

茶多酚对鼠胎儿成纤维细胞凋亡的影响

王洋 盛宇 李钟淑* 方南洙 金一

(延边大学农学院,吉林延吉 133002)

摘要 为探究茶多酚(Tea polyphenols, TP)对体外培养鼠胎儿成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF)凋亡的影响。在 MEF 细胞培养液中添加质量浓度为 0、10、40、70、100 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TP,分别培养 24、48、72 和 96 h,使用 MTT 法(3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐,噻唑蓝,MTT 法)检测细胞活力;细胞培养 72 h,以 RT-PCR 检测 B-细胞淋巴瘤/白血病-2 原癌基因(B cell lymphoma leukemia-2, Bcl-2)和 Bcl 相关的蛋白 X(Bcl-associated X protein, Bax)、半胱天冬酶-3(Caspase-3)的相对表达量。MTT 结果表明:TP 质量浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞密度略高于其他组,但是没有显著差异($P>0.05$);质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对 MEF 的生长产生抑制作用($P<0.05$),细胞形态没有发生明显变化;当质量浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对细胞生长抑制作用明显($P<0.05$),从形态观察细胞出现凋亡;通过反转录结果表明,对 Bax 基因、Bcl-2 基因和 Caspase-3 基因的分子转录水平没有影响($P>0.05$),表明质量浓度高于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TP 对 MEF 生长产生抑制作用,但对 Bax 基因、Bcl-2 基因和 Caspase-3 转录分子机制无影响。

关键词 茶多酚;鼠胎儿成纤维细胞;细胞凋亡;反转录

中图分类号 Q 813; S 865.1⁺3

文章编号 1007-4333(2015)02-0149-07

文献标志码 A

Effects of tea polyphenols on the apoptosis of mouse embryonic fibroblast

WANG Yang, SHENG Yu, LI Zhong-shu*, FANG Nan-zhu, JIN Yi

(Agricultural College of Yanbian University, Yanji 13002, China)

Abstract In order to explore the effects of tea polyphenols (TP) on the apoptosis of mice fetal fibroblast cells (MEF) culture in vitro, MEF cells were cultured, adding 0, 10, 40, 70, 100 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentrations of TP in the MEF culture fluid and using MTT method, the cell viability was assayed. After 72 hours of the cultured cell, using RT-PCR, the transcription of gene Bcl-2 (B cell lymphoma leukemia-2), Bax (Bcl-associated X protein) and Caspase-3 was tested. Using the beta-actin gene as internal reference, the relative expression amount was tested. The results of MTT method (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide), showed that when the concentration of TP was 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the growth of MEF ($P<0.05$) was inhibited and the cell morphology had no different changes. At the concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the result was a bit higher than in other groups, but there were no significant differences ($P>0.05$). When the TP concentration was 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the inhibition function was significant ($P<0.05$), and the cell morphology had changes. The RT-PCR results showed that TP had no effect on the molecular transcription level of Bax gene, Bcl-2 gene and Caspase-3 gene ($P>0.05$). When the TP concentration was higher than 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, the growth of MEF was inhibited, and there was nothing to do with gene Bax, gene Bcl-2 and Caspase-3 transcription molecular mechanism.

Key words TP; MEF; apoptosis; RT-PCR

细胞凋亡(Apoptosis)是生物体内自发发生的细胞生理性的死亡,具有维持生物体正常生长发育

和细胞内环境稳态的作用,异常细胞凋亡能够引发疾病,如癌症和肿瘤等。在体外培养的细胞中添加

收稿日期:2014-07-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31360546);吉林省科技厅重点项目(20100228)

