

EGCG 和 PC-B₂ 联合用药对 AFB₁ 致肝细胞损伤的保护作用及其机制

贾亮¹, 肖德强¹, 马玲玲¹, 范秋玉¹, 刘丹丹², 邓祥发³, 黄东萍³, 张勇胜³, 鲁力*
(1. 广西医科大学公共卫生学院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学护理学院, 南宁 530021;
3. 广西医科大学基础医学院, 南宁 530021)

[摘要] **目的:**探讨多酚类植物化学物表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)与原花青素 B₂(PC-B₂),对黄曲霉素 B₁(AFB₁)起的肝细胞损伤保护作用及机制。**方法:**选用人胚肝细胞(L-02 细胞)进行体外实验研究,实验分为 6 组,分别为空白组,溶剂对照组,AFB₁ 染毒组,AFB₁ 染毒 + EGCG 组,AFB₁ 染毒 + PC-B₂ 组和 AFB₁ 染毒 + EGCG + PC-B₂ 组。采用 MTT 检测细胞存活度,通过单细胞凝胶电泳试验(SCGE)检测细胞 DNA 损伤,通过流式细胞法检测细胞凋亡,采用 Western blot 法检测凋亡信号通路相关蛋白 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),Caspase-9,p53 蛋白表达的水平。**结果:**EGCG 与 PC-B₂ 均能降低 AFB₁ 所致 L-02 细胞的生长抑制,使 AFB₁ 对肝细胞的生长抑制率从 61.12% 降至 42.18% 和 46.72%;EGCG 与 PC-B₂ 联用则效果更佳。SCGE 实验结果表明 EGCG 与 PC-B₂ 单用与联用均能减小 AFB₁ 引起的 L-02 细胞 DNA 损伤($P < 0.05$)。EGCG 与 PC-B₂ 单用与联用均能显著降低 AFB₁ 所致 L-02 细胞的早期凋亡率($P < 0.05$)。Western blot 实验结果表明,AFB₁ 染毒后,EGCG 和/或 PC-B₂ 处理均能显著降低 Caspase-3, Caspase-9 的表达($P < 0.01$),提高 Bcl-2/Bax 比值,而对 p53 表达影响不明显。**结论:**EGCG 与 PC-B₂ 通过降低 L-02 细胞 DNA 损伤与细胞凋亡率,从而降低 AFB₁ 对人肝细胞的损伤作用,其作用机制可能与下调 Caspase-3, Caspase-9 的表达,升高 Bcl-2/Bax 有关。

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯; 原花青素 B₂; 对黄曲霉素 B₁; DNA 损伤; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0113-05

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2016020113

Protective Mechanism of Epigallocatechin Gallate (EGCG) and Procyanidins-B₂ (PC-B₂) on Liver Cell from AFB₁-induced DNA Damage

JIA Liang¹, XIAO De-qiang¹, MA Ling-ling¹, FAN Qiu-yu¹, LIU Dan-dan²,
DENG Xiang-fa³, HUANG Dong-ping³, ZHANG Yong-sheng³, LU Li^{1*}
(1. School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
2. School of Nursing, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;
3. School of Basic Medicine, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the protective effects of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) combined with procyanidins B₂ (PC-B₂) on liver cell damage caused by aflatoxin B₁ (AFB₁). **Method:** L-02 cells were selected in an experimental study in vitro and divided into 6 groups: control group; solvent control group; AFB₁ group; EGCG + AFB₁ group; PC-B₂ + AFB₁ group; EGCG + PC-B₂ + AFB₁ group. The cells survival was determined by MTT; DNA damage was detected by single cell gel electrophoresis (SCGE); the flow cytometry method was used to detect cell apoptosis; and the expressions of protein about apoptosis signaling pathways (Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, P53) were detected with Western blot method. **Result:** EGCG and PC-B₂ can reduce

[收稿日期] 20150110(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31360383)

