

黄酮类成分黄芩素、槲皮素、丹参素钠对吸烟致细胞毒性和 DNA 损伤的保护作用

陈红君¹, 干志彬¹, 刘霞¹, 余自成¹, 冯轶杉¹, 卢建忠²

1. 同济大学医学院附属杨浦医院 临床药学与药理学研究室, 上海 200090

2. 复旦大学 药学院 药物分析教研室, 上海 201203

摘要: 目的 评价吸烟致细胞毒性和 DNA 损伤以及黄酮类成分黄芩素、槲皮素、丹参素钠的保护作用。方法 以自动吸烟机按照 FTC 协议吸烟产生的主流烟雾在线染毒 B-16 细胞和人类黏膜细胞两种真核细胞, 通过 MTT 比色法和单细胞凝胶电泳法检测吸烟所致的细胞毒性和 DNA 损伤, 并考察黄芩素、槲皮素、丹参素钠的保护作用。结果 吸烟可致体外培养的 B-16 细胞活力明显下降, 两种细胞的 DNA 明显损伤。随着烟气作用时间的延长, 表征细胞内 DNA 损伤程度的彗星尾矩、Olive 尾矩都有增加; 1 mmol/L 槲皮素、黄芩素和丹参素均可明显缓解吸烟引起的细胞毒性和 DNA 损伤, 对 B-16 细胞的活力提升 50%左右, 对人类黏膜细胞的 DNA 保护效果超过 60%。结论 吸烟可致细胞毒性和细胞 DNA 损伤, 但是黄酮类成分黄芩素、槲皮素、丹参素钠均对细胞和 DNA 具有保护作用。

关键词: 黄酮类成分; 黄芩素; 槲皮素; 丹参素钠; 吸烟; 细胞毒性; DNA 损伤; DNA 保护

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)01-0021-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.01.005

Protection of flavonoid components baicalein, quercetin, or sodium danshensu on cytotoxicity and cellular DNA damage induced by cigarette smoke

CHEN Hong-jun¹, GAN Zhi-bin¹, LIU Xia¹, YU Zi-cheng¹, FENG Yi-shan¹, LU Jian-zhong²

1. Institute of Clinical Pharmacy and Pharmacology, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200090, China

2. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To evaluate the protective effect of flavonoid components baicalein, quercetin or sodium danshensu on cytotoxicity and cellular DNA damage induced by cigarette smoke. **Methods** Two kinds of eukaryotic cells B-16 cells and oral buccal mucosal cells in liquid were attacked by the mainstream smoke produced via on-line cigarette smoking according to FTC with or without baicalein, quercetin or sodium danshensu. The cytotoxicity and cellular DNA damage were respectively assessed by MTT method and single cell gel electrophoresis. **Results** The cytotoxicity of B-16 cells and DNA damage of two kinds of cells induced by on-line cigarette smoking were obvious. A positive relationship was observed between the exposure time in smoke and the tail moment and olive tail moment of comet cells. Baicalein, quercetin, or sodium danshensu (1 mmol/L) could relieve the cytotoxicity by about 50% and decrease the DNA damage by more than 60%. **Conclusion** There is a positive relationship between the exposure of cells in smoke and the cellular DNA damage, and the flavonoid components baicalein, quercetin, or sodium danshensu have a protective effect against the genotoxicity of cigarette smoke.

Key words: flavonoid components; baicalein; quercetin; sodium danshensu; cigarette smoke; cytotoxicity; cellular DNA damage; DNA protection

吸烟烟雾中包含的大量活性自由基 (ROS) 攻击细胞和遗传物质, 可导致癌症、遗传疾病等多种疾病的产生^[1-2], 因此对此具有防护作用的天然物质

对延缓衰老、增强机体抵抗疾病的能力有重要意义。中药在我国历史悠久, 为很多疾病尤其疑难杂症的治疗提供了广为人知的支持。很多中药活性成分具

收稿日期: 2013-10-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302741)

作者简介: 陈红君 (1981—), 女, 博士, 主管药师, 研究方向为中药活性成分筛选。Tel: (021)65690520-624 E-mail: cindy009898@163.com

