

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20140130001

单国强,叶敏强,祝凌燕. 表没食子儿茶素没食子酸酯对四氯苯醌细胞毒性的保护作用[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 585-592

Shan G Q, Ye M Q, Zhu L Y. Protective effects of epigallocatechin gallate (EGCG) against the cytotoxicity of tetrachloro-1,4-benquinone (TCBQ) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 585-592 (in Chinese)

表没食子儿茶素没食子酸酯对四氯苯醌细胞毒性的保护作用

单国强¹, 叶敏强^{1,2}, 祝凌燕^{1,*}

1. 南开大学环境污染过程与基准教育部重点实验室,天津市城市生态环境修复与防治重点实验室,南开大学环境科学与工程学院,天津 300071

2. 连云港市环境监测中心站,江苏 222001

收稿日期: 2014-01-30 录用日期: 2014-03-25

摘要: 四氯苯醌(TCBQ)是高毒致癌化合物,而表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶叶中主要的茶多酚活性成分。利用人肝癌细胞系 HepG2 细胞,通过细胞存活率 MTT 毒性实验,探讨 EGCG 是否能解除 TCBQ 的毒性作用。实验结果表明,低浓度(5 ~ 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 EGCG 对 TCBQ (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)导致的细胞毒性有一定的缓解作用。此保护与 EGCG 和 TCBQ 之间的直接相互作用有关,紫外吸收光谱及高效液相色谱分析的实验结果表明 EGCG 降低 TCBQ 毒性的原因可能是其促使 TCBQ 还原为四氯氢醌 TCHQ,并延缓了 TCHQ 的自氧化过程。

关键词: 四氯苯醌(TCBQ); HepG2 细胞; 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG); 细胞毒性; 解毒机制

文章编号: 1673-5897(2014)3-585-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Protective Effects of Epigallocatechin Gallate (EGCG) against the Cytotoxicity of Tetrachloro-1,4-benquinone (TCBQ)

Shan Guoqiang¹, Ye Minqiang^{1,2}, Zhu Lingyan^{1,*}

1. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China

2. Lianyungang Municipal Environmental Monitoring Station, Jiangsu 222001, China

Received 30 January 2014 **accepted** 25 March 2014

Abstract: Tetrachloro-1,4-benquinone (TCBQ) is a highly toxic and carcinogenic compound. In this study, cell viability was assessed using MTT assay with human hepatoma cell line HepG2 cell to investigate whether epigallocatechin gallate (EGCG), one of the main active components in tea, could reduce the cytotoxicity induced by TCBQ. Experimental results demonstrated that EGCG at low concentration (5 ~ 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could mitigate the cytotoxicity induced by TCBQ (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). This protective effect may be attributed to the direct interaction between EGCG and TCBQ. UV-vis absorption spectra and high performance liquid chromatography analysis demonstrated that EGCG could expedite the reduction of TCBQ to less toxic tetrachlorohydroquinone(TCHQ), and inhibit the autooxidation of TCHQ.

Keywords: TCBQ; HepG2 cells; EGCG; cytotoxicity; detoxication mechanism

基金项目: 国家自然科学基金(No. 21077058), 天津市自然科学基金(No. 12JCYBJC16000)

作者简介: 单国强(1974-),男,博士,研究方向为毒理学,E-mail: yunongshan@nankai.edu.cn;

* 通讯作者(Corresponding author),E-mail: zhuly@nankai.edu.cn

四氯苯醌(TCBQ)及其还原态四氯氢醌(TCHQ)(二者结构式见图1)是卤代芳香性有机污染物如五氯酚、六氯苯等的肝脏代谢产物,具有极强的肝毒性及高致癌活性^[1]。最近研究发现,TCBQ还作为一种可能的消毒副产物在饮用水中广泛存在^[2]。TCHQ经由四氯半醌自由基(TCSQ[·])并进一步氧化为TCBQ的自氧化过程(autoxidation)可产生大量活性氧;氧化态的TCBQ通过Michael加成或亲核取代反应,可与生命大分子物质(蛋白质、DNA等)共价结合^[3]。上述过程导致的氧化性损伤及异常共价结合物可部分解释TCBQ或TCHQ造成细胞毒性及癌症发生的原因^[1,4-5]。

以表没食子儿茶素没食子酸酯 EGCG(化学结构式见图1)为代表的茶多酚是茶叶中富含的活性成分。研究发现,从茶叶中提取的EGCG具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、降血脂等多种药理作用^[6]。日常饮用EGCG含量最高的绿茶,可有效降低五氯酚氧化胁迫引起的致癌风险,这可能与绿茶的活性成分EGCG有关^[7]。由于其独特多羟基酚结构,EGCG具有很强的抗氧化活性,可能对诱导氧化性损伤的活性氧或者氧化性物质具有很好的清除作用^[8]。

