

绿原酸对反式二氢二醇环氧苯并[a]芘诱导的细胞凋亡的保护作用和相关分子机制

吴静, 吴诗佳, 顾心培, 陈汇丰

上海中医药大学护理学院, 上海 201203

摘要:

[背景] 反式二氢二醇环氧苯并[a]芘 (BPDE) 是一种环境致癌物质, 可引起细胞凋亡、氧化应激等多种改变。绿原酸 (CGA) 具有抗氧化作用, 但其对 BPDE 诱导的细胞凋亡的影响尚不明确。

[目的] 本研究首先采用 BPDE 染毒, 模拟烟草致支气管上皮细胞损伤, 然后采用 CGA 干预, 探索其抗凋亡作用及其潜在分子机制。

[方法] 预实验采用终浓度为 0、25、50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 分别处理 16HBE 细胞 2、4、8 h。根据预实验结果, 选择 CGA 50 $\mu\text{mol/L}$ 预处理细胞 4 h 后再进行 BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 染毒 12 h。实验分为对照组、CGA 单独处理组 (CGA 50 $\mu\text{mol/L}$)、BPDE 单独处理组 (BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$)、CGA 干预组 (CGA 50 $\mu\text{mol/L}$ +BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$)。采用 Annexin V/PI 染色及流式细胞仪检测细胞凋亡, 荧光探针 DCFH-DA 法检测细胞内活性氧 (ROS) 水平, Western blot 检测凋亡通路相关蛋白 caspase-3 的剪切体 (Cleaved caspase-3)、caspase-9 的剪切体 (Cleaved caspase-9)、p53、p21 的表达水平。

[结果] CGA 50、100 $\mu\text{mol/L}$ 组各时间点相对细胞活力与对照组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 而 150、200 $\mu\text{mol/L}$ 组处理时长为 8 h 时, 与对照组相比细胞活力下降 ($P<0.05$)。与 BPDE 单独处理组相比, CGA 干预组的细胞凋亡率下降 (17.63% vs 9.21%, $P<0.05$), Cleaved caspase-3 (1.81 vs 1.34, $P<0.05$) 和 Cleaved caspase-9 (2.13 vs 1.37, $P<0.05$) 蛋白相对表达量下降, 二氯荧光素荧光强度下降 (250.21 \pm 8.13 vs 199.14 \pm 6.74, $P<0.05$), p53 (1.66 vs 1.25, $P<0.05$) 及 p21 (1.64 vs 1.23, $P<0.05$) 蛋白表达量也下降。

[结论] 本研究证实 CGA 可以抑制 BPDE 诱导的 16HBE 细胞凋亡, 降低胞内 ROS 的水平。这种抗凋亡作用可能与 caspase-9/caspase-3 介导的内源性线粒体途径和抑制 BPDE 诱导的 p53 和 p21 的蛋白表达有关。

关键词: 反式二氢二醇环氧苯并[a]芘; 绿原酸; 细胞凋亡; 活性氧; p53; p21

Protective effect of chlorogenic acid on BPDE-induced cell apoptosis and its molecular mechanism WU Jing, WU Shi-jia, GU Xin-pei, CHEN Hui-feng (School of Nursing, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract:

[Background] Benzo[a]pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide (BPDE) is an environmental carcinogen that can cause cell apoptosis and oxidative stress. Chlorogenic acid (CGA) is an antioxidant, but its effect on BPDE-induced apoptosis is unclear.

[Objective] BPDE exposure is administered to mimic the damage of tobacco to bronchial epithelial cells. Then CGA intervention is administered to explore its anti-apoptotic effect and its potential molecular mechanism.

[Methods] In the pre-experiment, 16HBE cells were treated with CGA at final concentrations of 0, 50, 100, 150, and 200 $\mu\text{mol/L}$ for 2, 4, and 8 h. Based on the results of the pre-experiment, cells were pretreated with CGA 50 $\mu\text{mol/L}$ for 4 h, and then were induced by BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$ for 12 h. There were four groups: control group, CGA exposure group (CGA 50 $\mu\text{mol/L}$), BPDE exposure group (BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$), and CGA intervention group (CGA 50 $\mu\text{mol/L}$ +BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$). Cell apoptosis was measured by Annexin V/PI staining and flow cytometry; intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected with DCFH-DA probes; the expressions of apoptosis markers including

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19091

基金项目

中医药大学自然科学基金项目 (2016YSN23)

