

表没食子儿茶素没食子酸酯对丙烯酰胺致小脑颗粒神经元 凋亡的影响

刘春芳¹, 江城梅², 周礼华²

(蚌埠医学院 1. 第一附属医院, 安徽 蚌埠 233004; 2. 预防医学系, 安徽 蚌埠 233030)

[摘要] **目的:** 探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对丙烯酰胺(ACR)致小脑颗粒神经元(CGNs)凋亡的保护作用。**方法:** 体外培养的CGNs经不同浓度EGCG(5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)预处理48 h后, 加入ACR(5 mmol/L)染毒24 h, 用四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法检测细胞存活率, 测定细胞内超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)的含量, Hochst33342荧光显微镜染色观察凋亡时细胞核形态的变化, RT-PCR检测细胞bcl-2 mRNA与bax mRNA表达情况。**结果:** 同ACR损伤组比较, 终浓度为10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的EGCG能减轻ACR引起的CGNs的损伤, 明显提高细胞的存活率($P < 0.05$), SOD活性增高, MDA含量降低。Hoechst33342染色发现细胞核固缩、致密浓染现象较ACR损伤组改善明显, bcl-2 mRNA表达增强, bax mRNA表达减弱, bcl-2/bax比值降低($P < 0.05$), 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG组保护效果最佳($P < 0.01$), 而终浓度为100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG组无明显保护作用。**结论:** EGCG在一定剂量范围内对ACR引起的CGNs凋亡有保护作用。

[关键词] 表没食子儿茶素没食子酸酯; 丙烯酰胺; 小脑颗粒神经元; 细胞凋亡; 神经保护

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.09.016

Protective effect of epigallocatechin-3-gallate on apoptosis of rat cerebellar granule neurons induced by acrylamide

LIU Chunfang¹, JIANG Chengmei², ZHOU Lihua²

(1. First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;
2. Department of Preventive Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

ABSTRACT

Objective: To investigate the protective effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on apoptosis of cerebellar granule neurons (CGNs) induced by acrylamide (ACR).

Methods: CGNs were cultured with the addition of 5 mmol/L ACR for 24 hours to set up a cell injury model. Prior to ACR treatment, CGNs were treated with different concentrations of EGCG (0, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours. Neuronal viability was measured with methylthiazolyltetrazolium (MTT). The activity of SOD and the content of MDA were assayed. Hoechst33342 staining was employed to observe morphological changes of the cell nucleus. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to measure expression of bcl-2 mRNA and bax mRNA.

收稿日期 (Date of reception): 2011-08-01

作者简介 (Biography): 刘春芳, 硕士研究生, 主要从事营养与健康研究。

通信作者 (Corresponding author): 江城梅, Email: jcm82010@sohu.com

基金项目 (Foundation item): 安徽省教育厅自然科学基金项目(2006kj345B)。 This work was supported by Natural Science Foundation of the Department of Education of Anhui Province, P. R. China (2006kj345B).

Results: At the concentrations of 10, 25 or 50 $\mu\text{mol/L}$, EGCG played a protective role against ACR-induced CGN injury. Compared with ACR injured group (no EGCG), EGCG improved the cell viability, enhanced SOD activity, decreased the level of MDA as well as the cell apoptosis ratio ($P < 0.05$). Bcl-2 mRNA expression was increased and bax mRNA expression was reduced ($P < 0.05$). 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG had the largest effect. However, 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG did not have a significantly protective effect.

Conclusion: EGCG at appropriate concentration has protective effect against the CGNs on apoptosis induced by ACR.

KEY WORDS

epigallocatechin-3-gallate (EGCG); acrylamide; cerebellar granule neurons; cell apoptosis; neuroprotection