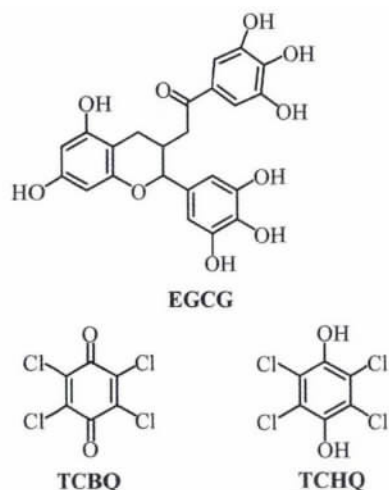


图1 表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、四氯苯醌(TCBQ)和四氯氢醌(TCHQ)的结构式

Fig. 1 The chemical structure of epigallocatechin gallate (EGCG), tetrachlorobenzoquinone (TCBQ) and tetrachlorohydroquinone (TCHQ)

氯代醌作为肝代谢产物或自来水消毒副产物,与日常饮茶时摄入的茶多酚类活性成分有可能共存于同一机体组织中。那么当二者共存时,茶多酚是否能解除或降低氯代醌的生物毒性呢?如果能,解毒机制是什么呢?针对上述问题,本研究选择人肝癌细胞系 HepG2 细胞为生物模型,以 EGCG 和

TCBQ 为研究对象,开展氯代醌细胞毒性以及茶多酚解除其毒性的研究,以期更好地理解茶多酚物质对卤代芳香性有机污染物的抗氧化解毒作用机制。

1 材料和方法 (Materials and methods)

1.1 试剂

((-)-Epigallocatechin gallate, EGCG, 99%)购自百灵威。四氯苯醌(2,3,5,6-tetrachlorobenzoquinone, TCBQ, 98%)和四氯氢醌(2,3,5,6-tetrachlorohydroquinone, TCHQ, 98%)购自 Sigma-Aldrich (USA)。噻唑蓝(Methylthiazolotetrazolium, MTT, 99%)购自 Amresco (USA)。色谱纯乙腈购于百灵威,水为 Mill-Q 超纯水。其它试剂为国产分析纯。细胞培养用磷酸盐生理缓冲溶液(PBS, 1 L): NaCl 8.00 g, KCl 0.20 g, Na₂HPO₄·H₂O 1.56 g, KH₂PO₄ 0.20 g。RPMI 1640 改良型培养基购自 Gibco BRL (USA)。HepG2 细胞系购自中国医学科学院细胞中心。紫外可见吸收光谱及高效液相色谱分析采用的磷酸盐缓冲溶液(PB, 100 mmol·L⁻¹, pH 7.4): 29.0142 g Na₂HPO₄和2.9649 g NaH₂PO₄溶解于 1 L 水中。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞存活率噻唑兰(Methylthiazolotetrazolium, MTT)实验

收集对数生长期 HepG2 细胞,于 96 孔培养板中每孔加入 200 μL 细胞悬浮液,细胞数约为 1.5 × 10⁴ 个/孔。将 96 孔板置于 5% CO₂、37 °C 条件下孵育 24 h,吸去原培养基,PBS 洗涤。于各孔中加入含不同浓度的药物培养基(不含胎牛血清),药物培养基配制时,先加入 TCBQ 或 TCHQ,再加入 EGCG。孵育 2 h 后,吸去含药物培养基,PBS 洗 3 次,再加入终浓度为 0.5 mg·mL⁻¹ MTT 的培养基 100 μL,孵育 4 h。小心吸去孔内培养基,每孔加入二甲亚砜 150 μL。使用酶标仪在波长 570 nm 处测定各孔的吸光度(OD)值。所有的平行实验重复 3 次,取其平均值,并计算标准偏差。

1.2.2 细胞内活性氧(ROS)的测定

活性氧的测定参照文献方法^[9],采用 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)为检测探针进行测定:待 HepG2 细胞长到孔底 80% 左右时,去除细胞培养基,加入 200 μL DCFH-DA,终浓度 10 μmol·L⁻¹。在 37 °C 细胞培养箱内孵育 30 min,用无血清细胞培养基洗涤细胞 3 次,以充分去除未进入细胞的 DCFH-DA,然后加入含药物的无血清培养基。在加入含药培养基后开始计时,分别于 0、30 和 60 min 时间点,采用酶标仪测定荧光强度。全波长扫描多功能酶标仪

(Thermo Electron Corporation, USA)操作条件为:激发波长 480 nm,发射波长 530 nm。

1.2.3 TCBQ/EGCG 反应的紫外可见分光光度法(UV-vis)分析

将 TCBQ 和 EGCG 单独或者混合于 PB 溶液(EGCG、TCBQ 浓度分别为 50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在加药并迅速混匀后开始计时,于 0、30 和 60 min 时间点分别取适量反应液,采用紫外可见分光光度计(Beckman Du 800 Spectrophotomet, USA)进行全波长扫描(200 ~ 600 nm)。

1.2.4 TCBQ/EGCG 反应的高效液相色谱分析

采用高效液相色谱仪(HPLC 1200, Agilent, USA)测定 EGCG、TCBQ、TCHQ、TCBQ + EGCG 和 TCHQ + EGCG 各反应溶液中指定物质的浓度随时间的变化。HPLC 条件参考文献方法^[10]并做了适当的调整:色谱柱: Supelcosil LC-18 (Sigma; 4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm),流动相为: 11 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ H_3PO_4 溶液(40%)和乙腈(60%),柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样 20 μL ,流速 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$,检测波长为 292 nm。