作者简介

吴静 (1988—), 女, 博士, 副教授;
E-mail: jingwuclose@126.com

通信作者

吴静, E-mail: jingwuclose@126.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-02-26

录用日期 2019-07-31

文章编号 2095-9982(2019)09-0818-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

吴静, 吴诗佳, 顾心培, 等. 绿原酸对反式二氢二醇环氧苯并[a]芘诱导的细胞凋亡的保护作用和相关分子机制 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (9): 818-823.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19091

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WU Jing, E-mail: jingwuclose@126.com

Competing interests None declared

Received 2019-02-26

Accepted 2019-07-31

To cite

WU Jing, WU Shi-jia, GU Xin-pei, et al. Protective effect of chlorogenic acid on BPDE-induced cell apoptosis and its molecular mechanism[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(9): 818-823.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19091

Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-9, p53, and p21 were detected by Western blot.

[Results] Compared with the 0 $\mu\text{mol/L}$ CGA group, the cell viabilities were not different in the 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$ CGA groups at various time points ($P>0.05$), but reduced in the 150 and 200 $\mu\text{mol/L}$ CGA groups at 8 h ($P<0.05$). Compared with the BPDE exposure group, the CGA intervention group showed reduced cell apoptosis rate (17.63% vs 9.21%, $P<0.05$), relative expression levels of Cleaved caspase-3 (1.81 vs 1.34, $P<0.05$) and Cleaved caspase-9 (2.13 vs 1.37, $P<0.05$), dichlorofluorescein fluorescence intensity (250.21 \pm 8.13 vs 199.14 \pm 6.74, $P<0.05$), and relative expression levels of p53 (1.66 vs 1.25, $P<0.05$) and p21 (1.64 vs 1.23, $P<0.05$).

[Conclusion] CGA can inhibit apoptosis in 16HBE cells induced by BPDE and reduce intracellular ROS level. Its mechanism may be related to caspase-9/caspase-3 mediated endogenous mitochondrial pathway and inhibited protein expressions of p53 and p21 induced by BPDE.

Keywords: benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide, BPDE; chlorogenic acid; apoptosis; reactive oxygen species; p53; p21

肺鳞状细胞癌 (squamous cell carcinoma, SCC) 是起源于支气管上皮的一种恶性肿瘤, 约占原发性肺癌的 40%~50%^[1]。流行病学研究发现 90% 以上的肺 SCC 发生于吸烟者^[2]。苯并[a]芘作为一种广泛存在于烟草中的环境致癌物质, 在人体内的活性代谢产物是反式二氢二醇环氧苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide, BPDE)。BPDE 具有亲电子性, 能与 DNA 亲核电子结合形成 DNA 加合物, 并与 SCC 发病密切相关^[3-4]。细胞凋亡是细胞生长的一个重要环节, 伴随着细胞增殖与细胞迁移的过程。环境毒素所致的凋亡机制紊乱及原癌基因失调, 是其致细胞癌变的重要机制。研究证实, BPDE 诱导的细胞凋亡主要通过 caspase-9 介导的内源性线粒体途径, 并伴随着氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 生成及线粒体膜电位降低^[5]。这些结果提示, BPDE 的肺部损伤机制可能与线粒体通路的凋亡途径有关。

绿原酸 (chlorogenic acid, CGA) 是由咖啡酸与奎尼酸形成的小分子酚类物质, 广泛存在于杜仲、金银花等植物组织^[6-7]。CGA 作为具有生物学效应的中药组分, 已被证实具有抗菌消炎、降血压、清除 ROS 的能力^[8]。体内实验证实, CGA 可抑制小鼠肠炎模型中 Bax、caspase-8、caspase-9 的表达, 并存在剂量依赖关系^[9]。CGA 能够抑制炎症细胞的浸润, 尤其是嗜中性粒细胞向肺部的募集^[10], 但 CGA 能否有效地抑制 BPDE 所造成的细胞损伤尚未见报道。因此, 本研究通过体外实验, 探讨 CGA 是否有利于降低 BPDE 诱导的细胞凋亡及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人支气管上皮细胞株 (16HBE) 购自中国肿瘤研究所 (北京)。

