，JAISWAL A K. Regulation of Nrf2：an update[J]. Free Radical Biology and Medicine，2014，66：36-44.

[21] HU D，PAWLIKOWSKA L，KANAYA A，et al. Serum insulin-like growth factor-1 binding proteins 1 and 2 and mortality in older adults：the health，aging，and body composition study [J]. Journal of the American Geriatrics Society，2009，57(7)：1213-1218.

[22] CHAIPRASONGSUK A，PANICH U. Role of phytochemicals in skin photoprotection *via* regulation of Nrf2[J]. Frontiers in Pharmacology，2022，13：823881.

[23] ZHOU J Z，CHEN F H，YAN A M，et al. Madecassoside protects retinal pigment epithelial cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress and apoptosis through the activation of Nrf2/HO-1 pathway [J]. Bioscience Reports，2020，40(10)：BSR20194347.

[24] FULOP G A，KISS T，TARANTINI S，et al. *Nrf2* deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation [J]. GeroScience，2018，40(5/6)：513-521.

[25] SUN J M，LIU Y X，LIU Y D，et al. Salvianolic acid B protects against UVB-induced skin aging *via* activation of *NRF2*[J]. Phytomedicine，2024，130：155676.

[26] 张颖杰，王绫欢，马焱，等. EGCG 通过 Nrf2/HO-1 信号通路延缓内皮细胞衰老的实验研究[J]. 中国心血管病研究，2024，22(6)：571-576.
ZHANG Y J，WANG L H，MA Y，et al. Experimental study on EGCG delaying endothelial cell senescence *via* Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Chinese Journal of Cardiovascular Research，2024，22(6)：571-576.（in Chinese）

[27] 梅早菊，吴信浪，曲丽萍. 云南腾冲牛至精油成分及其抗炎和抗衰老活性特征[J]. 中国食品添加剂，2024，35(4)：192-200.
MEI Z J，WU X L，QU L P. Components analysis of *Origanum vulgare* L. essential oil from Tengchong，Yunnan and its anti-inflammatory and anti-aging activities[J]. China Food Additives，2024，35(4)：192-200.（in Chinese）

[28] HE M X，ZHOU P Y，CHEN H K，et al.(−)-*α*-Bisabolol inhibits *D*-Gal-induced HSF cellular senescence *in vitro* and prevents skin aging *in vivo* by reducing SASP[J]. Iranian Journal of Basic Medical Sciences，2024，27(9)：1105-1114.

[29] BAEERI M，DIDARI T，NAVAEI-NIGJEH M，et al. Regulation of cellular aging in rat embryonic fibroblast cells using gallic acid[J]. International Pharmacy Acta，2018，1(1)，56-56.

[30] LOO Y C，HU H C，YU S Y，et al. Development on potential skin anti-aging agents of *Cosmos caudatus* Kunth *via* inhibition of collagenase，MMP-1 and MMP-3 activities[J]. Phytomedicine，2023，110：154643.

[31] MIRASTSCHIJSKI U，LUPŠE B，MAEDLER K，et al. Matrix metalloproteinase-3 is key effector of TNF-α-induced collagen degradation in skin[J]. International Journal of Molecular Sciences，2019，20(20)：5234.

[32] ÅGREN M S，SCHNABEL R，CHRISTENSEN L H，et al. Tumor necrosis factor-α-accelerated degradation of type I collagen in human skin is associated with elevated matrix metalloproteinase（MMP）-1 and MMP-3 *ex vivo*[J]. European Journal of Cell Biology，2015，94(1)：12-21.

[33] OH J H，Nam G B，Karadeniz F，et al. Evaluation and enzyme-aided enhancement of anti-photoaging properties of *Camellia japonica* in UVA-irradiated keratinocytes[J]. Zeitschrift für Naturforschung C，2022，77(7/8)，287-296.

[34] PARK H M，MOON E，KIM A J，et al. Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation [J]. International Journal of Dermatology，2010，49(3)：276-282.

[35] LIU S W，YOU L，ZHAO Y X，et al. Hawthorn polyphenol extract inhibits UVB-induced skin photoaging by regulating MMP expression and type I procollagen production in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2018，66(32)：8537-8546.

[36] WLASCHEK M，MAITY P，MAKRANTONAKI E，et al. Connective tissue and fibroblast senescence in skin aging[J]. Journal of Investigative Dermatology，2021，141（4）：985-992.

[37] KIM M K，SHIN H S，SHIN M H，et al. Dual role of enhancer of zeste homolog 2 in the regulation of ultraviolet radiation-induced matrix metalloproteinase-1 and type I procollagen expression in human dermal fibroblasts[J]. Matrix Biology，2023，119：112-124.

[38] HUANG Y H，WU P Y，WEN K C，et al. Protective effects and mechanisms of *Terminalia catappa* L. methenolic extract on hydrogen-peroxide-induced oxidative stress in human skin fibroblasts [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine，2018，18(1)：266.

[39] BRAVO K，DUQUE L，FERRERES F，et al. *Passiflora tarminiana* fruits reduce UVB-induced photoaging in human skin fibroblasts[J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B：Biology，2017，168：78-88.

（责任编辑：闫林红）