第一作者:王洋,硕士研究生,E-mail:364271130@qq.com

通讯作者:李钟淑,教授,主要从事动物遗传育种研究,E-mail:lizhongshu@ybu.edu.cn

抗氧化剂能够抑制细胞凋亡,茶多酚(Tea polyphenols, TP)具有多种生物学功能,抗氧化能力比其他抗氧化剂强很多倍,对抑制癌细胞和肿瘤细胞的生长作用效果显著。对肺癌^[1]、胃癌^[2]、结肠癌^[3]、乳腺癌^[4]、上皮细胞癌^[5]、前列腺癌^[6]和白血病^[7]等疾病具有预防和治疗的作用。对神经细胞具有保护作用,能够缓解紫外线照射产生的皮肤癌,也有研究表明 TP 具有毒性效果^[8],1~100 mg/L 质量浓度的 TP 能够改善正常人和 2-型糖尿病患者外周血早期内皮足细胞衰老和氧自由基损伤^[9]。但是在体细胞培养液中添加 TP 对体外培养鼠胎儿成纤维细胞凋亡效果的影响尚未见报道,因此,本研究用 TP 处理 MEF 细胞,并进一步从分子水平上分析 TP 作用的机理,确定 TP 对 MEF 细胞的生长和凋亡的影响,旨在为探究茶多酚对体外培养鼠胎儿成纤维细胞(Mouse embryonic fibroblast, MEF)凋亡的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

本研究用小鼠购自延边大学动物试验中心(SPF级),茶多酚(≥98%)购自广州市齐云生物技术有限公司,马绒毛膜促性腺激素(PMSG),人绒毛膜促性腺激素(HCG)购自宁波第二激素厂,分子试剂均购自大连宝生物公司和美国 Invitrogen 公司,其他试剂购自美国 sigma 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 昆明鼠饲养及扩繁

健康性成熟的雌雄昆明小白鼠,于 16:00—

16:30,按 1:1 合笼,次日 8:00 前验栓,见栓之日记为 0.5 d,光照时间为 8:00—20:00,共 12 h,供给充足的饲料和饮水。

1.2.2 MEF 细胞的原代培养及传代培养

脱颈法处死妊娠第 12.5 天的昆明妊娠母鼠,剖腹依次无菌分离出子宫、胎儿,剥离胎鼠头、内脏和四肢,分离躯干部,用 PBS 反复清洗躯干组织,洗除血红细胞等,至无血迹为止。热消化法分离原代细胞,用眼科剪反复剪碎胎鼠躯干部,剪成小碎块(约 1 mm³),将碎块移入 10 mL 离心管,1 000 r/min 离心 5 min,吸弃上清,加入 0.25% CE,放入 37.5 °C 培养箱中消化 1 min,消化下细胞,加入的 DMEM 培养液终止消化,吹匀,形成细胞悬液,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 3 次,后加入含 10% FBS 的 DMEM 溶液,吹悬成细胞悬液,以适量密度接种到卡式瓶内,放入培养箱中培养,待细胞长至 80% 汇合度时,传至细胞培养板,一直进行传代,每 2 d 更换一次培养液。

1.2.3 不同质量浓度的 TP 培养液培养的细胞活力的检测

根据文献^[10]选取已经纯化的 3 代细胞,使用 96 孔细胞板调整细胞密度 1×10^4 个/孔,分别用含 0、10、40、70、100 和 150 μg/mL 的 TP 细胞培养液培养细胞 24、48、72 和 96 h,将仪器吸光度值设为 562,检测此时的数值 OD 值,试验重复 3 次,进行数据处理。

1.2.4 基因相对表达量检测

根据文献资料^[11-13],设计以下引物(表 1)。以 β-actin 做内参基因用于 RT-PCR 反应。

表 1 扩增基因所用引物
Table 1 Primers for genes amplification

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature	产物大小/bp Product size
<i>Bcl-2</i>	CTACCGTCGATTCGC CCAGGTATGCACCCAGAG	54.5	389
<i>Bax</i>	ACAGGGTTTCATCCAGGATCGAG AGTCCAAGGCAGTGGGAGCCTCA	58.5	520
<i>Caspase-3</i>	ACTGGAATGTCATCTCGCTCTG CCACGACCGTCCTTTGA	55.0	468
<i>β-actin</i>	GGGACCTGACAGACTACCT CGTACTCCTGCTTGCTGA	55.0	540