[第一作者] 贾亮, 硕士, 从事营养与营养相关疾病研究, E-mail: jlgg8931@sina.com

[通讯作者] * 鲁力, 教授, 从事营养与营养相关疾病研究, Tel: 18275794621, E-mail: luli345@163.com

liver cell growth inhibition caused by AFB₁ from 61.12% to 42.18% and 46.72%; EGCG combined with PC-B₂ made a better effect. SCGE results showed that either EGCG or PC-B₂ can reduce liver cell DNA damage caused by AFB₁. Simple or combined administration of EGCG and PC-B₂ can decrease the early apoptosis rate of L-02 cells induced by AFB₁ ($P < 0.05$). Western blot experiments showed that after treatment with AFB₁, EGCG or (and) PC-B₂ treatment can reduce the expression of Caspase-3 and Caspase-9 significantly ($P < 0.01$), and improve the ratio of Bcl-2 to Bax, but with no obvious expression of P53. **Conclusion:** EGCG and PC-B₂ can protect the human normal liver cells from the damage induced by AFB₁ reducing L-02 cell DNA damage and inhibiting the apoptosis, and the mechanism may be correlated with the down-regulation of Caspase-3 and Caspase-9 expressions and the increase in Bcl-2/Bax.

[**Key words**] epigallocatechin gallate; procyanidine B₂; aflatoxin B₁; DNA damage; apoptosis

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)是被公认的环境污染物,主要是由黄曲霉菌 *Aspergillus flavus* 和寄生曲霉菌 *A. parasiticus* 中的产毒菌株产生的有毒代谢产物。肝脏是 AFB₁ 的主要靶器官,有研究表明,AFB₁ 具有致突变性、致畸性、遗传致癌性、肝脏致癌性和免疫抑制毒性。急性高剂量暴露 AFB₁ 会引发黄曲霉毒素中毒,而慢性低剂量暴露则会引起人原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[1]。

多酚类植物化学物表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)作为绿茶主要活性成分,是茶多酚中含量较高的物质,也是儿茶素类化合物中生物学效应最强的一种具有抗突变、抗氧化、抗病毒、调节机体免疫功能,诱导肿瘤细胞凋亡及光保护等作用^[2],EGCG 还可通过抑制炎症因子的表达减轻 ConA 诱导的肝损伤^[3]。原花青素 B₂(PC-B₂)主要存在于植物的果实、种子、花和皮中,是一类在植物界中广泛存在的双黄酮衍生物的天然多酚化合物,这类物质在酸性介质中加热,可降解和氧化产生红色花青素,因而被称作原花青素。原花青素是一种强还原剂,可以清除人体内有毒的自由基,保护细胞组织免受自由基的氧化损伤,其药理作用广泛,具有保护心血管、预防高血压病、抗肿瘤、抗辐射等作用^[4-5]。

本实验旨在探讨多酚类植物化学物 EGCG 与 PC-B₂ 对 AFB₁ 处理后人类肝细胞 DNA 损伤的保护作用及机制。

1 材料

1.1 细胞 正常人类来源胚胎肝细胞(L-02 细胞)购自武汉大学中国典型培养物保存中心。

1.2 药物及试剂 多酚类植物化学物单体表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG),原花青素(PC-B₂)及实验用试剂 L-glutamine,溴化乙锭(EB),DMSO(均

购自美国 Sigma 公司,批号分别为 G3126, E8751, D5879),DMEM 培养基和胎牛血清(均购自美国 Gibco 公司,批号分别为 12100-046, C2027050),AFB₁ 购于广州赛蕊斯生物科技有限公司;噻唑蓝(MTT)购于美国 Amresco(批号 M8180-1);B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3),Caspase-9, p53 一抗(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab7973, ab77566, ab2302, ab63488, ab179477)。