1.2 试剂及仪器

BPDE (Midwest, 美国), CGA 标准品 (Sigma-Aldrich,

美国), 1640 培养基、胎牛血清 (HyClone, 美国), 细胞计数试剂盒 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) (Dojindo, 日本), Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒 (BD, 美国), 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白检测试剂盒、活性氧检测试剂盒 (碧云天生物技术公司, 中国), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (上海生工生物有限公司, 中国), 预染蛋白质分子量标准 (Thermo, 美国), 一抗 caspase-3 的剪切体 (Cleaved caspase-3) (Asp175)、caspase-9 的剪切体 (Cleaved caspase-9) (Asp315) (Cell Signal Technology, 美国), p53 抗体 (B-P3 sc-65334)、p21 抗体 (O.N.488 sc-71811) (Santa Cruze, 美国), β -Actin、GAPDH、二抗 (Proteintech, 美国), 流式细胞仪 (BD, 美国)。

1.3 细胞培养及处理

1.3.1 细胞培养 16HBE 细胞用含 10% 胎牛血清的 1640 培养基置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 饱和湿度下的培养箱中培养。细胞于对数生长期时消化、接种, 12 h 后更换含有受试药物的新鲜培养基进行后续实验处理。

1.3.2 染毒方法与分组 预实验采用终浓度为 0、50、100、150、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 分别处理细胞 2、4、8 h, 通过 CCK-8 法检测细胞活力。根据预实验结果, 低浓度的 CGA (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理 4 h 对 16HBE 细胞没有表现出明显的毒性作用, 故进一步采用预实验最低安全浓度 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 CGA 预处理细胞 4 h。预实验提示, 0.5 $\mu\text{mol/L}$ BPDE 处理时长超过 12 h 即可提高 16HBE 的细胞凋亡率。因此, 本研究在 CGA 干预的前提下再进行 0.5 $\mu\text{mol/L}$ BPDE 染毒 12 h。实验分为 4 组, 分别是对照组、CGA 单独处理组 (CGA 50 $\mu\text{mol/L}$)、BPDE 单独处理组 (BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$)、CGA 干预组 (CGA 50 $\mu\text{mol/L}$ +BPDE 0.5 $\mu\text{mol/L}$)。

1.4 细胞活力检测

采用 CCK-8 测定 16HBE 细胞活力。根据试剂盒说明书, 在 96 孔板中配制 100 μL 的细胞悬液 (每孔约 5×10^3 个细胞), 细胞预培养 16~18 h 后, 更换新培养基并加入不同浓度 CGA。达到预设孵育时间, 再次更

换新鲜培养基并向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 同时将培养板在培养箱内孵育 1.5 h。用酶标仪在 450 nm 处测定光密度。取所测得的光密度均值进行细胞活力计算。

1.5 细胞凋亡检测

按照“1.3”方法接种和培养细胞, 经 CGA 预处理及 BPDE 染毒 12 h 后收集细胞。PBS 洗涤细胞 2 次。按照试剂盒说明书进行处理: 加入 500 μ L 的结合缓冲液悬浮细胞, 依次加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI。室温下混匀后避光反应 15 min, 采用流式细胞仪检测凋亡细胞数量及光密度。

1.6 细胞活性氧检测

按照“1.3”方法接种和培养细胞。按照 1:2500 用无血清培养液稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μ mol/L。细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 将细胞悬液转移至流式管内。选用流式细胞仪进行检测。参数设置为激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm。

1.7 蛋白免疫印迹检测

按照“1.3”方法接种和培养细胞, 经 CGA 预处理及 BPDE 染毒 12 h 后, 以预冷 PBS 洗涤细胞 2 次。根据细胞数目, 加入 80 μ L 细胞裂解液(裂解液在使用前按照 1:100 的比例加入蛋白酶抑制剂)进行蛋白抽提。采用 BCA 法检测蛋白浓度后, 加入 5 倍浓度的上样缓冲液煮沸蛋白样本待用。配制 10% SDS-PAGE 分离胶, 5% 浓缩胶。电泳仪电压设置为浓缩胶 80V, 30 min; 分离胶 120V, 60 min。转膜条件为恒压 100V, 100 min。聚偏二氟乙烯膜经 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 加入一抗 Cleaved caspase-3、Cleaved caspase-9、p53、p21 (稀释比均为 1:1000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min; 室温孵育二抗(稀释比为 1:5000) 1 h。TBST 缓冲液清洗 3 次后, 进行化学发光检测。避光条件下配置化学发光显色液, 将显色液均匀覆盖整张膜并放入曝光仪器, 根据需要手动调节曝光时间。蛋白条带定量使用 Image J 灰度分析软件。