丙烯酰胺 (acrylamide, ACR) 是一种被广泛使用的有机化工原料, 是职业环境中的污染物。ACR 对普通人群的主要危害是饮用被 ACR 污染的水和吸烟, 但自 2002 年 2 月以来, 科学家在一些油炸和高温烘烤的食品检出大量的 ACR, 超过饮水中允许最大限量 (成人每日 $< 1 \mu\text{g}$) 的 500 多倍, 这一发现引起了 WHO 的高度关注。神经系统是 ACR 毒作用的重要靶点, ACR 可以通过氧化应激产生大量自由基并且能够抑制氧化酶活性, 导致细胞凋亡, 引起神经细胞损伤^[1-2]。来自茶叶中的表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 是茶多酚中最主要的生物活性成分, 强抗氧化剂和自由基清除剂, 具有抗氧化、抗凋亡、保护神经元^[3-6]等作用, 但其是否具有保护 ACR 诱导的神经细胞损伤作用及其可能机制报道甚少, 本研究建立 ACR 诱导小脑颗粒神经元 (CGNs) 凋亡模型, 探讨 EGCG 对于 ACR 诱导 CGNs 凋亡的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级 SD 大鼠, 实验用新生 5~7 d 的 SD 大鼠, 每批 4 只, 体质量 (10 ± 1.5)g, 雌雄不限, 由蚌埠医学院动物实验室提供。

1.2 主要试剂及仪器

EGCG 购自浙江乾盛康药业有限公司; 胎牛血清系杭州四季青公司产品; DMEM/F-12 干粉培养基购自美国 Invitrogen 公司; ACR、MTT、DMSO、胰酶、多聚赖氨酸购自美国 Sigma 公司; 神经元特异性烯醇化酶多克隆一抗 (兔抗鼠)、FITC 荧光二抗 (羊抗兔) 购自武汉博士德公司; 总超氧化物歧化酶 (T-SOD)、微量 MDA、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所;

TRIzol、RT 反转录试剂盒、DL500、Hoechst33342 购自江苏碧云天生物技术研究所; PCR 试剂盒购自美国 Fermentas 公司; 阿糖胞苷购自吉林一心制药股份有限公司; 庆大霉素购自南京金陵药业股份有限公司; SHELLAB 型 CO_2 培养箱, 生物倒置显微镜和荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; Synergy 2 型酶标仪购自美国 Biotek 公司; 超低温离心机购自德国 Eppendorf 公司; 超声波细胞粉碎机购自宁波新芝生物科技有限公司; 凝胶成像分析系统购自上海天能科技有限公司; DYY-III 型水平电泳仪购自北京市六一仪器厂; 梯度 PCR 仪购自东胜国际贸易有限公司; 全自动高压灭菌器购自日本三菱集团; 垂直层流工作台购自蚌埠净化设备厂; 血球计数板购自上海新亚医用光学仪器厂; 电子分析天平购自北京赛多利斯天平有限公司; Mili-Q Biocel 超纯水仪购自美国 Millipore 公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养

参照 Yan 等^[7]的方法, 结合预试验情况进行, 取出生 5~7 d 的 SD 大鼠, 用 75% 乙醇消毒, 无菌条件下取出小脑, 放入 D-Hank's 平衡液中, 仔细分离血管, 去除脑膜, 剪成 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 大小的组织块, 加入 0.125% 的胰酶, 细口径管轻柔吹打数次, 置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中消化 10 min, 吸出消化的细胞悬液加入等体积的含血清培养液终止消化, 离心 5 min 后弃上清液, 加入种植培养液吹打成细胞悬液, 以 5×10^5 个 /L 的密度接种于培养基中 (含体积分数为 10% 胎牛血清, 5 万 U/L 庆大霉素), 培养板预先以左旋多聚赖氨酸 (0.1 mg/mL) 包被处理, 置于 37°C , 5% CO_2 孵箱中培养。体外培养 24 h 加入终浓度 $10 \mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷以抑制胶质细胞的增殖, 3~4 d 半量换液, 6~8 d 的细胞成熟可用于下一步实验。

1.3.2 神经元特异性烯醇化酶(NSE)免疫荧光染色

NES是神经细胞所特有的一种酸性蛋白酶,定位于胞浆和突起,常作为神经元的标志物,一抗NSE与神经元胞浆的NSE结合,带有荧光染料二抗与一抗结合后发出绿色荧光,阴性对照无绿色荧光。细胞体外培养6~8 d,从孔板内取出盖玻片用磷酸盐缓冲液(PBS)轻柔冲洗,4%多聚甲醛固定20 min, PBS冲洗,0.2% TritonX-100破膜20 min, PBS冲洗,5%牛血清白蛋白室温封闭30 min后加入NSE兔抗鼠多克隆抗体(1:35)于湿盒内4℃冰箱过夜,次日37℃复温1 h,加入FITC羊抗兔IgG荧光二抗(1:30)进行标记后于荧光显微镜下观察、拍照。阴性对照除用PBS替代一抗外,其余步骤相同。高倍镜下随机抽取5个视野内全部细胞及阳性细胞计数,计算神经元纯度,神经元纯度=(阳性细胞数/总细胞数)×100%,取其平均值。