1.3 仪器 3111 型细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司),VD-1320 型超净工作台(哈尔滨东联技术开发有限公司),DW-86L286 型超低温冰箱(中国海尔集团),CK40-F200 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),PowerPac 3000 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与实验分组 L-02 细胞培养于含 10% 胎牛血清,1% L-glutamine,100 mg·L⁻¹链霉素,1 × 10⁵ U·L⁻¹青霉素的 DMEM 培养基中,于 37 °C 下,置于 5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞足量后,取对数期的 L-02 细胞,用胰酶将细胞从瓶壁消化下来,调节浓度为每毫升 1 × 10⁵ 个细胞接种于 6 孔培养板,24 h 后弃培养液,实验分 6 组,每组 16 孔,分别加入不同处理的细胞培养液,EGCG 用药浓度参考刘冬梅报道文献^[6],PC-B₂ 用药浓度参考孙怡报道文献^[7]。空白组无处理;溶剂对照组加 DMSO 溶剂;AFB₁ 染毒组:40 mg·L⁻¹ AFB₁;EGCG + AFB₁ 组:50 mg·L⁻¹ EGCG + 40 mg·L⁻¹ AFB₁;PC-B₂ + AFB₁ 组:200 mg·L⁻¹ PC-B₂ + 40 mg·L⁻¹ AFB₁;EGCG + PC-B₂ + AFB₁ 组:50 mg·L⁻¹ EGCG + 200 mg·L⁻¹ PC-B₂ + 40 mg·L⁻¹ AFB₁。将 6 孔板置于 37 °C 下,置于 5% CO₂ 培养箱中培养 48 h 后,行后续实验。

2.2 MTT 实验检测 在 6 孔板中,每组处理取 3 个复孔,用 PBS 缓冲液清洗 2 次后,每孔加入 200 μL 含 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 的新培养液,培养 4 h 后弃上清,每孔加入 200 μL DMSO,漩涡混匀后,在酶标仪上 490 nm 波长处检测吸光度 A ,计算细胞抑制率。

$$\text{细胞生长抑制率(IR)} = (A_{\text{对照组}} - A_{\text{实验组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.3 单细胞凝胶电泳试验(SCGE) 在 6 孔板中,每组处理取 3 个复孔,将处于对数生长期的 L-02 肝细胞用 0.25% 胰酶消化,制成每毫升 1×10^5 个细胞悬液。参考黄秀华报道文献[8],进行实验,之后于 Olympus 荧光显微镜下观察,计数 100 个细胞中拖尾细胞数,并用 DP controller 成像系统照相,最后用 CASP 分析软件分析 30 个拖尾细胞彗星尾矩(TM)和 Olive 尾矩(OTM)的变化。

2.4 流式细胞术 在 6 孔板中,每组处理取 3 个复孔,将处于对数生长期的肝细胞用 0.25% 胰酶消化,于 1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后收集细胞,以 PBS 洗 2 次,细胞悬于 PI-Annexin v 凋亡双染试剂盒中的缓冲液中,密度为每毫升 1×10^6 个细胞,400 目筛网过滤,准确吸取 0.5 mL 细胞悬液于上样管中,再加入 5 μL Annexin v-FITC 和 PI 染液,于室温避光染色 10 min 后,上机检测,用 CellQuest 软件获取 1×10^4 个细胞,分析活细胞、早期凋亡细胞及死亡细胞的百分率。

2.5 Western blot 检测 在 6 孔板中,每组处理取 3 个复孔,收集 L-02 细胞,提取总蛋白,采用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒,精确测量各实验组总蛋白浓度,参考文献[9],用 Western blot 法,检测各实验组 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, P53 蛋白表达水平;采用 Quantity One v4.4.0 软件对 Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, P53 所对应条带进行光密度分析。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理分析,采用单因素方差分析组间比较,所有计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 进行表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 EGCG 和 PC-B₂ 对 AFB₁ 致损的肝细胞生长影响 EGCG 与 PC-B₂ 单用,及 EGCG 与 PC-B₂ 联用对肝细胞处理后,经 MTT 检测结果表明:EGCG 与 PC-B₂ 单用与联用均能显著降低 AFB₁ 对肝细胞的生长抑制作用,EGCG 与 PC-B₂ 单用分别使 AFB₁ 对肝细胞的生长抑制率从 61.12% 降至 42.18% 和 46.72%;EGCG 与 PC-B₂ 联用使 AFB₁ 对肝细胞的生长抑制率从 61.12% 降至 37.15%。见表 1。