1.8 统计学分析

所有试验至少独立重复 3 遍及以上得到相一致结果, 运用 SPSS 19.0 进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 差异性指标选用单因素方差分析。组间比较则选用 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

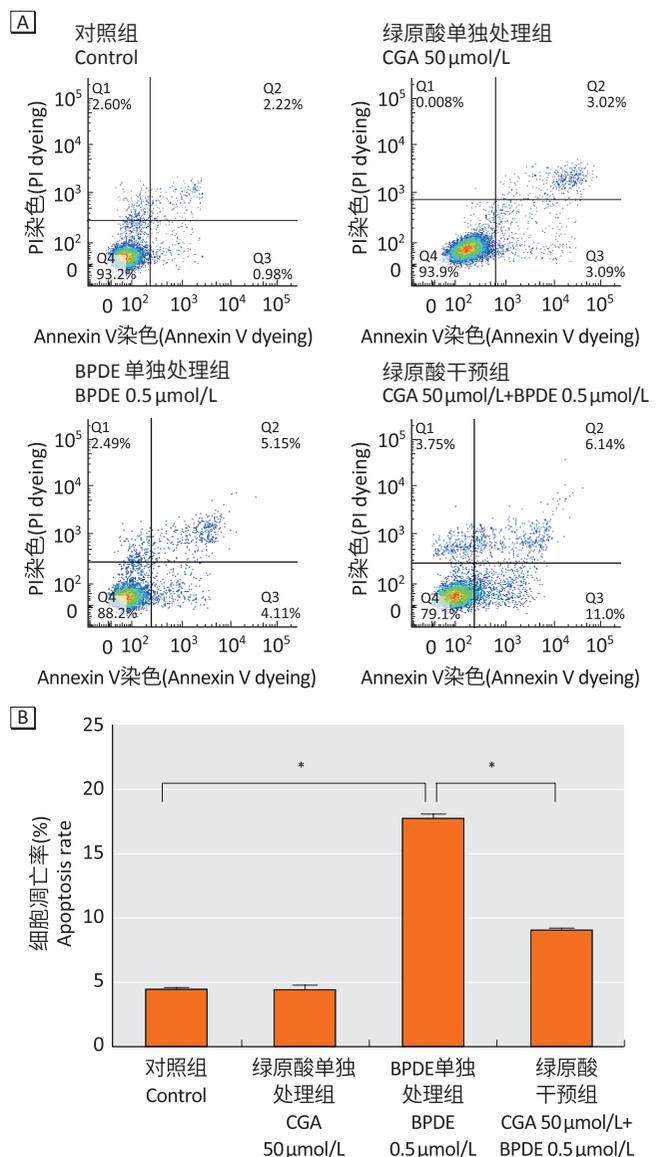
2 结果

2.1 细胞活力

16HBE 细胞在 0、50、100、150、200 μ mol/L 多个浓度梯度的 CGA 处理 2、4、8 h。低浓度组(50、100 μ mol/L 组)各时间点相对细胞活力与 0 μ mol/L 组相比差异无统计学意义($P>0.05$); 而高浓度组(150、200 μ mol/L 组)仅处理时长为 8 h 时, 与 0 μ mol/L 组相比细胞活力下降($P<0.05$), 说明低浓度的 CGA 处理 8 h 对 16HBE 细胞没有表现出明显的毒性作用。