1.2.5 统计方法

数据以均值 $\pm$ 标准差表示,应用 origin 8.0 软件对数据进行绘图。两组间均值比较采用单因素方差分析 post hoc LSD 检验,显著性差异为 $p < 0.05$ (*)和 $p < 0.01$ (**)。统计分析用 SPASS 17.0 软件完成。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 单独 TCBQ、TCHQ 或 EGCG 的细胞毒性效应

在无血清培养基中,HepG2 细胞暴露于 TCBQ 2 h 后,细胞存活率呈现浓度依赖性:当 TCBQ 为 1、5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比,细胞存活率没有明显的变化。随着 TCBQ 浓度增加,细胞存活率呈现明显的逐降趋势,当 TCBQ 浓度大于 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率低于 5%(图 2A)。从图 2B 可以看出,在无血清培养基中,HepG2 细胞暴露于 TCHQ 2 h 后,细胞存活率也呈现浓度依赖性下降,但与 TCBQ 的有所区别:当 TCHQ 为 1、5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率与对照组相比即逐渐降低,随着 TCHQ 浓度增加,细胞存活率继续降低。TCBQ 对 HepG2 细胞的半数致死浓度 LC_{50} 为 104 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而 TCHQ 的 LC_{50} 为 116 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,说明二者毒性效应差异不大,这可能是由于在孵育条件下 TCHQ 很容易经自氧化过程转变为 TCBQ 的缘故^[11]。已有报道显示,微生物通过还原酶将 TCBQ 还原为低毒性 TCHQ,说明 TCBQ 的生物毒性要强于

TCHQ^[12-13]。单独 EGCG 暴露组(图 2C)的研究结果表明,低浓度($< 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 EGCG 不具有明显的细胞毒性,但是在高浓度暴露组,细胞存活率与对照组相比则出现明显下降,200、400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下细胞存活率分别为对照组的 79%、67%。这与 Chen 等的报道结果一致^[14]。EGCG 是一种类似维生素 C 的活性物质,同时具有抗氧化性(antioxidant)和促氧化性(pro-oxidant)作用,低浓度 EGCG 呈现抗氧化作用,保护细胞免受氧化性损伤,而高浓度 EGCG 则主要表现为促氧化作用,对细胞呈现毒害效应^[15]。

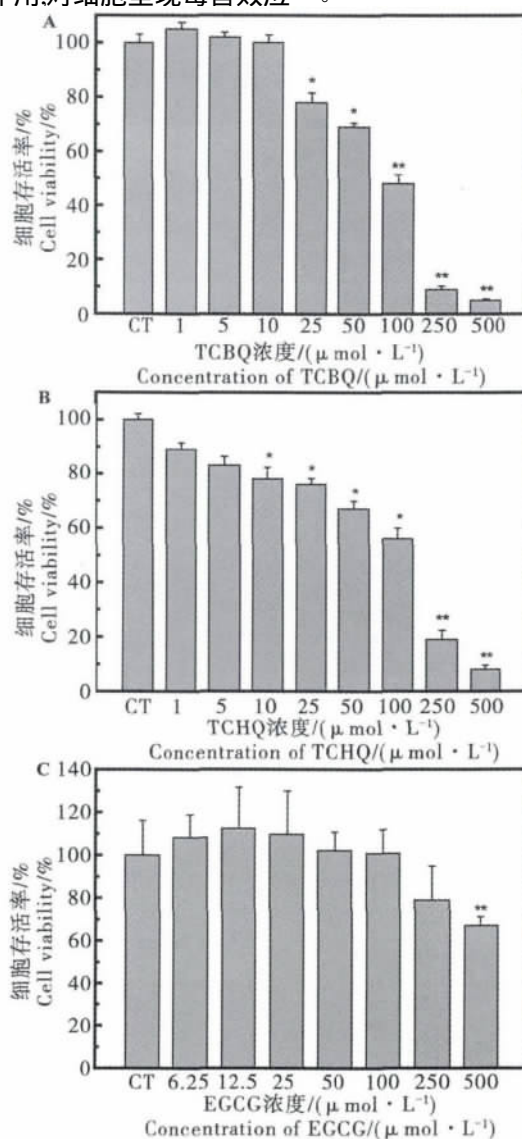


图2 HepG2 细胞单独暴露于不同浓度 TCBQ (A)、TCHQ (B)、EGCG (C) 2 h 后的细胞存活率:

显著性差异以 Control (CT) 组作对比检验

Fig. 2 MTT assay in HepG2 cells exposed to TCBQ (A), TCHQ (B), EGCG (C) alone for 2 h: significantly different from the control (CT)

EGCG 的多酚结构可以在生物体系中产生酚氧自由基及反应活性较高的醌类中间体,对生物分子进行共价修饰,从而产生生物毒性^[16]。因为人们在常规饮茶后血浆中 EGCG 等茶多酚活性物质的浓度通常在 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平,远远低于其致毒浓度^[17-18],所以本研究不考虑高浓度 EGCG 的促氧化毒性作用。