表 1 EGCG 和 PC-B₂ 对 AFB₁ 致损的肝细胞生长的影响 ($n = 4$)
Table 1 Effects of EGCG and PC-B₂ on hepatocyte growth damaged by AFB₁ ($n = 4$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	平均 A	生长抑制率 /%
空白	-	0.549	-
溶剂对照	-	0.551	-
AFB ₁ 染毒	40	0.237	61.12
EGCG	50	0.291	42.18 ¹⁾
PC-B ₂	200	0.276	46.72 ¹⁾
EGCG + PC-B ₂	50 + 200	0.301	37.15 ²⁾

注:与 AFB₁ 染毒组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 4 同)。

3.2 EGCG 和 PC-B₂ 对 AFB₁ 致损的肝细胞 DNA 损伤的影响 EGCG 与 PC-B₂ 单用及二者联用对肝细胞悬液处理后,经彗星实验检测表明,AFB₁ 单独处理肝细胞后,相对于空白组,肝细胞 DNA 受损较为严重;而 AFB₁ 与 EGCG 同时处理或 AFB₁ 与 PC-B₂ 同时处理肝细胞后, DNA 损伤明显降低(与 AFB₁ 染毒组比, $P < 0.05$);而 EGCG 与 PC-B₂ 二者联用处理肝细胞后,相对于 AFB₁ 染毒 DNA 损伤降低更为显著(与 AFB₁ 染毒组比, $P < 0.05$)。表明 EGCG 与 PC-B₂ 单用均能减小 AFB₁ 对人正常肝细胞造成的 DNA 损伤,但两者联用,效果更佳。见表 2。

表 2 EGCG 和 PC-B₂ 对 AFB₁ 致损的肝细胞 DNA 彗星尾矩值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effects of EGCG and PC-B₂ on tail moment of hepatocyte damaged by AFB₁ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	尾矩值	Olive 尾矩值	拖尾率 /%
空白组	-	3.15 \pm 1.34	3.84 \pm 1.02	23
溶剂对照	-	3.37 \pm 1.72	3.97 \pm 0.83	24
AFB ₁ 染毒	40	8.04 \pm 2.01	9.72 \pm 2.64	73
EGCG	50	5.19 \pm 1.47 ¹⁾	5.91 \pm 1.79 ¹⁾	56
PC-B ₂	200	4.63 \pm 1.82 ¹⁾	5.36 \pm 1.17 ¹⁾	51
EGCG + PC-B ₂	50 + 200	4.29 \pm 0.65 ¹⁾	4.47 \pm 1.27 ²⁾	34

3.3 EGCG 与 AFB₁ 联用对肝细胞早期凋亡率的影响 EGCG + AFB₁ 组与 PC-B₂ + AFB₁ 组与 AFB₁ 染毒组比较,早期凋亡率均有显著降低 ($P < 0.05$); EGCG + PC-B₂ + AFB₁ 组与 AFB₁ 染毒组比较,早期凋亡率均有显著降低 ($P < 0.01$),表明 EGCG 与 PC-B₂ 单用均能降低 AFB₁ 所致肝细胞的早期凋亡率,但两者联用,效果更佳。见表 3。

表 3 EGCG 和 PC-B₂ 对 AFB₁ 致损的肝细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 3 Effects of EGCG and PC-B₂ on hepatocyte apoptosis damaged by AFB₁ ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	早期凋亡率/%
空白	-	2.63 ± 0.28
溶剂对照	-	3.01 ± 0.45
AFB ₁ 染毒	40	13.65 ± 3.79
EGCG	50	8.26 ± 1.67 ¹⁾
PC-B ₂	200	7.89 ± 1.52 ¹⁾
EGCG + PC-B ₂	50 + 200	4.68 ± 0.51 ²⁾