按照试剂盒提取培养 72 h 细胞总 RNA, 检测 RNA 的纯度和浓度, 根据试剂盒按照扩增反应体系 $10 \mu\text{L}$, 反应条件 37°C , 15 min, 3 个循环; 85°C , 5 s 合成 cDNA。之后进行下步 PCR 反应, β -actin 反应体系为 $50 \mu\text{L}$, 其余均为 $25 \mu\text{L}$ 。扩增反应条件: β -actin, 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 45 s, 共 35 个循环; Bcl-2, 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 54.5°C 退火 30 s, 72°C , 45 s 延伸, 共 35 个循环; Bax, 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 58.5°C 退火 1 min, 72°C 延伸 45 s, 共 35 个循环; Caspase-3, 95°C 预变性 5 min, 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s 共 30 个循环, 以上 PCR 反应最终都以 72°C 终延伸 10 min。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 数据统计

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据统计分析, Gel-Pro analyzer 软件量化分析琼脂糖凝胶电泳条

带灰度, 试验结果表示形式为 $\overline{\text{OD}} \pm S$, 差异采用 ANOVA 分析比较检测, 以 $P < 0.05$ 为差异存在显著性。

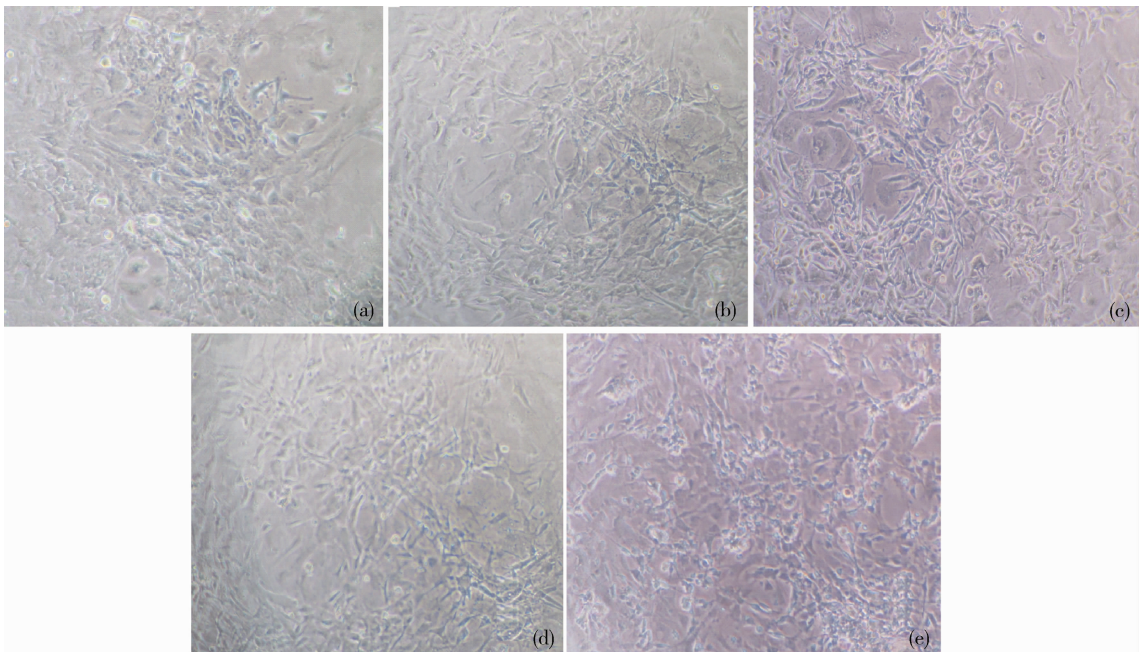
目的基因的相对表达量 =

目的基因灰度值 \div 内参基因灰度值 $\times 100\%$

2 结果与分析

2.1 MEF 细胞生长状况的确定

MEF 细胞为贴壁生长细胞(图 1), 不同代数的 MEF 细胞在形态学上存在差异。图 1(a) 原代细胞, 圆形, 细胞较大, 且大小不一, 具有异质性, 含有上皮细胞等杂细胞, 图 1(b)、(c)、(d) 为二代、三代、四代细胞, 均呈长梭形或多角形, 细胞密度均匀, 呈典型的成纤维状态, 杂细胞较少, 生长旺盛, 死细胞少, 二代细胞中混有少量的杂细胞, 三代细胞形态均匀, 生长旺盛, 基本无杂细胞, 细胞传至第五代, 死细胞数目增多(图 1(e))。



(a) 原代 MEF 细胞; (b) 二代 MEF 细胞; (c) 三代 MEF 细胞; (d) 四代 MEF 细胞; (e) 五代 MEF 细胞。

(a) Primary MEF cells, (b) Second-generation MEF cells, (c) Third-generation MEF cells, (d) Fourth-generation MEF cells, (e) Fifth-generation MEF cells.

图 1 不同代数 MEF 细胞的形态($\times 100$)

