

综述

吡咯里西啶生物碱的细胞毒性及致毒机制研究进展

王 军^{1,3}, 王长虹^{1,2*}, 王峥涛^{1,2*}

(1. 上海中医药大学中药研究所 中药标准化教育部重点实验室, 上海 201203; 2. 上海中药标准化研究中心, 上海 201203; 3. 安徽中医学院药学院, 安徽 合肥 230031)

摘要: 吡咯里西啶生物碱广泛分布于6 000多种高等植物中,是一类肝毒性很强的天然产物。吡咯里西啶生物碱在肝脏代谢成活性代谢物吡咯后产生肝毒性。利用体外细胞毒性研究方法评价吡咯里西啶生物碱的毒性,对于阐明吡咯里西啶生物碱的致毒机制,研究开发拮抗其毒性的药物及保证临床用药安全具有重要意义。本文对吡咯里西啶生物碱的细胞毒性及致毒机制的研究进展进行综述。

关键词: 吡咯里西啶生物碱; 细胞毒性

中图分类号: R996.2 文献标识码: A 文章编号: 1674-0440(2007)04-0246-05

Advancement of investigation on cytotoxicity and mechanism of pyrrolizidine alkaloids

WANG Jun^{1,3}, WANG Chang-hong^{1,2}, WANG Zheng-tao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicines of Ministry of Education, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai R&D Center for Standardization of Chinese Medicines, Shanghai 201203, China; 3. Department of Pharmacy, Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

Abstract: Pyrrolizidine alkaloids are a large class of natural products with hepatotoxicity and have been identified in more than 6 000 plant species. Pyrrolizidine alkaloids are activated by metabolic activation in liver and their parent compounds are converted into active "pyrrole" which may produce hepatotoxicity. It has important significance to evaluate the cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloids in vitro for illuminating hepatotoxic mechanisms of pyrrolizidine alkaloids, finding drugs against the toxicity of pyrrolizidine alkaloids, and guaranteeing clinical medication security. In the present paper, the advancement of research on the cytotoxicity and mechanism of pyrrolizidine alkaloids are reviewed.

Key words: pyrrolizidine alkaloids; cytotoxicity

吡咯里西啶生物碱(pyrrolizidine alkaloids, PA)

是自然界广泛分布的一种天然生物碱;大约3%的有花植物中都含有PA。主要分布在植物界四个科,即紫草科(Boraginaceae)、菊科(Compositae)、豆科(Leguminosae)和兰科(Orchidaceae)中,其他如玄参科(Scrophulariaceae)、夹竹桃科(Apocynaceae)、毛茛科(Ranunculaceae)、百合科(Liliaceae)等也有分布。目前从6 000多种植物中分离发现了660多种PA及其氮氧化衍生物,其中一半以上为有毒生物碱^[1]。PA作用的直接靶器官为肝脏,在体内通过代谢活化而致毒,可引起肝细胞出血性坏死、肝巨红细

收稿日期:2006-11-30

基金项目:国家自然科学基金重点项目(No. 30530840);国家自然科学基金项目(No. 30572222)

作者简介:王 军,男,在读博士研究生,研究方向:中药活性成分与质量标准,E-mail: wangjun1996@hotmail.com

* 通讯作者:王长虹,男,研究员,研究方向:中药新制剂与质量控制,Tel: 021-51322513, E-mail: wchcxm@163.com;王峥涛,男,教授,博士生导师,研究方向:中药活性成分与质量标准,Tel: 021-51322507, E-mail:wangzht@hotmail.com

胞症及静脉闭塞症等,所以又称为肝毒吡咯里西啉生物碱(hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids, HPA)。此外,还会引起肺脏、肾脏、神经和胚胎毒性,致突变和致癌等。调查表明,在俄罗斯、印度、阿富汗、牙买加、南非、美国等地,许多肝病的发生与服用含 PA 的草药有关^[2,3]。分布广泛的 PA 可以通过间接的食物污染如谷物、牛奶、蜂蜜或牧草的污染或者直接通过含 PA 的传统草药、补剂、茶等对人类或牲畜生命造成极大的毒害。