2.2 TCBQ/EGCG 或 TCHQ/EGCG 的联合细胞毒性作用

图 3A 所示为 HepG2 细胞同时暴露于 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBQ 和不同浓度 EGCG 溶液中 2 h 后的细胞存活率变化。不添加 EGCG 时,细胞存活率只有空白对照组的 27.2%。但当添加 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 时,细胞存活率提升至 32.3%,而且随着添加 EGCG 量的增加,细胞存活率逐渐提高,当 EGCG 浓度达 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,细胞存活率提高近一倍,为 46.8%。但是随着

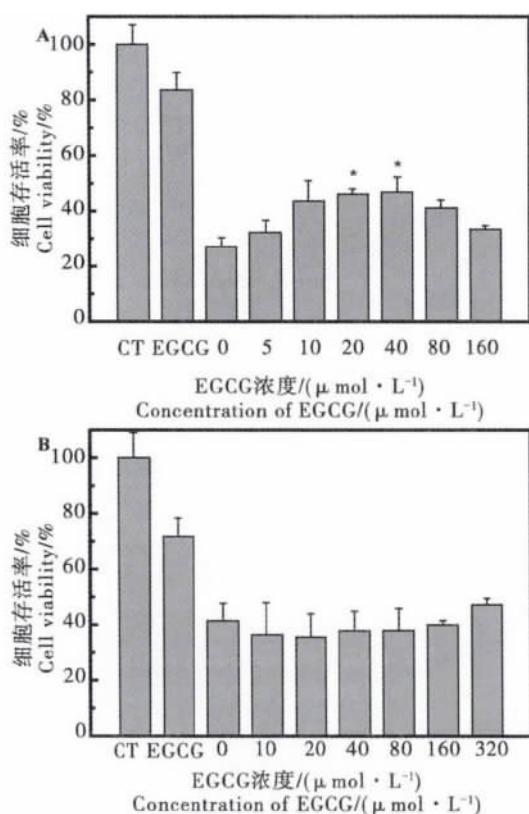


图 3 不同浓度 EGCG 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBQ (A)或者 TCHQ (B) 共同暴露于 HepG2 细胞对细胞存活率的影响: Control (CT)组为空白对照; EGCG 组为单独的 EGCG (160 (A), 320 (B) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$); 显著性差异以 TCBQ 或 TCHQ 单独组作对比检验

Fig. 3 MTT assay in HepG2 cells exposed to EGCG alone and co-exposed to EGCG and $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBQ (A) or TCHQ for 2 h (B): for the joint group, significantly different from the individual TCBQ or TCHQ group

EGCG 浓度继续增加,细胞存活率却又呈下降趋势,但仍高于 TCBQ 对照组。这说明低浓度的 EGCG,对 TCBQ 造成的细胞毒性有一定的解毒作用,但随着浓度的升高,解毒作用反而有所降低。图 3B 的结果表明, $10 \sim 320 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 的加入对 TCHQ 造成的细胞毒性没有显著影响。这意味着 EGCG 对预先加入 TCHQ 导致的细胞毒性的抑制效应并不明显。TCHQ 在生理条件下极易自氧化,因此预先加入 TCHQ 的毒性主要是由于自氧化过程产生的 ROS 及 TCBQ 造成的^[10-11]。研究显示,通过抑制该自氧化过程,可以降低 TCHQ 的毒性效应^[13,19-20]。

图 4 显示,单独 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBQ 作用下,加药后 0 min 的 HepG2 细胞内的 ROS 水平为空白组的 5.3 倍,ROS 产生量随时间延长而增加,但增加不明显。在细胞培养环境下,TCBQ 单独暴露组 ROS 水平升高可能源于 TCBQ 与生命物质(如细胞膜蛋白、重要蛋白酶)的共价结合诱导产生,共价结合反应速度非常快,可以瞬时完成。不同浓度的 EGCG 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBQ 共同作用于细胞时,ROS 的产生量相比 TCBQ 单独组出现下降,并且随着 EGCG 浓度的增加而下降趋势愈明显。 40 、 80 和 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 与 TCBQ 共同作用下,加药后 0 min 的 ROS 产生量分别为 TCBQ 单独作用的 94.1%、70.3% 和 43.4%; 而且随着作用时间的延长,TCBQ + EGCG 共同作用下细胞内 ROS 产生量尽管有少许增加,但仍然显著低于单独 TCBQ 组相同时间点的 ROS 水平。

2.3 EGCG 对 TCBQ 诱导 HepG2 细胞内 ROS 产生的影响

然而,比较图 3A 与图 4 可发现,与 TCBQ 单独组相比,添加 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 的联合组,细胞存活率提高 72%,细胞 ROS 水平下降却不显著。而添加 80 、 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 的联合组,与 TCBQ 单独组相比,细胞 ROS 水平下降明显(分别是 29.7% 和 56.6%),细胞存活率却低于添加 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 的联合组,仅比 TCBQ 单独组分别提高 47% 和 23%。另外,单独 $160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EGCG 暴露组的 ROS 水平低于空白对照组,但其细胞存活率却为空白对照组的 83.7%。以上结果表明 EGCG 清除 TCBQ 诱导产生的活性 ROS,可能并不是 EGCG 抑制 TCBQ 细胞毒性的主要原因。