有清除 ROS 的活性,尤其是黄酮类成分,如槲皮素、丹参素、黄芩素等^[3]。黄酮类抗氧化成分对吸烟致细胞毒性和 DNA 损伤的影响报道较少。因此,本实验利用 MTT 比色法、单细胞凝胶电泳和在线吸烟染毒技术,并参考文献报道^[4]选用取自人体的颊黏膜细胞、简单易得的体外培养的 B-16 细胞考察了黄酮类成分槲皮素、黄芩素、丹参素钠对吸烟致细胞毒性和 DNA 损伤的影响,以期为寻找高效、安全的 DNA 保护药物提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

自动吸烟机(德国 Borgwaldt Technik 公司),气体捕集器(订制),Axioskop-plus 型荧光成像仪(德国 Zeiss 公司),DYY-II 型水平凝胶电泳仪(北京市六一仪器厂),TH4-200 荧光倒置显微镜(Olympus 公司),彗星图象分析软件(casp-1.2.2, Poland, <http://casp.sourceforge.net/index.php>),Multiscan MK3 酶联免疫标记分析仪(美国 Thermo Electron 公司)。

1.2 主要试剂

DMEM 培养基、高灭活胎牛血清、0.25%胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液均购自 Gibco 公司;烤烟型香烟(利群牌,含焦油量 15 mg/支,浙江中烟工业有限责任公司);黄芩素(批号 081103)、槲皮素(批号 080720)、丹参素钠(批号 071013)均购自上海友思生物制品公司,质量分数 $\geq 98\%$;三羟甲基氨基甲烷(Tris, Sigma 分装);MTT 溶液(噻唑蓝):0.1 mol/L PBS (pH 7.2~7.4)配制 1 mg/mL 母液,滤过除菌,1 mL 分装,4 °C 避光保存;十二烷基肌氨酸钠(Sigma 分装);低熔点琼脂糖(FMC 分装);溴化乙啶(EB, Amresco 公司,上海分装);其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 细胞染毒前处理

2.1.1 B-16 细胞的前处理 收集对数期生长的细胞接种置培养皿中,37 °C、5% CO₂ 培养过夜至长满孔底,弃去培养液,PBS 温和洗涤 1 次,即得。

2.1.2 人类黏膜细胞的前处理 参照 Rojas 等^[4]的方法,并略有改进,受试者为 1 名健康成年女子。每次取细胞前,清水漱口 3 次,用软毛牙刷轻刷口腔两侧颊部黏膜,接着用 10 mL 滤过除菌的生理盐水漱口,收集漱口水。将漱口水倒入离心管,6 000 r/min 离心 2 min。去掉上清液,将离心管底部细胞

用 PBS 重悬为约 1 mL。

2.2 在线吸烟

用于染毒的香烟于 20 °C、相对湿度 60%的恒温恒湿箱内平衡 48 h,将含有捕集液的气体捕集器、自动吸烟机烟道串联。自动吸烟机按联邦贸易委员会协议(FTC)的标准吸烟^[5],即每吸一口持续 2 s,每口吸气体积为 35 mL,吸气频率为 1 口/min,吸烟主流烟雾即通过气体捕集器扩散入 2 mL 捕集液(细胞培养液或 PBS)中,使得寿命更短的 ROS 也被捕获。

2.3 染毒后 MTT 法检测细胞活力

收集对数期 B-16 细胞,调整细胞悬液浓度,于 96 孔细胞培养板中每孔加入 100 μ L,铺板使待测细胞调密度至 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ /孔,边缘孔用无菌 PBS 填充,5% CO₂、37 °C 孵育,至细胞单层铺满孔底,弃去培养液,PBS 温和洗涤 1 次。设置空白对照组:不染毒;细胞单独染毒组(阳性对照):用细胞培养液在线捕集 1 支香烟主流烟气后,立即染毒细胞;添加各活性成分的染毒组:细胞染毒的同时加入各活性成分至终浓度为 1 mmol/L^[5-6];空白对照组用培养液补齐,每组设 5 个复孔;5% CO₂、37 °C 下孵育 3 h,倒置显微镜下观察。弃去孵育液,PBS 温和洗涤 3 次,每孔加入 100 μ L 培养液后,再加入 20 μ L MTT 溶液(5 mg/mL,即 0.5% MTT),继续培养 4 h,终止培养,小心地吸去孔内培养液,每孔加入 100 μ L DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,酶联免疫检测仪在 490 nm 处测量各孔的吸光度值。