随着国际上对中草药研究的深入,对其潜在的毒副作用的研究也越来越受到重视。在中国至少有 40 多种常用中药或民间药物含有 PA。其中一些种类为中国药典所收载,如千里光(1977 年版、2000 年版附录)、款冬花、佩兰、紫草等,广泛应用于中成药制剂中。据粗略统计,中国药典(2000 版)中有 6 个复方制剂,而收入地方标准的制剂(大部分已转为部颁标准)则达 90 多种。PA 的结构由千里光次碱(necine)和千里光次酸(necic acid)2 个基本部分组成,而具有 1,2 位不饱和双键形成烯丙醇酯结构的 PA 对人类具有强烈的肝毒性。根据其结构特征可分为 otonecine 型或 retronecine 型 PA 两大类(图 1)。PA 的毒性已经成为国际上关注的新热点,而体外细胞毒性的研究已逐渐成为化合物代谢毒性研究的重要手段,本文就 PA 体外细胞毒性及其致毒机制的研究进展作一综述。

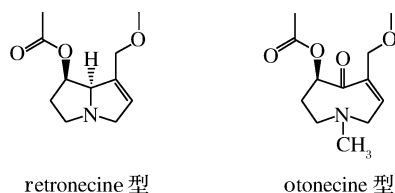


图 1 吡咯里西啉生物碱的结构类型

1 吡咯里西啉生物碱体外毒性研究的细胞模型

1.1 原代培养的肝细胞

原代肝细胞(HPC)通常采用两步分离法从新鲜肝组织中分离获得。原代肝细胞培养是体外毒性筛选的常用模型,其中较为重要的就是结合细胞功能和细胞毒性的研究方法研究药物肝脏毒性的机制,尤其适合于那些需要经过代谢转化才引起毒性损伤的化合物。原代肝细胞培养作为一种体外毒性筛选模型,有其突出的优点:较好保留和维持了肝脏的代谢能力,具有与体内一致的细胞色素 P450 酶(CYP450)的活性,最适于研究药物的代谢与毒性的

关系。

原代培养的大鼠肝细胞内含有的 CYP450 接近于大鼠体内的 CYP450 的水平,常被用来作为评价有毒化合物的代谢作用机制的细胞模型。千里光碱(senecionine)、野百合碱(monocrotaline)、倒千里光碱(retrorsine)、松蓝千里光碱(isatidine)、山冈藁吾碱(clivorine)、蜂斗菜碱(petasitenine)、克氏千里光碱(senkirkine)、毛果天芥菜碱(lasiocarpine)等都对大鼠肝原代细胞具有毒性。千里光碱与大鼠肝原代细胞培养 24 h 后,分别测定肝原代细胞释放的乳酸脱氢酶(LDH)含量和观察肝原代细胞的形态学变化,测得的 LDH 有明显的剂量线性关系,且形态学观察实验也发现肝细胞的数目减少,表明千里光碱有潜在的细胞毒性^[4]。Muller 等^[5]用大鼠肝原代细胞与 V79 细胞培养评价野百合碱、倒千里光碱、松蓝千里光碱的细胞毒性,发现作用 18 h 后都显示出明显的细胞毒反应。Williams 等^[6]在大鼠肝原代细胞培养体系中评价野百合碱、山冈藁吾碱、蜂斗菜碱、克氏千里光碱、毛果天芥菜碱的基因毒性,通过 HPC/DNA 修复测试实验表明,上述 5 种 PA 有明显的致突变毒性。Griffin 等^[7]在大鼠原代培养细胞中评价千里光碱、倒千里光碱、19-羟基-千里光碱和代谢产物 4-羟基己烯醛的细胞毒性,通过检测 LDH 的释放表明,上述化合物都有细胞毒性,而且通过放射自显影技术还检测到干预后的大鼠肝细胞有 DNA 变异,表明 PA 具有基因毒性。

1.2 肺动脉内皮细胞

肺动脉内皮细胞从新鲜的牛肺动脉内皮细胞分离得到。肺动脉内皮细胞内含有 CYP450 和黄素单氧化酶等,对化合物有代谢作用,是一种用于筛选需经代谢活化而产生毒性的化合物毒性的体外模型。Taylor 等^[8]研究了野百合碱、野百合碱代谢吡咯(monocrotaline pyrrole, MCTP)、代谢吡咯的谷胱甘肽结合物(GSH-DHP)对牛肺动脉内皮细胞的毒性作用。通过检测 LDH 释放及细胞形态学变化,考察野百合碱在动脉内皮细胞代谢作用后的毒性,只有 MCTP 才对内皮细胞有毒性。培养 48 h 后 LDH 释放增多、细胞形状变大及细胞密度降低。而培养 96 h 后则 PGI₂ 合成升高。Hoorn 等^[9-11]考察野百合碱等对肺动脉内皮细胞的毒性作用,结果表明,代谢产物 MCTP 有引起内皮细胞增大、抑制细胞增殖、引起 DNA 交联、同时伴随内皮细胞血管紧张素转化酶的活性降低等细胞毒性。