1.3.3 ACR损伤浓度的筛选

采用MTT法检测浓度为0.5, 1, 2, 4, 8 mmol/L的ACR进行损伤CGNs 24 h,用全自动多功能酶标仪(λ 570)测定各孔吸光度(A值),计算神经细胞抑制率(inhibit rate, IR)=(1-实验组平均A/正常组平均A)×100%,实验重复3次,求平均值。计算其24 h的IC₅₀值为4.802,95%的置信区间4.376~5.614,取值5 mmol/L为ACR的IC₅₀值进行后续实验。

1.3.4 MTT比色法检测细胞存活率

根据预实验结果,将CGNs以 5×10^5 个/L密度接种于96孔板,每孔200 μ L。细胞分为正常对照组,5 mmol/L ACR损伤组,5, 10, 25, 50, 100 μ mol/L EGCG拮抗组,EGCG预处理48 h后全量换液,再加入ACR继续培养24 h,每组设5个复孔。药物处理后,每孔加入5 mg/L四甲基偶氮唑盐(MTT)溶液,继续培养4 h,吸尽培养液,加入二甲亚砜(DMSO)100 μ L。用酶标仪检测在570 nm波长处测定吸光值,细胞的存活率=(实验组A₅₇₀-空白组A₅₇₀)/(对照组A₅₇₀-空白组A₅₇₀)×100%。

1.3.5 细胞内SOD及MDA的检测

各组细胞经药物处理后,吸去培养液,以冷PBS

溶液洗涤细胞2次,用细胞刮刀刮下细胞,冷生理盐水收集。在冰浴中用超声细胞破碎仪破碎细胞,显微镜下观察无细胞后,取100 μ L细胞破碎液,用黄嘌呤氧化酶法测定T-SOD,硫代巴比妥酸(TBA)法测定MDA。按照测定试剂盒说明,用Synergy 2型酶标仪于波长550 nm测定SOD含量,532 nm处测定MDA含量,用考马斯亮蓝测定蛋白浓度。总SOD活力=(对照管A值-测定管A值)÷对照管A值÷50%×反应液总体积÷取样量÷细胞蛋白浓度,MDA含量=(测定管A值-测定空白管A值)÷(标准管A值-标准空白管A值)×标准品浓度÷细胞蛋白含量。

1.3.6 Hoechst33342染色检测细胞核形态变化

将培养的CGNs细胞种于6孔板中,药物处理结束,吸去培养液,PBS洗涤,依次加入1 mL细胞染色缓冲液和5 mL Hoechst33342染色液,避光4℃染色20~30 min,染色后PBS洗涤1次,荧光显微镜下观察细胞核形态,并随机选取4个视野计数,凋亡百分率=凋亡细胞数/细胞总数×100%。

1.3.7 RT-PCR

药物处理后收集细胞,TRIzol法提取总RNA,紫外分光光度计准确定量其浓度和纯度,RNA的反转录操作步骤按试剂盒说明进行,反转录合成cDNA。采用primer premier 5引物设计软件设计各凋亡相关基因的PCR扩增引物,并经过PubMed提供的BLAST程序验证其特异性,由上海生工生物工程股份有限公司合成,各引物序列及目地带长度如表1。对目的基因进行分组扩增。bax扩增条件:95℃预变性3 min,95℃变性30 s,63.4℃退火30 s,72℃延伸45 s,反应30个循环,72℃延伸10 min;bcl-2扩增条件:94℃预变性4 min,94℃变性50 s,56.5℃退火50 s,72℃延伸50s,反应32个循环,72℃延伸10 min; β -actin扩增条件:95℃预变性3 min,95℃变性50s,54.1℃退火50 s,72℃延伸50 s,反应30个循环,72℃延伸10 min。取PCR产物4 μ L,在2.0%琼脂糖凝胶上电泳,凝胶成像系统扫描观察并摄像,以 β -actin的灰度值作为内参照,根据目的基因与内参照电泳条带灰度值之比,进行bcl-2和bax mRNA表达水平的半定量分析。