3.4 EGCG 与 AFB₁ 联用蛋白表达的影响 EGCG 与 PC-B₂ 单用均能下调 Caspase-3, Caspase-9 的表达, 而 EGCG 与 PC-B₂ 两者联用时, 对 Caspase-3, Caspase-9 的表达水平的影响更为显著 ($P < 0.01$); EGCG 与 PC-B₂ 单用均能显著上调 Bcl-2/Bax ($P < 0.05$), 而 EGCG 与 PC-B₂ 两者联用时, 对 Bcl-2/Bax

表 4 EGCG 与 PC-B₂ 联用对肝细胞蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

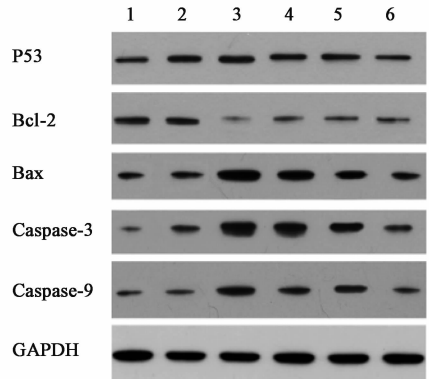
Table 4 Effects of EGCG and PC-B₂ on protein expression level in L-02 cell ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	P53	Bcl-2/Bax	Caspase-3	Caspase-9
空白	-	0.26 ± 0.05	1.24 ± 0.36	0.03 ± 0.01	0.23 ± 0.06
溶剂	-	0.33 ± 0.10	0.97 ± 0.15	0.30 ± 0.11	0.25 ± 0.07
AFB ₁ 染毒	40	0.35 ± 0.07	0.11 ± 0.03	0.98 ± 0.23	0.88 ± 0.13
EGCG	50	0.33 ± 0.05	0.27 ± 0.05 ¹⁾	0.77 ± 0.15	0.37 ± 0.08 ¹⁾
PC-B ₂	200	0.31 ± 0.05	0.24 ± 0.10 ¹⁾	0.56 ± 0.14 ¹⁾	0.36 ± 0.14 ¹⁾
EGCG + PC-B ₂	50 + 200	0.27 ± 0.06	0.59 ± 0.12 ²⁾	0.29 ± 0.11 ²⁾	0.19 ± 0.03 ²⁾

4 讨论

黄曲霉毒素污染是危害人类健康的全球性的卫生问题, 在热带与亚热带温暖潮湿的地区尤为严重。天然存在的 AFs 共有 4 种: AFG₁, AFG₂, AFB₁, AFB₂, 其中又以 AFB₁ 毒性最大。AFB₁ 进入机体后需要经体内 I 相药物代谢酶, 主要是 CYP450 酶, 代谢转化为 AFM₁, AFQ₁, AFP₁, AFB₁-exo-8, 9-环氧化物 (Exo-AFBO) 和 endo-8, 9-环氧化物 (Endo-AFBO) 等中间代谢产物。其中 Exo-AFBO 是一个活性很强且极不稳定的环氧化物, 具有极强的化学活性, 并可攻击细胞内具亲核性的生物大分子 (如 DNA, RNA 和蛋白质) 形成加合物。这些经代谢活化产生的亲电子性、化学性质活泼的代谢物, 可造成包括 DNA 损伤、基因突变、细胞凋亡、细胞周期改变等在内的多种细胞内损伤, 从而导致细胞遗传损伤, 最终引起细胞癌变^[10]。EGCG 与 PC-B₂ 均具有多羟基结构, 能有效清除自由基, 可以保护正常细胞 DNA 免受辐射和氧化损伤, 预防其向肿瘤细胞转化, 可以