1.3 肝 L-02 细胞

肝 L-02 细胞是一种正常人胎肝细胞系,能够传代培养,常用作化合物肝脏毒性的体外研究模型。季莉莉等^[12]运用 MTT 法观察了从藁吾属药用植物中分离得到的山冈藁吾碱、大黄藁吾碱(isoline)、亚玛太宁碱(yamataimine)、12-乙酰基亚玛太宁碱(12-acetylyamataimine)、阔叶千里光碱(platyphylline)和野百合碱等 PA 在体外对人正常肝 L-02 细胞的毒性作用,结果表明,除山冈藁吾碱对 L-02 细胞具有强烈的毒性作用外,其他几个 PA 对 L-02 细胞无明显毒性作用。进一步运用 MTT 法观察山冈藁吾碱对肝 L-02 细胞毒性的浓度曲线,发现 $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 48 h 后对肝 L-02 细胞具有显著的毒性。

1.4 人肝癌细胞 Hep G2

人肝癌细胞株 Hep G2 是从肝母细胞瘤分离出来的,具有肝细胞的代谢功能。Hep G2 细胞保留了外源物质在体内代谢的 I 和 II 相酶的活性。Uhl 等^[13]运用 Hep G2 细胞作模型,研究松蓝千里光碱的基因毒性,单细胞凝胶电泳结果表明,其可引起 DNA 迁移的变化,有潜在的基因毒性。

1.5 人肝癌细胞 HuH-7

人肝癌细胞 HuH-7 是一种体外建立的肝癌细胞系。Zuckerman 等^[14]运用 HuH-7 考察 *Senecio latifolius* 中 PA 的细胞毒性,结果提示,PA 在体外可引起 HuH-7 细胞坏死、凋亡增多、细胞分裂、破坏细胞 β -微管蛋白等细胞毒性。

2 吡咯里西啶生物碱体外细胞毒性机制的研究

2.1 山冈藁吾碱(otonecine 型)的细胞毒性

山冈藁吾碱抑制细胞生长的作用,可能是由于其引起了细胞凋亡,细胞周期阻滞或直接导致细胞坏死。季莉莉等^[15,16]研究了山冈藁吾碱抑制肝细胞增殖的机制,证明其不需要经过代谢可直接产生细胞毒作用。运用流式细胞分析方法检测到 $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 山冈藁吾碱可以诱导肝 L-02 细胞凋亡,同时发现其可以诱导肝 L-02 细胞核 DNA 荧光碎片颗粒的产生。运用 Western 杂交技术分析发现,山冈藁吾碱可以激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)中的 P38 蛋白激酶。P38 蛋白激酶抑制剂 SKF86002 可以抑制山冈藁吾碱对 P38 蛋白的激活,并且从 MTT 法可见该抑制剂能部分地阻断山冈藁吾碱诱导的细胞生长抑制。山冈藁吾碱可减少 P53 蛋白的表达,且对 Bcl-2 蛋白的表达无影响,但可诱

导细胞内半胱天冬酶(caspase)底物多聚 ADP-核糖聚合酶的裂解。上述研究表明,山冈藁吾碱抑制肝 L-02 细胞生长的作用可能是因为诱导了细胞的凋亡,而 P38 蛋白激酶与 caspase 的活化可能参与了山冈藁吾碱诱导的细胞凋亡。