Fig. 1 Different generations of MEF cell morphology($\times 100$)

2.2 细胞生长曲线的绘制

选择第三代细胞, 以培养时间为横坐标, 细胞密度(OD 值)为纵坐标绘制 MEF 细胞生长曲线, 曲线

呈 S 型, 出现潜伏期、对数生长期和平台期, 说明细胞生长状态良好, 可进行下步试验(图 2)。

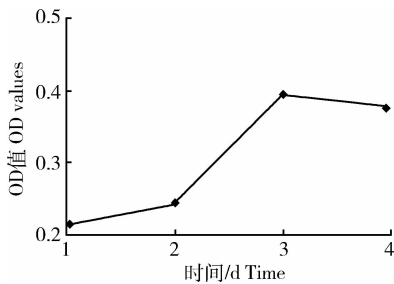


图2 MEF细胞生长曲线

Fig. 2 Growth curve of MEF cell

2.3 培养液中添加TP对MEF细胞活力的影响

由表2知,在添加TP培养到24、48、72和96 h时,TP质量浓度10、40和70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对照组相比差异不显著;40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞密度略高于对照组细胞密度,但是差异不显著;TP质量浓度100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时与其他组相比差异显著,低于对照组细胞密度,其他细胞密度72 h时与其他时间处理组相比差异显著,质量浓度高于其他各个处理组细胞密度。

表2 不同质量浓度TP对不同培养时间细胞生存率的影响 ($\overline{\text{OD}} \pm \text{S}$)

Table 2 Different concentrations of TP on the effects of different cultivation-time cell survivals ($\overline{\text{OD}} \pm \text{S}$)

$\rho(\text{TP})/$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	培养时间/h Culture time			
	24	48	72	96
0	0.214 \pm 0.000 6 aB	0.243 \pm 0.000 2 aB	0.395 \pm 0.000 1 aA	0.374 \pm 0.000 1 aA
10	0.166 \pm 0.000 6 bB	0.224 \pm 0.000 2 aB	0.418 \pm 0.005 1 aA	0.380 \pm 0.000 9 aA
40	0.201 \pm 0.000 0 abB	0.262 \pm 0.000 2 aB	0.407 \pm 0.000 8 aA	0.310 \pm 0.000 3 aB
70	0.185 \pm 0.000 2 abC	0.257 \pm 0.001 4 aC	0.381 \pm 0.000 3 aA	0.301 \pm 0.000 2 aB
100	0.161 \pm 0.000 8 bB	0.242 \pm 0.000 5 bA	0.326 \pm 0.000 5 bA	0.217 \pm 0.000 2 bB
150	0.167 \pm 0.001 6 bAB	0.230 \pm 0.001 5 bA	0.318 \pm 0.000 2 bA	0.221 \pm 0.001 1 bB