的影响更为显著 ($P < 0.01$); 此实验中, 无论是 EGCG 与 PC-B₂ 单用还是联用, 对 P53 的表达水平不产生影响。见图 1, 表 4。



1. 空白组; 2. 溶剂对照组; 3. AFB₁ 染毒组; 4. EGCG + AFB₁ 组; 5. PC-B₂ + AFB₁ 组; 6. EGCG + PC-B₂ + AFB₁ 组

图 1 EGCG 与 PC-B₂ 联用对肝细胞蛋白表达水平的影响

Fig. 1 Effects of EGCG and PC-B₂ on protein expression level in L-02 cell

抑制 AFB₁ 在 DNA 分子上形成加合物, 从而抑制癌的形成^[11-13]。本实验结合了 EGCG 与 PC-B₂ 两者的作用, 对由 AFB₁ 诱导产生的肝细胞损伤进行了一系列的实验研究, 通过研究发现 EGCG 与 PC-B₂ 两者单用均能缓解由 AFB₁ 导致的肝细胞损伤, 符合预期实验目的。同时, 笔者发现 EGCG 与 PC-B₂ 两者联用时, 对 AFB₁ 致肝细胞损伤的保护作用比两者单用效果更佳。

有研究表明^[14], AFB₁ 导致的肝细胞损伤, 其根源来自对 DNA 的损伤, 原花青素不仅在自由基清除和蛋白质氧化损伤反应体系中总体表现出较强抗氧化活性, 而且对于由 H₂O₂ 诱导的细胞氧化损伤有明显保护作用。Olive 尾矩是反映 DNA 损伤情况的一个较为准确、灵敏的指标。本实验中, 笔者采用了彗星实验检测了 EGCG 与 PC-B₂ 单用及二者联用对经 AFB₁ 处理后的肝细胞 DNA 损伤的保护作用, 实验结果表明, EGCG 与 PC-B₂ 两者均能保护肝细胞免受 AFB₁ 诱导的 DNA 损伤, 但两者联用效果更

佳。细胞凋亡的重要机制之一是由于体内氧自由基的损伤作用,细胞凋亡的程度受一系列凋亡相关蛋白的调控^[15]。以往的研究表明^[16],原花青素能通过调节 Caspase-3 和 Bcl-x1, Bax 等蛋白的表达,抑制人脐静脉内皮细胞的凋亡。在本实验中,笔者首先通过流式细胞术检测发现,经过 AFB₁ 处理后的肝细胞 L-02 凋亡率显著高于未经处理的对照细胞,这就表明 AFB₁ 能够诱导肝细胞 L-02 的凋亡。进而检测通过 EGCG 与 PC-B₂ 处理后的肝细胞 L-02 凋亡率,笔者发现 EGCG 与 PC-B₂ 均能降低由 AFB₁ 诱导的肝细胞的凋亡,且两者联用抑制效果更好。

细胞凋亡受到相关基因的调控,目前研究比较多的是 p53 途径, Bcl-2 基因家族。p53 作为重要的抑癌基因,在细胞的 DNA 修复过程中发挥着极为重要的作用,是人类肿瘤中最常发生突变的基因之一,在各种应激包括 DNA 损伤过程中, p53 可被不同的信号通路激活。Bcl-2 基因家族依其结构和功能分为促凋亡和抗凋亡两类。Bax 是重要的凋亡促进基因,通过增加线粒体膜通透性使其从胞质迁移至线粒体,导致促凋亡因子的释放,诱导细胞凋亡^[17]。Bcl-2 是重要的凋亡抑制基因,主要通过抑制细胞凋亡的早期环节而发挥作用,其作用可能通过多种途径实现,目前研究热点是 Bcl-2 与 Bax 形成异源二聚体及对凋亡关键性蛋白 Caspase-3, Caspase-9 活化的抑制。因此, Bcl-2 和 Bax 的比率决定了细胞对凋亡信号的敏感性,两者比例升高时促进细胞存活,两者比例降低时促进细胞凋亡^[18]。在此基础之上,笔者通过 Western blot 实验,检测了 p53, Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9 的表达水平,结果表明 AFB₁ 诱导上调了 Caspase-3, Caspase-9 的表达,下调了 Bcl-2/Bax, 而 EGCG 与 PC-B₂ 逆转了这种趋势,且 EGCG 与 PC-B₂ 联用趋势更为显著。但在实验中,与预期不一致的是 p53 的表达并不受到 AFB₁, EGCG 与 PC-B₂ 的影响。