2.2 野百合碱(retronecine 型)的细胞毒性

野百合碱须经过代谢生成吡咯代谢产物 MCTP 后才能对内皮细胞产生细胞毒性。Wagner 等^[11,17-19]研究了野百合碱的代谢产物 MCTP 诱导肺内皮细胞引起 DNA 交联的作用机制。MCTP 是一种亲电性烷化剂,当 MCTP 在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时,培养 1 h 就能引起内皮细胞的 DNA 交联,在 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时,培养 24 h 即引起内皮细胞的 DNA 交联,说明 MCTP 引起的 DNA 交联与剂量有关。MCTP 不但可引起内皮细胞 DNA 交联,同时还引起 DNA 与蛋白质发生交联;且作用 48 h 后内皮细胞生成的 DNA 与蛋白质的交联明显多于 DNA 交联。MCTP 引起的内皮细胞 DNA 交联,以及 DNA 与蛋白质交联可能是产生细胞毒性的原因。

2.3 千里光碱(retronecine 型)的细胞毒性

Bellomo 等^[20]发现肝原代细胞溶质的 Ca^{2+} 浓度超过 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时就会引起细胞膜的破裂和脂质过氧化反应等细胞毒性。Griffin 等^[21-23]用大鼠肝原代细胞研究千里光碱和代谢产物反式-4-OH-2-己烯醛(t-4HH)的细胞毒性,结果发现肝原代细胞经千里光碱和 t-4HH 处理后,细胞溶质中的 Ca^{2+} 浓度伴随肝原代细胞毒性增加而增加,而且当细胞外没有 Ca^{2+} 存在时,千里光碱和 t-4HH 能明显增加肝细胞释放 LDH,显示出更强的细胞毒性。这表明细胞外 Ca^{2+} 内流并不是千里光碱和 t-4HH 产生细胞毒性的机制。进一步研究发现,千里光碱和 t-4HH 能抑制肝细胞对线粒体内、外的 Ca^{2+} 吞噬机制,导致细胞溶质 Ca^{2+} 浓度增大,进而产生细胞毒性;同时千里光碱和 t-4HH 还可以消耗肝原代细胞内 ATP 和 NADPH,增加细胞内 NADP^+ 。

Kim 等^[24,25]利用化学反应制备了脱氢 PA,如脱氢千里光碱(dehydrosenecionine, DHSN)、dehydroidelline(DHRD)、脱氢野百合碱(dehydromonocrotaline, DHMO)。发现上述化合物也能引起正常牛胚肾 MDBK 细胞和乳腺癌 MCF-7 细胞的 DNA 交联以及 DNA-蛋白质交联。

现有的研究普遍认为,HPA 须在肝脏经 CYP450 代谢活化后形成吡咯代谢物而产生毒性。

吡咯代谢物具有很强的亲电能力,可与体内很多重要的细胞亲核体如 DNA, RNA, 酶和蛋白质等发生烷基化作用形成结合吡咯或与 DNA 交联;还可能与其他细胞成分,如还原型谷胱甘肽、半胱氨酸以及核苷形成加合物;或与细胞骨架蛋白加合,导致细胞的凋亡或死亡,而引起肝细胞出血性坏死、肝巨红细胞症及静脉闭塞症等肝损伤。

3 结语

目前的研究已建立了对 PA(包括 2 种类型,如 retronecine 和 otonecine)肝代谢途径及其与肝脏毒性关系的共识,即毒性机制是与 NADPH 依赖性的 CYP450 的代谢活化有关,而其解毒是与分子中酯键的水解和氮氧化作用有关。2 种机制是由不同的酶以及亚系酶或同工酶参与的,具有不同的底物特异性,且在不同动物种属之间均有不同的表达和分布、甚至变异,因此产生不同的毒性反应。不同结构的 PA 其毒性也有很大的不同。由于 retronecine 型和 otonecine 型 2 种类型的生物碱在代谢致毒的机制上没有明显的差异,而显然在结构上的多样性与千里光酸部分(necic acid)有着直接关系,因而推测其毒性的差异与其千里光酸部分的结构也存在很大的关系。HPA 存在于多种药用植物中,但目前关于其毒性、安全性的研究还很少,关于其致毒机制的研究也不够深入,目前更无解毒药物。因此,要充分利用细胞生物学、分子生物学、代谢组学等手段深入研究植物药中存在的 PA 类型及其构-毒关系,阐明 PA 的毒性机制,预测含 PA 植物药的毒性,进一步研究开发出拮抗 HPA 毒性的药物,以保证植物药的临床安全使用。