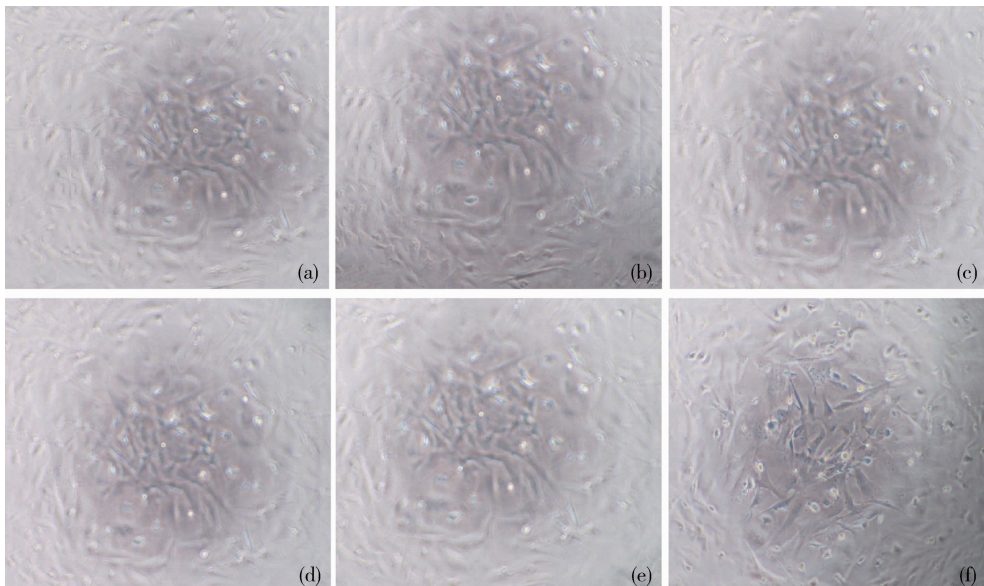
注:同列数据不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);同行数据肩标不同大写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different small-letter means significant difference ($P < 0.05$), shoulder peer data significantly different capital letters ($P < 0.05$).

2.4 不同质量浓度TP对细胞形态影响

倒置显微镜观察不同质量浓度TP处理后的鼠胎儿成纤维细胞形态,由图3可知,添加的TP质量

浓度依次为对0、10、40、70和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞形态差异不明显,150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时可见明显的凋亡,细胞间隙变大,细胞密度减小,死细胞数目增多。



(a)、(b)、(c)、(d)、(e)和(f)依次为TP培养液质量浓度0、10、40、70、100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(a), (b), (c), (d), (e) and (f) followed by TP media concentrations of 0, 10, 40, 70, 100, and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

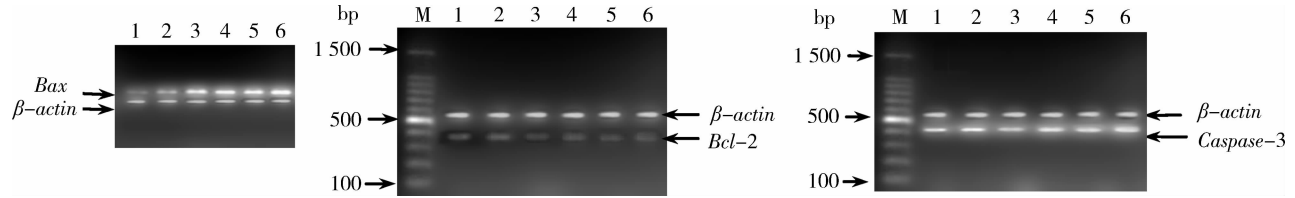
图3 TP处理后MEF细胞形态($\times 100$)

Fig. 3 Morphology of MEF cell after TP processing ($\times 100$)

2.5 培养液中添加 TP 对 MEF 细胞基因转录相对表达量的变化

使用 Gel-Pro analyzer 软件分析软件量化分析琼脂糖凝胶电泳生成的各个条带(图 4), 所得结果

与内参基因条带量化分析后值相比(无单位), 对结果进行显著性分析(表 3)。由统计分析可知, 基因 *Bax*、*Bcl-2* 和 *Caspase-3* 相对表达量各组之间均差异不显著($P>0.05$)。



1~6 泳道依次为质量浓度 0、10、40、70、100 和 150 $\mu\text{g/mL}$ 的 TP 处理; M 为 DL 100 DNA Maker。
1-6 electrophoresis lane is the gene *Bax* results treat with TP mass concentrations of 0, 10, 40, 70, 100 and 150 $\mu\text{g/mL}$. M is DL100DNA Maker.