2.4 TCBQ 与 EGCG 的相互作用

EGCG、TCBQ 的单电子氧化还原电动势分别是 550 mV 和 250 mV^[21-22],由此推测二者共存时,它们之间可能发生直接的氧化还原反应。我们首先采用

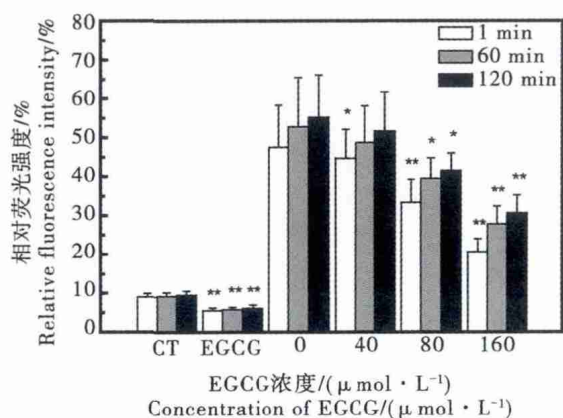


图4 HepG2 细胞暴露于不同浓度 EGCG 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCBQ 后的细胞 ROS 水平:单独 $160 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 的显著性差异以 Control (CT) 组作对比检验;不同浓度 EGCG 与 TCBQ 的联合组的显著性差异以不添加 EGCG 的 TCBQ 单独组作对比检验

Fig. 4 The ROS level in HepG2 cells which were exposed to EGCG alone and to EGCG with $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCBQ: for individual EGCG group, significantly different from the control (CT); for the joint group, significantly different from the individual TCBQ group

UV-vis 光谱法来初步观测二者之间的相互作用。图 5A 显示 TCBQ(最大吸收波长为 292 nm) 在生理缓冲溶液中可以发生水解^[23]。在细胞培养体系中,与自发的水解速率相比,TCBQ 与生命大分子物质的直接反应速率则要快得多,因此,本研究中忽略 TCBQ 水解的影响。图 5B 表明单独的 EGCG(最大吸收波长为 274 nm) 在 60 min 内一直比较稳定,没有发生显著变化。图 5C 显示,EGCG 与 TCBQ 混合后 0 min 时的 TCBQ 的最大吸收波长 292 nm 峰消失,并在 320 、 450 nm 处有新吸收峰出现,随着反应时间的延长,这两个吸收峰信号逐渐减弱,直至 60 min 几乎完全消失。从文献可知^[10],这两个特征波长吸收峰极可能是 TCHQ 与四氯半醌自由基(TCSQ·)对应的特征吸收峰。也就是说,EGCG 的加入,促使 TCBQ 还原转化为 TCHQ。此外, 30 min 时的 UV-vis 图谱上还出现了 278 nm 左右的一个肩峰,该肩峰的吸光度 60 min 时更高(图 5C)。

为进一步研究 TCBQ 与 EGCG 的相互作用,我们采用 HPLC 对 TCBQ 与 EGCG 的反应产物进行了分离和鉴定。结果表明,TCBQ 出峰时间为 6.5 min (图 6),加入 EGCG 后,TCBQ 物质的峰强度显著下降,却在保留时间 4.2 min 处检测到 TCHQ 的峰,并在 4.9 min 处出现了一新产物峰(暂称为 C)。

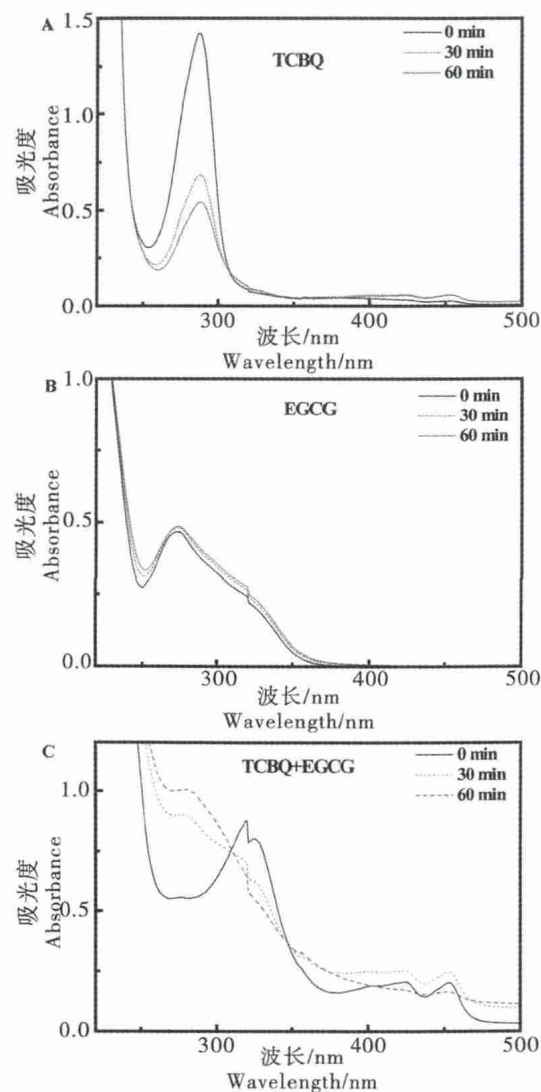


图5 在 PB 溶液中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCBQ 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 单独或混合时的 UV-vis 谱图
Fig. 5 UV-vis spectra of the reaction solutions after TCBQ ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) or EGCG ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) were added individually or jointly into PB