2.2 细胞凋亡

图 1 流式细胞检测结果显示, BPDE 单独处理组的细胞凋亡率高于 CGA 干预组(17.63% vs 9.21%, $P<0.05$)。

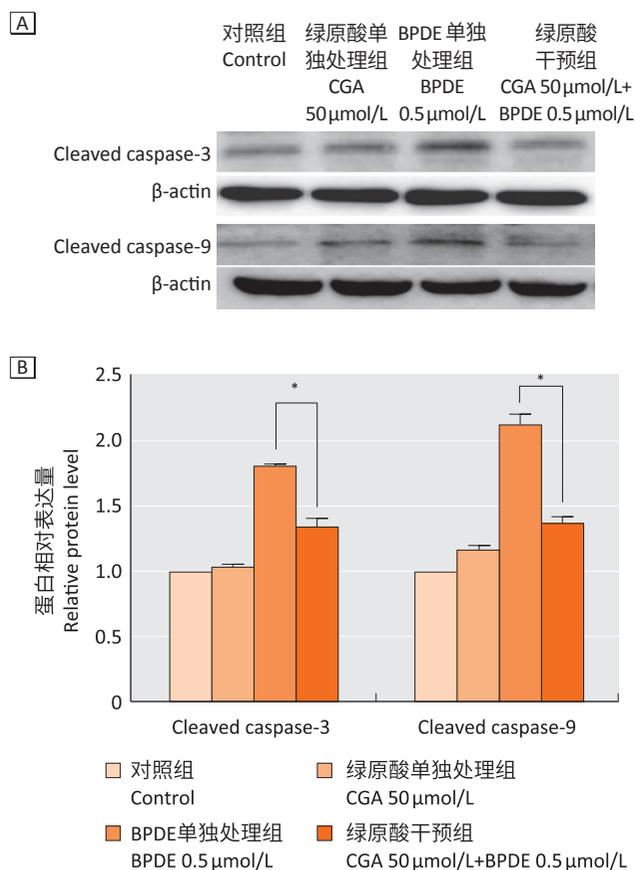


[注] A: 流式细胞仪结果示意图; B: 细胞凋亡率变化。*: $P<0.05$ 。

[Note] A: Flow cytometry results; B: Cell apoptosis rate changes. *: $P<0.05$ 。

图 1 绿原酸干预对 BPDE 诱导的 16HBE 细胞凋亡的影响
Figure 1 Effect of CGA on BPDE-induced apoptosis of 16HBE cells

Western blot 检测结果显示：与 BPDE 单独处理组相比，CGA 干预组的 Cleaved caspase-3 (1.81 vs 1.34, $P<0.05$) 和 Cleaved caspase-9 (2.13 vs 1.37, $P<0.05$) 蛋白表达水平下调。见图 2。



[注] A：Western blot 结果；B：蛋白表达水平变化。*： $P<0.05$ 。
[Note] A: Western blot results; B: Protein expression level changes. *: $P<0.05$.

图2 绿原酸干预对 BPDE 诱导的 16HBE 细胞 Cleaved caspase-3 和 Cleaved caspase-9 蛋白表达水平的影响
Figure 2 Effect of CGA on BPDE-induced Cleaved caspase-3 and Cleaved caspase-9 expression levels of 16HBE cells