参 考 文 献

- [1] Chou MW, Fu PP. Formation of DHP-derived DNA adducts *in vivo* from dietary supplements and Chinese herbal plant containing carcinogenic pyrrolizidine alkaloids [J]. *Toxicol Ind Health*, 2006, 22(8):321-327.
- [2] Stickel F, Schuppan D. Herbal medicine in the treatment of liver diseases[J]. *Dig Liver Dis*, 2007, 39(4):293-304.
- [3] Fu PP, Xia Q, Lin G, et al. Pyrrolizidine alkaloids-genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation and mechanisms[J]. *Drug Metabolism Rev*, 2004, 36(1):1-55.
- [4] Green CE, Segall JH, Byard JL. Metabolism, cytotoxicity, and genotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid senecionine in primary cultures of rat hepatocytes[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1981, 60(2):176-185.
- [5] Muller L, Kasper P, Kaufmann G. The clastogenic potential *in vitro* of pyrrolizidine alkaloids employing hepatocyte metabolism [J]. *Mutat Res*, 1992, 282(3):169-176.
- [6] Williams GM, Mori H, Hirono I, et al. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids in the hepatocyte primary culture/DNA-repair test[J]. *Mutat Res*, 1980, 79(1):1-5.
- [7] Griffin DS, Segall HJ. Genotoxicity and cytotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids, a possible alkenal metabolite of the alkaloids, and related alkenals[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1986, 86(2):227-234.
- [8] Taylor DW, Wilson DW, Lame MW, et al. Comparative cytotoxicity of monocrotaline and its metabolites in cultured pulmonary artery endothelial cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 143(1):196-204.
- [9] Hoorn CM, Roth RA. Monocrotaline pyrrole-induced changes in angiotensin-converting enzyme activity of cultured pulmonary artery endothelial cells [J]. *Br J Pharmacol*, 1993, 110(2):597-602.
- [10] Hoorn CM, Wagner JG, Roth RA. Effects of monocrotaline pyrrole on cultured rat pulmonary endothelium [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, 120(2):281-287.
- [11] Wagner JG, Petry TW, Roth RA. Characterization of monocrotaline pyrrole-induced DNA cross-linking in pulmonary artery endothelium[J]. *Am J Physiol*, 1993, 264(5Pt1):L517-L522.
- [12] 季莉莉, 檀爱民, 汤俊, 等. 几种吡咯里西啶类生物碱对肝细胞毒性的探讨[J]. *中国天然药物*, 2004, 2(4):239-241.
- [13] Uhl M, Helma C, Knasmuller S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells[J]. *Mutat Res*, 2000, 468(2):213-225.
- [14] Zuckerman M, Steenkamp V, Stewart MJ. Hepatic veno-occlusive disease as a result of a traditional remedy: confirmation of toxic pyrrolizidine alkaloids as the cause, using an *in vitro* technique[J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55(9):676-679.
- [15] Ji LL, Zhao XG, Chen L, et al. Pyrrolizidine alkaloid clivorine inhibits human normal liver L-02 cells growth and activates p38 mitogen-activated protein kinase in L-02 cells [J]. *Toxicol*, 2002, 40(12):1685-1690.
- [16] Ji LL, Zhang M, Sheng YC, et al. Pyrrolizidine alkaloid clivorine induces apoptosis in human normal liver L-02 cells and reduces the expression of P53 protein[J]. *Toxicol In Vitro*, 2005, 19(1):41-46.
- [17] Tepe JJ, Williams RM. Reductive activation of a hydroxylamine hemiacetal derivative of dehydromonocrotaline: the first reductively activated pyrrolizidine alkaloid capable of cross-linking DNA[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 1999, 38(23):3501-3503.
- [18] Thomas HC, Lame MW, Dunston SK, et al. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 151(2):236-244.
- [19] Thomas HC, Lame MW, Morin D, et al. Prolonged cell-cycle ar-