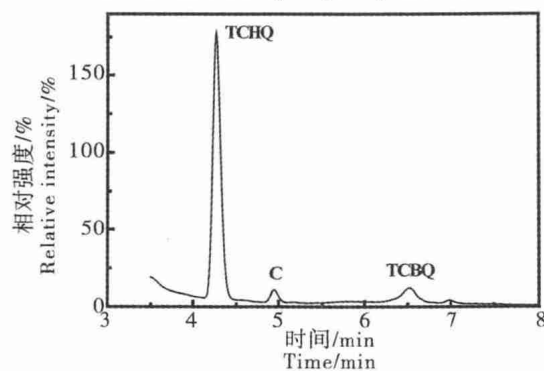


图6 在 PB 溶液中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCBQ 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 反应的 HPLC 色谱图
Fig. 6 HPLC chromatograph of the reaction of $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCBQ and $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG in PB

TCBQ、TCHQ、TCBQ + EGCG 以及 TCHQ + EGCG(先加 EGCG,后加 TCHQ)四种反应体系在 0 ~ 50 min 内的反应物或产物的变化见图 7。图 7A 表明 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCBQ 在 PB 缓冲液中缓慢发生水解,而图 7B 进一步证实 TCHQ 单独存在时可以迅速发生向 TCBQ 转化的自氧化过程。在 TCBQ 和 EGCG 共存的混合反应溶液中,加药后 0 min 的产物 TCHQ/TCBQ 比例为 3:2(图 7C); 而单独 TCBQ 暴露组中(图 7A),加药后 0 min 的产物 TCHQ/TCBQ 比例为 1:12; 证实 EGCG 的确可促使 TCBQ 还原为 TCHQ。图 7D 显示先加入 EGCG,后加入 TCHQ,加药后 0 min 的 TCHQ/TCBQ 比例为 6:1,10 min TCHQ 仍保持为原来的 $3/4$; 而单独 TCHQ 组(图 7B),因自氧化导致加药后 0 min 的 TCHQ/TCBQ 比例为 5:2, 10 min TCHQ 即减至原来的 $1/4$ 。该结果说明 EGCG 可抑制 TCHQ 的自氧化。文献报道显示,维生素 E、C 及青霉胺可以通过延缓或者降低 TCHQ 的自氧化,从而保护生物体免受 TCHQ 自氧化的毒害^[19-20,24]。由此推测,EGCG 的存在,可能也通过抑制

TCHQ 的自氧化过程缓解其毒性。因此,低浓度的 EGCG 促使 TCBQ 转化为 TCHQ,降低了 TCBQ 的细胞外液浓度,同时抑制了 TCHQ 的自氧化,从而起到一定的细胞保护作用。另外,图 7C 显示加药后 0 min 的溶液中出现产物 C,并且随着时间的延长,该产物的峰面积呈现递增的趋势,该产物的化学结构及其生物学意义还有待进一步研究。对于在 80 、 $160 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 与 TCBQ 共存的联合暴露组中,细胞存活率反而低于 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 与 TCBQ 的联合组,其原因可能有两点: 1) 与高浓度 EGCG 自身毒性有关,因为同一批次实验中单独 $160 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 的对照组,细胞存活率已降至 83% 左右; 2) 可能与 TCBQ 的共存有关,因为在 TCBQ 被还原的同时,EGCG 更多地转化为可以导致蛋白质毒性的酚氧自由基^[25]。

综上所述,低浓度的 EGCG 在一定程度上能保护细胞免受 TCBQ 的毒害作用。EGCG 能降低 TCBQ 诱导的细胞内 ROS 水平,但这不是主要的解毒机制。而该解毒过程可能与 EGCG 能加速 TCBQ