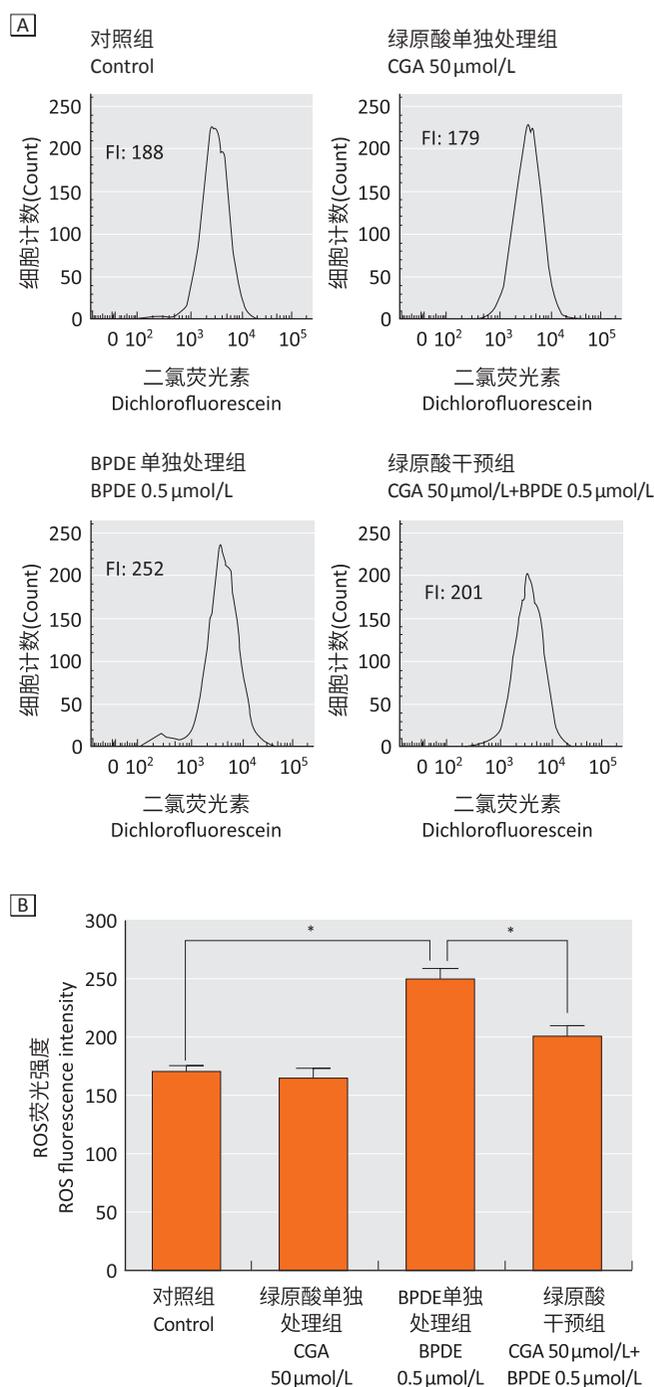
2.3 ROS 水平

与对照组相比，0.5 μmol/L BPDE 刺激后二氯荧光素荧光强度增高 (171.37±3.61 vs 250.21±8.13, $P<0.05$)。CGA 干预组的二氯荧光素荧光强度低于 BPDE 单独处理组 (199.14±6.74 vs 250.21±8.13, $P<0.05$)。见图 3。

2.4 p53 蛋白及 p21 蛋白

CGA 单独处理组的两种目的蛋白表达量与对照组差异无统计学意义。BPDE 单独处理组的 p53 (1.66 vs 0.97, $P<0.05$) 及 p21 (1.61 vs 1.07, $P<0.05$) 蛋白表达

量均高于对照组，而 CGA 干预组的 p53 (1.25 vs 1.66, $P<0.05$) 及 p21 (1.23 vs 1.64, $P<0.05$) 蛋白表达量均低于 BPDE 单独处理组。见图 4。

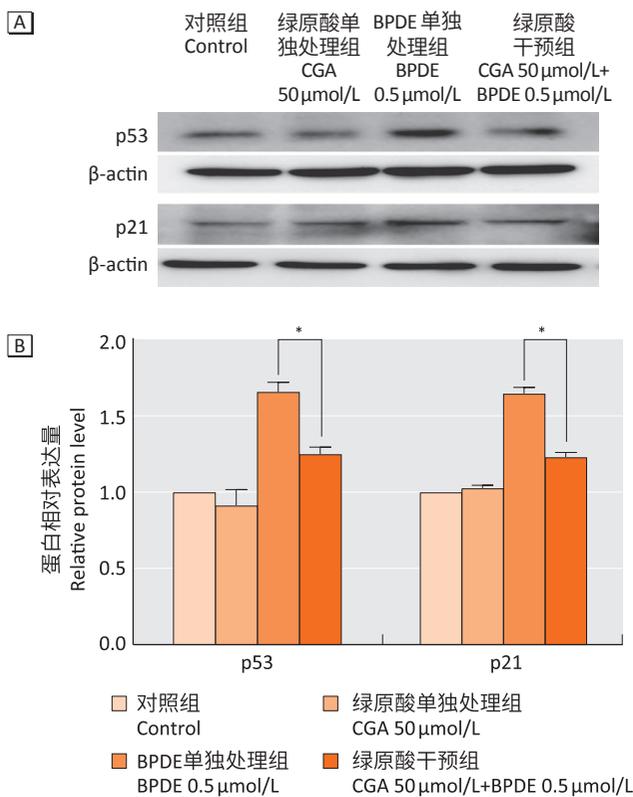


[注] A：流式细胞仪结果示意图；B：ROS 水平变化。*： $P<0.05$ 。FI：荧光强度。

[Note] A: Flow cytometry results; B: ROS level changes. *: $P<0.05$. FI: Fluorescence intensity.

图3 绿原酸干预对 BPDE 诱导的 16HBE 细胞内 ROS 水平的影响

Figure 3 Effect of CGA on BPDE-induced ROS of 16HBE cells



[注] A: Western blot 结果; B: 蛋白表达水平变化。*: $P < 0.05$ 。

[Note] A: Western blot results; B: Protein expression level changes. *: $P < 0.05$.