表1 PCR引物序列及退火温度

Table 1 PCR primers and annealing temperature

目的基因	序列	片段大小 /bp	退火温度 /℃
bax	正义 5'-CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCTC-3'	147	63.4
	反义 5'-AGTTGCCATCAGCAAACATGTCA-3'		
bcl-2	正义 5'-CTGGTGGACAACATCGCTCTG-3'	227	56.5
	反义 5'-GGTCTGCTGACCTCACTTGTG-3'		
β -actin	正义 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3'	321	54.1
	反义 5'-GGCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'		

1.4 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS17.0 统计软件进行分析, 组间比较采用单因素方差分析。半数抑制浓度用 Probit 分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NES 鉴定 CGNs 纯度

培养 6~8 d 的大鼠 CGNs, NSE 阳性细胞在 90% 左右 (图 1)。

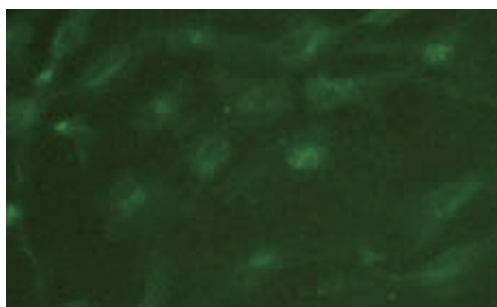


图 1 NSE 鉴定的小脑颗粒神经元 ($\times 200$)。

Figure 1 Cerebellar granule neurons were identified by NSE immunofluorescence ($\times 200$).

2.2 EGCG 对 ACR 损伤 CGNs 存活率的影响

EGCG 以浓度为 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$ 进行预处理 48 h, ACR 5 mmol/L 损伤 24 h, 来探讨 EGCG 对 ACR 所诱导 CGNs 损伤的保护作用。结果发现一定浓度 EGCG 预处理 48 h 可降低 ACR 对 CGNs 的损伤, 与 ACR 损伤组相比, 10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组细胞存活率逐渐上升且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 25 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组效果最佳 ($P < 0.01$), 5 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 组细胞存活率有一定上升, 但差异无统计学意义, 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 预处理组细胞活力上升不明显 ($P > 0.05$, 图 2)。

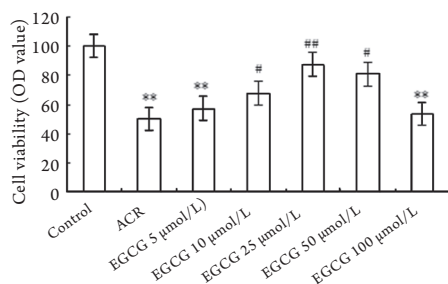


图 2 MTT 检测 EGCG 不同剂量组对丙烯酰胺致 CGNs 细胞活性的影响。

Figure 2 Effect of EGCG on cell viability of primary cerebellar granule neurons measured by MTT assay. * $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs ACR group.

2.3 细胞内 SOD 与 MDA 含量的变化

丙烯酰胺处理细胞后, SOD 活性明显降低, MDA 含量明显升高, 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 不同剂量 EGCG (10, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 48 h 后, 加入 ACR 后检测 SOD 活性明显高于 ACR 损伤组, MDA 含量则低于 ACR 损伤组 (表 2)。

表 2 不同剂量 EGCG 对丙烯酰胺诱导 CGNs 损伤时细胞内 SOD 活性及 MDA 含量的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of EGCG on SOD activity and MDA content in primary cerebellar granule neurons ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD/(U/mgprot)	MDA/(nmol/mgprot)
正常对照组	48.95 ± 3.3	3.31 ± 0.4
ACR 损伤组	24.98 ± 4.2**	6.74 ± 0.4**
EGCG 10 $\mu\text{mol/L}$	33.71 ± 2.1*	5.96 ± 0.3*
25 $\mu\text{mol/L}$	41.13 ± 2.4**	4.24 ± 0.5**
50 $\mu\text{mol/L}$	35.34 ± 4.4*	5.32 ± 0.3*