图 4 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 4 Product of PCR amplified after electrophoresis

表 3 各基因相对表达量

Table 3 Expression of various gene relatives

相对表达量 Relative gene expression	$\rho(\text{TP})/(\mu\text{g/mL})$					
	0	10	40	70	100	150
<i>Bax</i>	1.718±0.612 8 a	1.057±0.163 2 a	0.771±0.423 3 a	0.677±0.703 6 a	0.733±0.823 4 a	0.961±0.099 7 a
<i>Bcl-2</i>	0.550±0.881 9 a	0.795±0.680 9 a	0.914±0.097 1 a	0.811±0.692 1 a	0.731±0.613 6 a	0.588±0.939 7 a
<i>Caspase-3</i>	1.171±0.599 9 a	1.204±0.526 8 a	1.129±0.475 5 a	1.287±0.820 2 a	1.051±0.281 9 a	1.019±0.591 5 a

注:同行数据相同大写字母表示差异不显著($P>0.05$)。

Note:Peer data the same uppercase letters denote the difference is not significant ($P>0.05$).

3 讨论

3.1 鼠胎儿成纤维细胞最适培养条件研究

庄淑珍等^[14]等在实验室培养条件下,培养出以 12.5~14.5 d 胎龄的小鼠胎儿分离 MEF 细胞效果最好;曹俊新等^[10]试验结果表明添加 11% 血清的 DMEM 培养液培养 MEF 细胞时,原代、传代培养效果最好,传代至 3~5 代时最适宜作为饲养层细胞与供核细胞。有研究认为 MEF 细胞分离小鼠最佳胎龄为 12.5~14.5 d^[15],张学明等^[16]则认为 12~13 d 的小鼠胚胎分离效果最好;王杏利等^[17]研究表明胎龄应在 11~17 d 之间分离效果差异不显著,盛利琴^[18]、张怡等^[19]研究认为 12.5~13.5 d 的分离效果最好,因此使用妊娠 12.5 d 母鼠,热消化获得原代 MEF 细胞,传至 2~3 代后得到较纯花的生长状态良好的 MEF 细胞(图 1 和图 2)。

3.2 TP 对鼠胎儿成纤维细胞生长的影响

TP 和 VE 一样,其抗氧化作用是清除自由基^[20]。TP 的抗氧化活性是 VE 的 18 倍,VC 的 4.93 倍,也高于人工合成的抗氧化剂 BHT 和 BHA。研究表明 TP 可以通过上调炎症介质 β -catenin 信号抑制皮肤癌细胞的生长^[21]。茶多酚通过调节肠道细菌微环境调节粘液的阻隔性能和养分吸收^[22],人类口腔鳞状细胞癌细胞系在 100 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度 TP 处理 48 h 后产生抑制率为 72.3%,检测出凋亡相关基因 *Caspase-3*、*Caspase-8*、*Caspase-9*、*Bax*、*Fas/FasL*、*p53*、*p21*、*E2F1* 和 *p73* 的上调和 *Bcl-2*、*bcl-XL*、*hiap-1* 及 *HIAP-2* mRNA 和蛋白的表达下调^[23],TP 能够缓解脊髓神经元细胞氧化应激^[24],通过下调乳腺癌中的 Survivin 蛋白诱导癌细胞凋亡^[25],在啮齿动物毒性试验剂量依赖关系试验毒性试验中,高剂量的 TP 会导致毒性,但是在