图4 绿原酸干预对BPDE诱导的16HBE细胞p53和p21蛋白表达水平的影响

Figure 4 Effects of chlorogenic acid on BPDE-induced p53 and p21 protein expression levels of 16HBE cells

3 讨论

目前,关于CGA的研究主要集中于其对炎症反应及氧化应激机制的影响。罗元一^[11]发现,CGA可能通过降低大鼠髓核细胞内超氧阴离子等自由基活性水平,以及促进凋亡抑制基因*Bcl-2* mRNA表达和抑制*caspase-3* mRNA表达等方式起到抗凋亡保护作用。Yamagata等^[12]报道,CGA可调节A549人肺癌细胞的凋亡,并与OCT4、SOX2、CD4等干细胞标志物表达相关。针对CGA在烟草导致细胞损伤中作用的研究较少,因此,本研究首先采用BPDE染毒,模拟烟草对支气管上皮细胞的损伤,然后采用CGA干预,探索其抗凋亡作用及其分子机制。

细胞凋亡主要分为胞内与胞外两种途径。胞外途径主要是指由于毒素、激素、氮氧化物、细胞因子刺激细胞后,激活Fas/CD95的活性,与细胞膜结合,引起procaspase-8发生水解,而胞内途径主要是受线粒体调控,使cyt C进入细胞质,并与caspase-9和Apaf-1形成凋亡小体^[13]。但无论是胞内凋亡通路还是

胞外凋亡通路,最终的结果均是启动天冬氨酸蛋白酶caspase-3使底物蛋白水解,细胞崩解^[14]。本实验结果显示,与对照组相比,BPDE染毒后,16HBE细胞凋亡数增加,与BPDE单纯处理组相比,CGA干预组凋亡细胞数减少。该结果提示,CGA可减轻BPDE诱导的细胞凋亡。BPDE诱导的细胞凋亡主要通过线粒体介导,即凋亡的胞内通路^[15]。进一步实验发现,CGA干预组的Cleaved caspase-9,3蛋白的表达量均低于BPDE单独处理组,推测CGA的抗凋亡作用可能通过Cleaved caspase-9,3参与的胞内通路起效。

ROS的生成与线粒体内膜通透性有关,过多的ROS可诱导caspase-9活化,引起线粒体膜电位崩溃、腺苷三磷酸衰竭,从而促进细胞凋亡^[16]。CGA的生物活性中最主要的是抗氧化作用,是一种有效的酚型抗氧化剂^[17]。CGA之所以具有抗氧化能力,是因为具有一定的R-OH基,能形成具有抗氧化作用的氢自由基,从而消除羟自由基和超氧阴离子等自由基的活性,保护组织细胞免受氧化损伤^[18]。本实验发现,0.5 μmol/L BPDE刺激后,ROS的生成明显增加,而CGA 50 μmol/L干预组的ROS水平低于单纯BPDE处理组。该结果提示CGA在一定程度上具有减少胞内氧化应激的作用。

原癌基因如*Myc*基因、*RAS*家族基因以及肿瘤抑制基因*p53*等^[19]在肺癌的疾病进程中有至关重要的地位。研究显示,p53蛋白介导的细胞凋亡过程中伴随ROS的产生^[19]。但目前尚不确定p53蛋白缺陷是否由ROS增加所导致^[20]。在人乳腺癌MCF-7细胞株中,发现苯并[a]芘刺激能引起细胞凋亡,但在人A549肺癌细胞中却未发现该现象^[21]。这也就意味着,BPDE诱导的细胞凋亡机制可能与细胞系的种类有关。*p21/CDKN1A*作为*p53*的靶基因,可诱导细胞G1/S期停滞,从而参与p53依赖性细胞凋亡过程^[22]。本实验发现,单纯CGA作用组的两种目的蛋白表达量与对照组差异无统计学意义,而CGA干预组的p53及p21蛋白表达量均低于BPDE单独处理组。可以推测p53及p21参与了CGA的抗凋亡机制。

综上,本研究证实CGA可以抑制BPDE诱导的16HBE细胞凋亡,降低胞内ROS的水平。这种抗凋亡作用可能与caspase-9/caspase-3介导的内源性线粒体途径有关。同时,CGA可降低BPDE诱导的p53和p21的蛋白表达增加,因此推测CGA的抗细胞凋亡也可能依赖于p53/p21途径。