与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与 ACR 损伤组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 EGCG 对 ACR 损伤 CGNs Hoechst33342 染色结果的影响

细胞核浓缩聚集是细胞凋亡的特征性表现之一。荧光显微镜下观察发现: 正常对照组细胞核呈蓝色, 边缘光滑, 均匀淡染, ACR 损伤组部分细胞核固缩, 呈致密浓染, 显示较强荧光, 细胞结构损伤甚至可见胞核裂解, 产生凋亡小体, 而 EGCG 预处理组细胞核形态改善, 荧光强度减弱。ACR 损伤组细胞凋亡率 (41.23 ± 3.7)% 较正常组 (4.53 ± 1.3)% 明显升高 ($P < 0.01$)。EGCG (10, 50 $\mu\text{mol/L}$) 预处理组细胞凋亡率分别为 (33.15 ± 2.9)% 和 (25.42 ± 3.5)%, 与 ACR 损伤组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EGCG 预处理组 25 $\mu\text{mol/L}$ 细胞凋亡率为 (17.24 ± 2.7)%, 与 ACR 损伤组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。这些结果与前述 MTT 结果一致, 提示 EGCG 能在一定程度上抑制 ACR 诱导的 CGNs 的凋亡 (图 3)。

2.5 EGCG 对 ACR 诱导 CGNs 损伤时 bcl-2 mRNA 和 bax mRNA 表达的影响

选择 EGCG 预处理 48 h 效果最佳的 25 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 进行 RT-PCR, ACR 损伤细胞 24 h 后, 与正常对照组相比, 细胞 bcl-2 mRNA 表达减弱, 细胞 bax mRNA 基因表达增强, bcl-2/bax 比值降低; 而 EGCG 预处理后, 细胞 bcl-2 mRNA 表达增强, 细胞 bax mRNA 表达减弱, bcl-2/bax 比值升高 ($P < 0.05$; 表 3, 图 4)。