0.01% 和 0.10% 的茶多酚具有保护肝脏的作用^[26], TP 在对短跑运动员试验中,测定对血液氧化应激和肌肉损伤无影响^[27],表明增加 TP 能摄入能够抗羊血矛线虫的侵袭^[28], TP 通过大鼠大脑皮层通道氧化应激抑制抵抗大鼠甲基水银诱导神经的作用^[29],预防心血管疾病^[30], TP 对细胞增殖的抑制作用主要是由于其抗氧化性能,从表 2 中知经 TP 处理的 MEF 细胞与对照组相比,质量浓度 < 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TP 培养液培养的 MEF 细胞形态与对照组相比没有发生变化,细胞生长良好;而 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TP 的细胞密度略高于对照组细胞密度,细胞形态无变化,死细胞少(图 3),不存在统计差异。TP 质量浓度高于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 各处理时间组细胞密度均降低,统计分析存在显著性差异,细胞发生凋亡。培养 72 h 时,细胞密度最高,可能是细胞生长周期的结果。

3.3 TP 对基因表达量的影响

Bcl-2, *Bax* 都是 *Bcl-2* 家族的成员,两者基因的含量和功能状态之间的平衡是调控细胞凋亡的重要机制,*Bcl-2* 含量高时,凋亡受到抑制,反之,细胞凋亡。除了凋亡调控基因 *Bcl-2* 外,细胞凋亡的另一组重要的调控基因就是 *Caspase* 家族,*Caspase-3* 基因是该家族中重要的凋亡执行者之一和效应因子,*Caspase-3* 的活化表明凋亡进入不可逆转的阶段。RT-PCR 结果表明基因表达量各组之间差异不显,因此 TP 对 MEF 细胞在从分子转录水平上无影响。

4 结 论

TP 质量浓度为 0~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 MEF 细胞凋亡无影响,质量浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对细胞生长有促进作用,细胞形态对照组相比无变化,质量浓度高于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 MEF 细胞密度与对照组比降低,差异显著,说明细胞发生了凋亡;但是 TP 对基因 *Bcl-2*、*Bax* 和 *Caspase-3* 的转录水平上无影响。

参 考 文 献

- Milligan S A, Burke P, Coleman D T, et al. The green tea polyphenol EGCG Potentiates the antiproliferative activity of c-Met and epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-small cell lung cancer cells[J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(15): 4885-4894
- Sasazuki S, Tamakoshi A, Matsuo K, et al. Green tea consumption and gastric cancer risk: An evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population[J]. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 2012, 42(4): 335-346
- Chen J, Huang X F. The signal pathways in azoxymethane-induced colon cancer and preventive implications[J]. *Cancer*, 2009(9): 10
- Zhou P, Li J P, Zhang C. Green tea consumption and breast cancer risk: Three recent meta-analyses [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2011, 127(2): 581-583
- Tsang W P, Kwok T T. Epigallocatechin gallate up-regulation of miR-16 and induction of apoptosis in human cancer cells[J]. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2010, 21(2): 140-146
- Adhami V M, Siddiqui I A, Sarfaraz S, et al. Effective prostate cancer chemopreventive intervention with green tea polyphenols in the tramp model depends on the stage of the disease[J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(6): 1947-1953
- Han D H, Jeong J H, Kim J H. Anti-proliferative and apoptosis induction activity of green tea polyphenols on human promyelocytic leukemia HL-60 cells[J]. *Anticancer Research*, 2009, 29(4): 1417-1421
- 陈国祥, 丁伯平, 宋运英, 等. 茶多酚对大鼠长期毒性实验[J]. *皖南医学院学报*, 2000, 19(1): 11-12
- 王颖超, 王晓霞, 赵明, 等. 茶多酚对 2-型糖尿病患者外周血早期内皮祖细胞衰老及氧自由基损伤的影响[J]. *微循环杂志*, 2011, 21(4): 19-22
- 曹俊新, 宋学雄. 昆明小鼠胚胎成纤维细胞体外培养条件初步研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(10): 39-44
- 秦学伟. *Bcl-2*, *Bax* 在早孕小鼠胎盘及羊膜中的表达[D]. 上海: 上海市第一妇婴保健院, 2006
- 何静春, 刑沈阳. 颈椎稳定性异常对老龄小鼠脑海马 *caspase-3* 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(11): 2155-2157
- 赵丽华. 老龄小鼠颈椎稳定性异常与脑 *bcl-2*, *bax* 凋亡基因关系的研究[D]. 长春: 吉林大学 2008
- 庄淑珍, 吕芳, 潘巍. 小鼠胚胎成纤维细胞分离培养研究[J]. *新疆农业科学*, 2007, 44(6): 729-733
- 王国云, 李栋, 张辉, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞饲养层制备条件的研究[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2005, 43(5): 396-399
- 张学明, 李德雷, 赖良学, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离和饲养层细胞的制备[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 1999(9): 5-6
- 王杏利, 窦忠英. 小鼠胎儿成纤维细胞的分离培养及饲养层制备[J]. *陕西农业科学*, 1999(6): 17-19
- 盛利琴, 叶荣, 韩甫, 等. 昆明小鼠胚胎成纤维细胞的分离与体外培养[J]. *苏州大学学报: 自然科学版*, 2007, 23(1): 83-86
- 张怡, 赵连三, 汪成孝, 等. 小鼠胚胎成纤维细胞的分离与培养[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2003, 34(2): 344-346
- Eichenberger P, Colombani P C, Mettler S. Effects of 3-week consumption of green tea extracts on whole-body metabolism during cycling exercise in endurance-trained men [J]. *Int J Vitam Nutr Res*, 2009, 79(1): 24-33