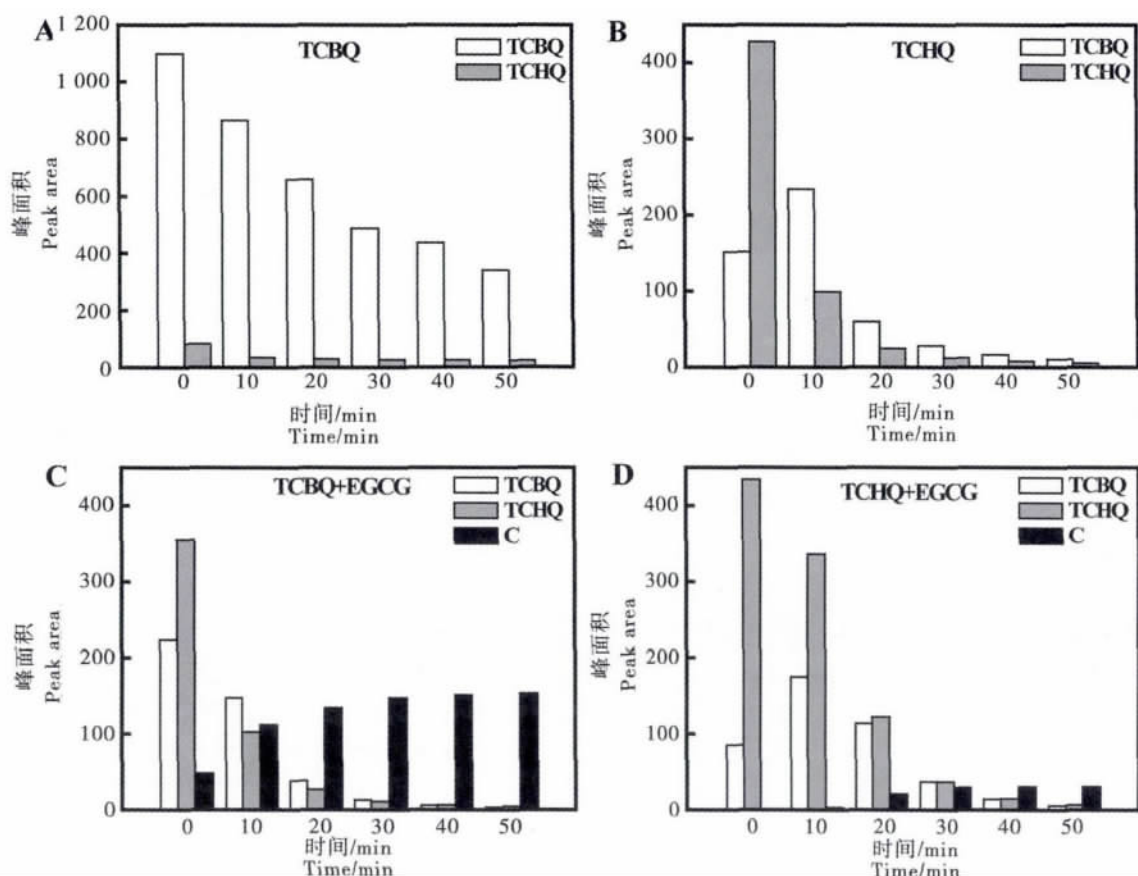


图 7 在 PB 溶液中 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCBQ(或 TCHQ) 和 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG 反应时各化合物浓度随时间的变化

Fig. 7 The reactions of TCBQ (or TCHQ) ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and EGCG ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in PB

还原为 TCHQ,同时抑制 TCHQ 的自氧化有关。由于 EGCG 是茶中的主要活性成分,因此常饮茶能在一定程度上缓解由 TCBQ 导致的生物毒性。

致谢: 感谢中国科学院生态环境研究中心朱本占研究员的帮助和大力支持。

通讯作者简介: 祝凌燕(1968—),女,环境科学博士,教授,主要研究方向为环境化学和生态毒理学,发表学术论文 100 余篇。

参考文献:

- [1] Zhu B Z, Shan G Q. Potential mechanism for pentachlorophenol-induced carcinogenicity: A novel mechanism for metal-independent production of hydroxyl radicals [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, 22(6): 969 – 977
- [2] Zhao Y L, Qin F, Boyd J M, et al. Characterization and determination of chloro- and bromo-benzoquinones as new chlorination disinfection byproducts in drinking water [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(11): 4599 – 4605
- [3] Anichina J, Zhao Y, Hrudey S E, et al. Electrospray ionization mass spectrometry characterization of interactions of newly identified water disinfection byproducts halo-benzoquinones with oligodeoxynucleotides [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(24): 9557 – 9563
- [4] Bull R J, Reckhow D A, Li X, et al. Potential carcinogenic hazards of non-regulated disinfection by-products: Haloquinones, halo-cyclopentene and cyclohexene derivatives, N-halamines, halonitriles, and heterocyclic amines [J]. *Toxicology*, 2011, 286(1-3): 1 – 19
- [5] O'Sullivan S M, McCarthy R M, Vargo M A, et al. Chemical modification at subunit 1 of rat kidney Alpha class glutathione transferase with 2,3,5,6-tetrachloro-1,4-benzoquinone: Close structural connectivity between glutathione conjugation activity and non-substrate ligand binding [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2006, 71(11): 1629 – 1636
- [6] 连艳玲, 何东仪. 表没食子儿茶素没食子酸酯的免疫调节机制研究进展[J]. *上海预防医学杂志*, 2010, 22(10): 534 – 537
- [7] Umemura T, Kai S, Hasegawa R, et al. Prevention of dual promoting effects of pentachlorophenol, an environmental pollutant, on diethylnitrosamine-induced hepato- and cholangiocarcinogenesis in mice by green tea infusion [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(6): 1105 – 1109
- [8] Singh B N, Shankar S, Srivastava R K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): Mechanisms, perspectives and clinical applications [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 82(12): 1807 – 1821
- [9] Shan G Q, Ye M Q, Zhu B Z, Zhu L Y. Enhanced cytotoxicity of pentachlorophenol by perfluorooctane sulfonate or perfluorooctanoic acid in HepG2 cells [J]. *Chemosphere*, 2013, 93(9): 2101 – 2107
- [10] Witte I, Zhu B Z, Lueken A, et al. Protection by desferrioxamine and other hydroxamic acids against tetrachlorohydroquinone-induced cyto- and genotoxicity in human fibroblasts [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000, 28(5): 693 – 700
- [11] Schroeder I E, van Tonder J J, Steenkamp V. Comparative toxicity of pentachlorophenol with its metabolites tetrachloro-1,2-hydroquinone and tetrachloro-1,4-benzoquinone in HepG2 Cells [J]. *The Open Toxicology Journal*, 2012, 5: 11 – 20
- [12] Yadid I, Rudolph J, Hlouchova K, et al. Sequestration of a highly reactive intermediate in an evolving pathway for degradation of pentachlorophenol [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(24): E2182 – 2190
- [13] Dai M, Rogers J B, Warner J R, et al. A previously unrecognized step in pentachlorophenol degradation in *Sphingobium chlorophenolicum* is catalyzed by tetrachlorobenzoquinone reductase (PcpD) [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(1): 302 – 310
- [14] Chen C, Shen G, Hebbar V, et al. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells [J]. *Carcinogenesis*, 2003, 24(8): 1369 – 1378
- [15] Babich H, Schuck A G, Weisburg J H, et al. Research strategies in the study of the pro-oxidant nature of polyphenol nutraceuticals[OL]. *Journal of Toxicology*, 2011, Volume 2011, Article ID 467305, 12 pages [2013-12-25] <http://dx.doi.org/10.1155/2011/467305> doi: 10.1155/2011/467305
- [16] 任婧, 张献清, 邢艳菲, 等. 茶多酚表没食子儿茶素-3-没食子酸酯对红细胞膜的促氧化作用[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(19): 1947 – 1949
Ren J, Zhang X Q, Xing Y F, et al. Pro-oxidative effect of epigallocatechin 3-gallate on human erythrocyte membranes [J]. *Journal of the Fourth Military Medical University*, 2009, 30(19): 1947 – 1949 (in Chinese)
- [17] Lee M J, Maliakal P, Chen L, et al. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (–)-epigallocatechin-3-gallate by humans: Formation of different metabo-

- lites and individual variability [J]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002, 11: 1025 – 1032
- [18] Chow H H, Cai Y, Hakim I A, et al. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multiple-dose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals [J]. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9 (9): 3312 – 3319
- [19] Wang Y J, Lee C C, Chang W C, et al. Oxidative stress and liver toxicity in rats and human hepatoma cell line induced by pentachlorophenol and its major metabolite tetrachlorohydroquinone [J]. *Toxicology Letters*, 2001, 122 (2): 157 – 169
- [20] van Ommen B, Adang AE, Brader L, et al. The microsomal metabolism of hexachlorobenzene. Origin of the covalent binding to protein [J]. *Biochemical Pharmacology*, 1986, 35 (19): 3233 – 3238
- [21] Maeta K, Nomura W, Takatsume Y, et al. Green tea polyphenols function as prooxidants to activate oxidative-stress-responsive transcription factors in yeasts [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(2): 572 – 580
- [22] Zhu B Z, Zhao H T, Kalyanaraman B, et al. Metal-independent production of hydroxyl radicals by halogenated quinones and hydrogen peroxide: An ESR spin trapping study [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 32(5): 465 – 473
- [23] Sarr D H, Kazunga C, Charles M J, et al. Decomposition of tetrachloro-1,4-benzoquinone (p-Chloranil) in aqueous solution [J]. *Environmental Science & Technology*, 1995, 29 (11): 2735 – 2740
- [24] 毛莉. 一类新型的依赖于羟基自由基的化学发光体系 [D]. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2011
- [25] Hagerman A E, Dean R T, Davies M J. Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, 414(1): 115 – 120 ◆

内分泌扰乱物质评估方法国际研讨会将在伦敦举行

2014 年 5 月 15 日 来源: Chemical Watch 网站

斯德哥尔摩大学从瑞典战略性环境研究基金会(Mistra)为一项旨在为内分泌扰乱化学物质的透明、统一和系统性评估方法建立一项框架的计划获得了资助。

“该计划基于需要联合国环境规划署(UNEP)/世界卫生组织(WHO)报告《内分泌扰乱化学物质科学研究现状-2012》中概述的一种方法提出,”斯德哥尔摩大学的 Anna Beronius 解释说。

计划举行两次国际研讨会,第一次将于 2014 年 6 月 2 ~ 4 日在伦敦布鲁内尔大学举行。与会者将包括来自欧盟和美国的大学和研究机构的代表,包括新瑞典毒理学研究中心(SWETOX)。美国国立卫生研究院和环保署的科学家也计划参加这次研讨会。

引自《化学品安全信息周报》2014 年第 21 期总第 285 期(中国检验检疫科学研究院化学品安全研究所编译)

http://www.chinachemicals.org.cn/reported_detail.aspx?contentid=297&ClassID=230