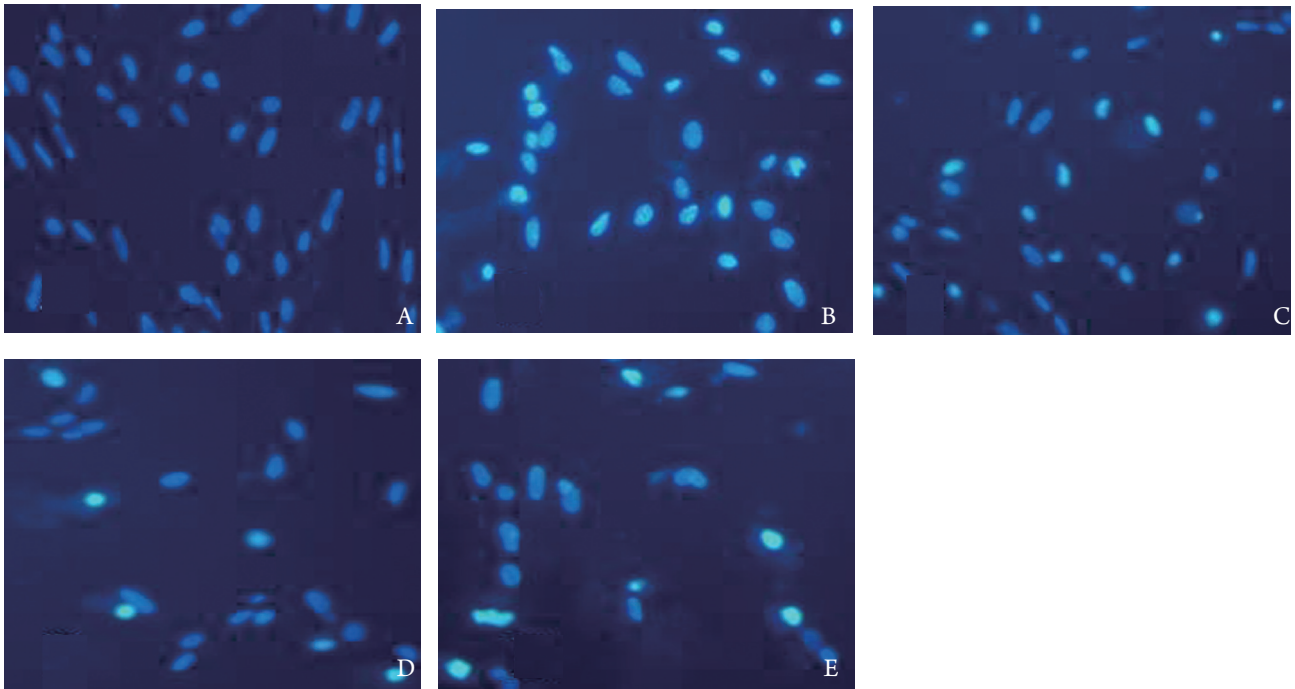


图3 EGCG对丙烯酰胺损伤小脑颗粒神经元细胞核形态的影响($\times 200$)。A: 对照组; B: ACR损伤组; C: EGCG 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; D: EGCG 25 $\mu\text{mol/L}$ 组; E: EGCG 50 $\mu\text{mol/L}$ 组。

Figure 3 Morphological features of apoptosis of primary cerebellar granule neurons stained by Hoechst33342 ($\times 200$). A: Control group; B: ACR group; C: EGCG 10 $\mu\text{mol/L}$ group; D: EGCG 25 $\mu\text{mol/L}$ group; E: EGCG 50 $\mu\text{mol/L}$ group.

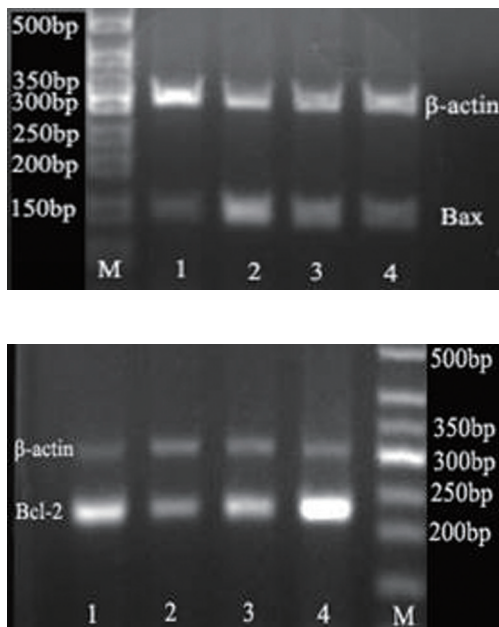


图4 EGCG对ACR诱导CGNs损伤时bcl-2 mRNA和bax mRNA表达的影响。M: Marker; 1: 正常对照组; 2: ACR损伤组; 3: EGCG 50 $\mu\text{mol/L}$ 预处理组; 4: EGCG 25 $\mu\text{mol/L}$ 预处理组。

Figure 4 Bcl-2 mRNA and bax mRNA expression in each group. M: Marker; 1: Control group; 2: ACR group; 3: EGCG 50 $\mu\text{mol/L}$ group; 4: EGCG 25 $\mu\text{mol/L}$ group.

表3 EGCG对ACR诱导CGNs损伤时bcl-2 mRNA和bax mRNA表达的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Bcl-2 mRNA and bax mRNA expression in each group ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	bcl-2 mRNA	bax mRNA	bcl-2/bax
正常对照组	1.21 \pm 0.02	0.33 \pm 0.09	3.67 \pm 0.03
ACR损伤组	0.89 \pm 0.07 ^{**}	0.67 \pm 0.06 ^{**}	1.33 \pm 0.02 ^{**}
EGCG 25 $\mu\text{mol/L}$	1.10 \pm 0.03 ^{**}	0.45 \pm 0.04 ^{**}	2.44 \pm 0.06 ^{**}
50 $\mu\text{mol/L}$	2.44 \pm 0.06 ^{**}	0.52 \pm 0.13 ^f	1.81 \pm 0.03 ^f