- [21] Silvia M, Lydia R, Tamar A, et al. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate protects rat PC12 cells from apoptosis induced by serum withdrawal [J]. *Neurotoxicity Research*, 2003, 5(6): 419-424
- [22] Georgiades P, Pudney P D A, Rogers S, et al. Tea derived galloylated polyphenols cross-link purified gastrointestinal mucins[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105302
- [23] Zhao X, Pang L, Li J, et al. Apoptosis inducing effects of kuding tea polyphenols in human buccal squamous cell carcinoma cell line BcaCD885[J]. *Nutrients*, 2014, 6(8): 3084-3100
- [24] Zhao J, Fang S, Yuan Yet al. Green tea polyphenols protect spinal cord neurons against hydrogen peroxide-induced oxidative stress[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(14): 1379-1385
- [25] Xuesong Chen, Yu Li, Qiushi Lin, et al. Tea polyphenols induced apoptosis of breast cancer cells by suppressing the expression of Survivin[J]. *Sci Rep*, 2014, 20(4): 4416. DOI: 10.1038/srep04416
- [26] Murakami A. Dose-dependent functionality and toxicity of green tea polyphenols in experimental rodents [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2014, 557: 3-10
- [27] Jówko E, Długolecka B, Makaruk B, et al. The effect of green tea extract supplementation on exercise-induced oxidative stress parameters in male sprinters[J]. *European Journal of Nutrition*, 2014; DOI 10.1007/s00394-014-0757-1
- [28] Zhong R Z, Li H Y, Sun H X, et al. Effects of supplementation with dietary green tea polyphenols on parasite resistance and acute phase protein response to *Haemonchus contortus* infection in lambs[J]. *Vet Parasitol*, 2014, 205(1/2): 199-207
- [29] Liu W l, Xu Z, Yang T, et al. The protective role of tea polyphenols against methylmercury-induced neurotoxic effects in rat cerebral cortex via inhibition of oxidative stress[J]. *Free Radic Res*, 2014, 48(8): 849-63
- [30] Kishimoto Y, Tani M, Kondo K. Pleiotropic preventive effects of dietary polyphenols in cardiovascular diseases[J]. *Eur J Clin Nutr*, 2013, 67: 532-535

责任编辑：苏燕