参考文献

- [1] HEIST RS, SEQUIST LV, ENGELMAN JA. Genetic changes in squamous cell lung cancer : a review [J] . J Thorac Oncol, 2012, 7 (5) : 924-933.
- [2] SASCO AJ, SECRETAN MB, STRAIF K. Tobacco smoking and cancer : a brief review of recent epidemiological evidence [J] . Lung Cancer, 2004, 45 (S2) : S3-S9.
- [3] 吕嘉春, 吴中亮, 陈宝堃, 等. 反式二羟环氧苯并[a]芘-DNA加合物在肺癌发病中的作用 [J] . 环境与职业医学, 2003, 20 (4) : 253-256.
- [4] ZENG J, ZHU Q, WU Y, et al. Oxidation of benzo[a]pyrene by laccase in soil enhances bound residue formation and reduces disturbance to soil bacterial community composition [J] . Environ Pollut, 2018, 242 : 462-469.
- [5] CHIU CY, YEN YP, TSAI KS, et al. Low-dose benzo(a)pyrene and its epoxide metabolite inhibit myogenic differentiation in human skeletal muscle-derived progenitor cells [J] . Toxicol Sci, 2014, 138 (2) : 344-353.
- [6] CHEN X, SANG X, LI S, et al. Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver [J] . J Ind Microbiol Biotechnol, 2010, 37 (5) : 447-454.
- [7] OKU H, OGAWA Y, IWAOKA E, et al. Allergy-preventive effects of chlorogenic acid and iridoid derivatives from flower buds of *Lonicera japonica* [J] . Biol Pharm Bull, 2011, 34 (8) : 1330-1333.
- [8] NAVEED M, HEJAZI V, ABBAS M, et al. Chlorogenic acid (CGA) : A pharmacological review and call for further research [J] . Biomed Pharmacother, 2018, 97 : 67-74.
- [9] VUKELIĆ I, DETEL D, PUČAR LB, et al. Chlorogenic acid ameliorates experimental colitis in mice by suppressing signaling pathways involved in inflammatory response and apoptosis [J] . Food Chem Toxicol, 2018, 121 : 140-150.
- [10] PÉREZ-VÁSQUEZ A, CASTILLEJOS-RAMÍREZ E, CRISTIANS S, et al. Development of a UHPLC-PDA method for the simultaneous quantification of 4-phenylcoumarins and chlorogenic acid in *Exostema caribaeum* stem bark [J] . J Nat Prod, 2014, 77 (3) : 516-520.
- [11] 罗元一. 绿原酸对过氧化氢诱导大鼠髓核细胞凋亡保护作用的研究 [D] . 南昌 : 南昌大学, 2013.
- [12] YAMAGATA K, IZAWA Y, ONODERA D, et al. Chlorogenic acid regulates apoptosis and stem cell marker-related gene expression in A549 human lung cancer cells [J] . Mol Cell Biochem, 2018, 441 (1/2) : 9-19.
- [13] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease : the balancing act of BCL-2 family proteins [J] . Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20 (3) : 175-193.
- [14] SCORRANO L. Opening the doors to cytochrome c : changes in mitochondrial shape and apoptosis [J] . Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41 (10) : 1875-1883.
- [15] SHI H, DONG L, JIANG J, et al. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway [J] . Toxicology, 2013, 303 : 107-114.
- [16] HOHENSINNER PJ, TAKACS N, KAUN C, et al. Urokinase plasminogen activator protects cardiac myocytes from oxidative damage and apoptosis via hOGG1 induction [J] . Apoptosis, 2017, 22 (8) : 1048-1055.
- [17] 宋昀, 刘颖菊, 王梦华, 等. 杜仲叶醇提取物对冠状动脉粥样硬化心脏病的保护作用 [J] . 中药药理与临床, 2009, 25 (2) : 77-80.
- [18] HUANG Y, CHEN H, ZHOU X, et al. Inhibition effects of chlorogenic acid on benign prostatic hyperplasia in mice [J] . Eur J Pharmacol, 2017, 809 : 191-195.
- [19] GUO J, XU Y, JI W, et al. Effects of exposure to benzo[a]pyrene on metastasis of breast cancer are mediated through ROS-ERK-MMP9 axis signaling [J] . Toxicol Lett, 2015, 234 (3) : 201-210.
- [20] PINTO M, PICKRELL AM, WANG X, et al. Transient mitochondrial DNA double strand breaks in mice cause accelerated aging phenotypes in a ROS-dependent but p53/p21-independent manner [J] . Cell Death Differ, 2017, 24 (2) : 288-299.
- [21] DREJI K, RHRISSORAKRAI K, GUNSALUS KC, et al. Benzo[a]pyrene diol epoxide stimulates an inflammatory response in normal human lung fibroblasts through a p53 and JNK mediated pathway [J] . Carcinogenesis, 2010, 31 (6) : 1149-1157.
- [22] KARIMIAN A, AHMADI Y, YOUSEFI B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage [J] . DNA Repair, 2016, 42 : 63-71.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 汪源 ; 校对 : 王晓宇)