与正常对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与ACR损伤组比较, ^f $P < 0.05$, ^{**f} $P < 0.01$ 。

3 讨论

ACR对人体毒性较为重要的是神经毒性,而氧化应激又是ACR诱导细胞损伤的关键机制^[8]。SOD是体内非常重要的自由基清除剂,可使自由基转变为过氧化氢,再通过过氧化氢酶转变成水,减轻细胞损伤。MDA是脂质过氧化反应的终产物,因而MDA的含量常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反映出细胞受损伤程度。正常情况下,体内自由基的产生和清除处于动态平衡,一旦体内自由基和活性氧产生过多,可直接导致细胞凋亡^[9]。细胞凋亡是细胞自主性有序的死亡过程,涉及一系列基因的激

活、表达以及调控等作用。bcl-2 基因是 bcl 家族中抗凋亡的代表, 其抗凋亡作用可能与清除自由基、减轻脂质过氧化损伤有关^[10]。Bax 是 bcl-2 家族中的促凋亡成分, 是第一个被确认的 bcl-2 同源基因, 能与自身或 bcl-2 形成同源或异源二聚体, bax 和 bcl-2 同源和异源二聚体的比例是决定细胞命运的重要因素^[11]。大量实验证实 ACR 通过脂质过氧化产生大量自由基、抑制抗氧化酶活性, 导致神经元变性和神经功能失调^[12-13]。本实验研究发现: ACR 处理 CGNs 细胞后, 与正常对照组比较, SOD 活性明显降低, MDA 含量明显升高, 可见胞核裂解及凋亡小体的产生, 并抑制 bcl-2 mRNA 的表达, 增强 bax mRNA 表达, 增加凋亡细胞的发生, 与 Li 等^[14-15] 研究一致。

近年来研究^[16-17] 证明 EGCG 在清除活性氧自由基、调节抗氧化酶活性、螯合铁离子、保护神经元作用、防治神经退行性疾病、抗凋亡等方面起重要作用。其抗凋亡机制可能是通过 EGCG 清除活性氧自由基, 促进 bcl-2 mRNA 表达和抑制 bax mRNA 表达实现的^[18-19]。本实验研究发现 EGCG 预处理 CGNs 48 h 后, 对 ACR 诱导的细胞凋亡具有保护作用, 表现为提高细胞存活率、增强 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 增强 bcl-2 mRNA 的表达, 减弱 bax mRNA 表达, 提高 bcl-2/bax 比值, EGCG 的上述作用在一定浓度范围内具有良好的保护作用, 以 25 $\mu\text{mol/L}$ 作用最为明显。EGCG 在体外相对较高的微摩尔浓度条件下容易自身氧化^[20], 本实验用 100 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 处理时, 发现 CGNs 出现了明显的凋亡特征, 染色质固缩, 细胞核呈致密浓染, 这可能是 EGCG 增加细胞内自由基水平, 诱导胞内钙超载, 降低线粒体膜电位, 通过线粒体途径诱导细胞的凋亡所产生的^[21-22]。因此, 一定浓度的 EGCG 对 ACR 引起的大鼠 CGNs 损伤具有保护作用, 主要是通过提高细胞抗氧化能力, 降低自由基产生, 抗凋亡来实现的, 但 EGCG 作为一种多功能、多靶点抗氧化剂, 对培养大鼠小脑皮层神经元保护作用的机制还有待深入研究。

志 谢

本课题实验大部分是在安徽省感染与免疫重点实验室完成的, 得到李柏青教授、吕合作博士、高琴博士的大力帮助, 在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