[参考文献]

[1] Johnson N M, Egner P A, Baxter V K, et al. Complete protection against aflatoxin B(1)-induced liver cancer with a triterpenoid: DNA adduct dosimetry, molecular signature, and genotoxicity threshold[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(7):658-665.

[2] Wang Y, Mei Y, Feng D, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate protects mice from concanavalin A-induced hepatitis through suppressing immune-mediated liver injury [J]. *Clin Exp Immunol*, 2006, 145 (3): 485-492.

[3] 马明霞,任源.表没食子儿茶素没食子酸酯对酒精性肝病小鼠肝脏 Tf 和 Tfr1 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(1):268-271.

[4] 丁阳平,童华荣.原花青素的药理作用研究进展[J]. *中南药学*, 2007, 5(2):161-163.

[5] 杜玉,娄红祥.葡萄籽原花青素提取物药理作用研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2007, 27(2):235-237.

[6] 刘冬梅,崔华东,杨丽丽,等.表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对 ConA 所致小鼠肝损伤的保护作用[J]. *解剖科学进展*, 2013, 19(3):236-238.

[7] 孙怡,商学军,葛京平,等.原花青素对前列腺癌 PC-3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *山东医药*, 2006, 46(5): 12-14.

[8] 黄秀华,张丹,邓国兵,等.表没食子儿茶素没食子酸酯对卡莫司汀处理后张氏肝细胞 DNA 损伤的保护作用[J]. *茶叶科学*, 2008, 28(5):348-352.

[9] Joo M, Kang Y K, Kim M R, et al. CyclinD₁ overexpression in hepatocellular carcinoma [J]. *Liver*, 2001, 21:89-96.

[10] Michael K, Gerhard K E S. Drug-phospholipid conjugates as potential prodrugs: synthesis, characterization, and degradation by pancreatic phospholipase A2 [J]. *Chem Phys Lipid*, 2000, 107 (2): 143-157.

[11] 庄振宏,张峰,李燕云,等.黄曲霉毒素致癌机理的研究进展[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(8):1522-1525.

[12] 陈燕军,张军斌,熊欣,等.原花青素柔性纳米脂质体小鼠皮肤局部药代动力学[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(14):1-4.

[13] Gleis M, Pool-Zobel B L. The main catechin of green tea, (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), reduces bleomycin-induced DNA damage in human leucocytes [J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20(3): 295-300.

[14] Yao J G, Huang X Y, Long X D. Interaction of DNA repair gene polymorphisms and aflatoxin B1 in the risk of hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(9):6231-6244.

[15] Meng F C, Lou J Y, Yang X P, et al. Dynamically brain edema changes in perihematoma following experimental intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Chin J Pract Nervous Dis*, 2006, 9(3): 67-69.

[16] 丁黎敏,黄小民,张微,等.原花青素通过对 Caspase-3 和 Bcl-x1, Bax 蛋白的调节抑制人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(1):582-584.

[17] 邱志群,舒为群,田怀军,等.绿茶浸出液对水中有机污染物致 DNA 损伤的抑制作用[J]. *环境与健康杂志*, 2003, 20(5):270-272.

[18] 高羽,董志,徐露.原花青素对实验性脑出血大鼠脑组织细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *中国药理学通报*, 2013, 26(7):968-973.

[责任编辑 周冰冰]