- heart cell membranes of the rat[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2005, 14(Suppl):S83.
- [7] Dhein S, Michaelis B, Mohr FW. Antiarrhythmic and electrophysiological effects of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2005, 371(3):202–211.
- [8] Kim HK, Choi S, Choi H. Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding alpha-linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats[J]. *J Nutr Biochem*, 2004, 15(8):485–492.
- [9] Ghafoorunissa, Ibrahim A, Natarajan S. Substituting dietary linoleic acid with alpha-linolenic acid improves insulin sensitivity in sucrose fed rats[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1733(1):67–75.
- [10] Tremblay AJ, Despres JP, Piche ME, et al. Associations between the fatty acid content of triglyceride, visceral adipose tissue accumulation, and components of the insulin resistance syndrome[J]. *Metabolism*, 2004, 53(3):310–317.
- [11] Decsi T, Minda H, Hermann R, et al. Polyunsaturated fatty acids in plasma and erythrocyte membrane lipids of diabetic children[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2002, 67(4):203–210.
- [12] Dwivedi C, Natarajan K, Matthees DP. Chemopreventive effects of dietary flaxseed oil on colon tumor development[J]. *Nutr Cancer*, 2005, 51(1):52–58.
- [13] Maillard V, Bougnoux P, Ferrari P, et al. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France[J]. *Int J Cancer*, 2002, 98(1):78–83.
- [14] Chen J, Stavro PM, Thompson LU. Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor[J]. *Nutr Cancer*, 2002, 43(2):187–192.
- [15] Sauer LA, Dauchy RT, Blask DE. Mechanism for the antitumor and anticachectic effects of n-3 fatty acids[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(18):5289–5295.
- [16] Kato T, Hancock RL, Mohammadpour H, et al. Influence of omega-3 fatty acids on the growth of human colon carcinoma in nude mice[J]. *Cancer Lett*, 2002, 187(1/2):169–177.
- [17] Ralph HJ, Volker DH, Chin J. Effects of omega-3 fatty acid deficiency on rat intestinal structure and microbiology[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2004, 13(Suppl):S79.
- [18] Munsterman AS, Bertone AL, Zachos TA, et al. Effects of the omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid, on lipopolysaccharide-challenged synovial explants from horses[J]. *Am J Vet Res*, 2005, 66(9):1503–1508.
- [19] Zhao G, Etherton TD, Martin KR, et al. Anti-inflammatory effects of poly-unsaturated fatty acids in THP-1 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(3):909–917.
- [20] Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases[J]. *J Am Coll Nutr*, 2002, 21(6):495–505.
- [21] Kew S, Banerjee T, Minihane AM, et al. Lack of effect of foods enriched with plant-or marine-derived n-3 fatty acids on human immune function[J]. *Am J Clin Nutr*, 2003, 77(5):1287–1295.
- [22] Newson RB, Shaheen SO, Henderson AJ, et al. Umbilical cord and maternal blood red cell fatty acids and early childhood wheezing and eczema[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 114(3):531–537.
- [23] Joshi K, Lad S, Kale M, et al. Supplementation with flax oil and vitamin C improves the outcome of attention deficit hyperactivity disorder(ADHD)[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2006, 74(1):17–21.
- [24] Weiss LA, Barrett-Connor E, von Muhlen D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study[J]. *Am J Clin Nutr*, 2005, 81(4):934–938.

(上接第 249 页)

- rest associated with altered cdc2 kinase in monocrotaline pyrrole-treated pulmonary artery endothelial cells[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 19(1):129–142.
- [20] Bellomo G, Thor H, Orrenius S. Increase in cytosolic Ca²⁺ concentration during t-butyl hydroperoxide metabolism by isolated hepatocytes involves NADPH oxidation and mobilization of intracellular Ca²⁺ stores[J]. *FEBS Lett*, 1984, 168(1):38–42.
- [21] Griffin DS, Segall HJ. Lipid peroxidation and cellular damage caused by the pyrrolizidine alkaloid senecionine, the alkenal trans-4-hydroxy-2-hexenal, and related alkenals[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1987, 3(4):379–390.
- [22] Griffin DS, Segall HJ. Role of cellular calcium homeostasis in toxic liver injury induced by the pyrrolizidine alkaloid senecionine and the alkenal trans-4-OH-2-hexenal[J]. *J Biochem Toxicol*, 1987, 2:155–167.
- [23] Griffin DS, Segall HJ. Effects of the pyrrolizidine alkaloid senecionine and the alkenals trans-4-OH-hexenal and trans-2-hexenal on intracellular calcium compartmentation in isolated hepatocytes[J]. *Biochem Pharmacol*, 1989, 38(3):391–397.
- [24] Kim HY, Stermitz FR, Li JK, et al. Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids[J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(6):619–625.
- [25] Coulombe RA Jr, Drew GL, Stermitz FR. Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, 154(2):198–202.