1. Shuming C, Jilin F, Xichun Z. The moderating role of dark soy sauce

- to acrylamid -induced oxidative stress and neurophysiological perturbations in rats[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2009, 19 (6/7): 434-440.
2. Zhu Y J, Zeng T, Zhu Y B, et al. Effects of acrylamide on the nervous tissue antioxidant system and sciatic nerve electrophysiology in the rat[J]. *Neurochem Res*, 2008,33(11):2310-2317.
3. Kim CY, Lee C, Park GH, et al. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against beta-amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity[J]. *Arch Pharm Res*, 2009, 32(6): 869-881.
4. 焦西英, 杨浩, 钱新宏, 等. EGCG对过氧化氢所致神经元过氧化损伤的保护作用[J]. *解剖学研究*, 2008, 30(6): 401-404. JIAO Xiyang, YANG Hao, QIAN Xinhong, et al. Protective effect of tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on peroxidation-injured neurons acutely exposed to hydrogen peroxide[J]. *Anatomy Research*, 2008, 30(6): 401-404.
5. Reznichenko L, Amit T, Zheng H, et al. Reduction of iron-regulated amyloid precursor protein and beta-amyloid peptide by (-)-epigallocatechin-3-gallate in cell cultures: implications for iron chelation in Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2006, 97(2): 527-536.
6. 赵保路. 茶多酚保护脑神经防止帕金森病损伤作用及其分子机理[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(7): 735-743. ZHAO Baolu. Protective effects of green tea polyphenols against Parkinson's disease[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, 35(7): 735-743.
7. Yan GM, Irwin RP, Lin SZ, et al. Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995, 274(2): 983-990.
8. Yousef MI, El-demerdash FM. Acrylamide-induced oxidative stress and biochemical perturbations in rats[J]. *Toxicology*, 2006, 219(1-3):133-141.
9. Choudhary M, Jetley UK, Abash Khan M, et al. Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-SS[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2007, 66(2): 204-209.
10. Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(3): 83-86.
11. Petros AM, Oloniezak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2/3): 83-94.
12. Park HR, Kim MS, Kim SJ, et al. Acrylamide induces cell death in neural progenitor cells and impairs hippocampal neurogenesis[J]. *Toxicol Lett*, 2010, 193(1): 86-93.
13. Sumizawa T, Igisu H. Suppression of acrylamide toxicity by carboxyfullerene in human neuroblastoma cells in vitro[J].

- ArchToxicol, 2009, 83(9): 817-824.
14. Li SX, Cui N, Zhang CL, et al. Effect of subchronic exposure to acrylamide induced on the expression of bcl-2, bax and caspase-3 in the rat nervous system[J]. *Toxicology*, 2006, 217(1): 46-53.
 15. Sumizawa T, Igisu H. Apoptosis induced by acrylamide in SHSY5Y cell [J]. *Arch Toxicol*, 2007, 81(4): 279-282.
 16. Barranco Quintana JL, Allam MF, Del Castillo AS, et al. Parkinson's disease and tea: a quantitative review[J]. *J Am Coll Nutr*, 2009, 28(1): 1-6.
 17. Mandel SA, Amit T, Kalfon L, et al. Cell signaling pathways and iron chelation in the neurorestorative activity of green tea polyphenols: special reference to epigallocatechin gallate (EGCG)[J]. *J Alzheimers Dis*, 2008, 15(2): 211-222.
 18. 卿春华, 陈平, 向旭东. 茶多酚对低剂量烟草悬浮物诱导人支气管上皮细胞氧化损伤及凋亡的影响[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2010, 35(2): 123-128.
QING Chunhua, CHEN Ping, XIAN Xudong. Effect of tea polyphenols on oxidative damage and apoptosis in human bronchial epithelial cells induced by low-dose cigarette smoke condensate[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2010, 35(2): 123-128.
 19. 陈旭, 胡园, 李青山, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯对H₂O₂诱导的SH-SY5Y神经细胞损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2011, 27(3): 320-324.
CHEN Xu, HU Yuan, LI Qingshan, et al. The protective effect of EGCG on hydrogen peroxide induced SH-SY5Y cell injury[J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2011, 27(3): 320-324.
 20. Yang CS, Lambert JD, Hou Z, et al. Molecular targets for the cancer preventive activity of tea polyphenols[J]. *Mol Carcinog*, 2006, 45(6): 431-435.
 21. Kanadzu M, Lu Y, Morimoto K. Dual function of (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) in healthy human lymphocytes[J]. *Cancer Lett*, 2006, 241(2): 250-255.
 22. Yin ST, Tang ML, Deng HM, et al. Epigallocatechin-3-gallate induced primary cultures of rat hippocampal neurons death linked to calcium overload and oxidative stress [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2009, 379(6): 551-564.

(本文编辑 彭敏宁)