2.4 染毒后 DNA 损伤的测定

与“2.3”类似,设置空白对照组;细胞单独染毒组:与在线捕集的 4 口(约半只香烟)烟雾作用 1、3 h 组(阳性对照);添加活性成分的染毒组:细胞分别与 1 mmol/L 槲皮素、黄芩素、丹参素钠联合染毒 3 h;反应结束进行单细胞凝胶电泳实验。

铺胶参照高建军等^[7]改进的单层铺胶技术,即将细胞用 PBS 稀释为 4×10^4 /mL(血细胞计数板显微镜下计数)后,与 1%低熔点凝胶(LMA)按体积比 1:3 混合,平铺在预温的载胶片(可以是 96 孔细胞培养板盖的截片)槽内(18 μ L/孔),即转移至 4 °C 暗盒 10 min,将载胶片小心浸入裂解液,于 4 °C 暗盒进行细胞裂解 1 h,经中和液漂洗后,浸入电泳液于 4 °C 暗盒进行 DNA 双链解旋 20 min,电泳 20 min(22 V, 300 mA),4 °C 中和液中和 3 次,

5 min/次,晾干;于 10 μg/mL EB 溶液中染色 30 min,超纯水洗掉表面的染料,置于透明培养皿中,在荧光(绿光)显微镜下观察,数码相机采集荧光图象。彗星电泳分析软件(CASP 软件)分析,计算平均尾距和 Olive 尾距值。

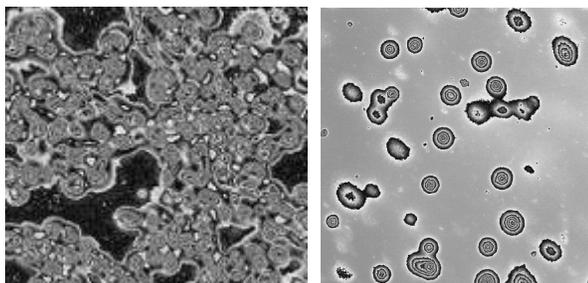
2.5 统计学处理

所有实验均重复 3 次以上,数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Excel 软件进行统计学处理,组间比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 人类黏膜细胞的形态

按照文献方法采集的人类黏膜细胞,形态见图 1。刚采集的细胞置 CO₂ 培养箱中孵育 3 h 的显微图片(×40 倍)中细胞已趋向贴壁,呈扁平卵圆形或多边形。由于细胞密度大,且未充分分散在 PBS 中。经吹打、稀释后,显微图片(×40 倍)可以看出,人类黏膜细胞呈较均匀的卵圆形,由于上皮细胞间桥粒结构的作用,有些尚未完全分离。但结果均显示采集的细胞杂质较少,可用于进一步的实验。



刚采集细胞 稀释后细胞

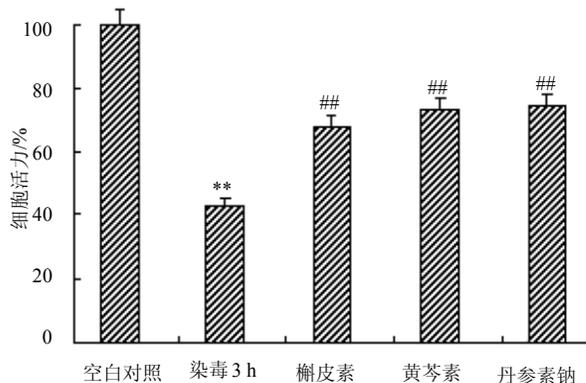
图 1 人口腔颊黏膜细胞显微镜下的形态

Fig. 1 Modality of oral buccal mucosal cells under the microscope

3.2 染毒后 MTT 法检测细胞活力结果

MTT 法检测吸烟对于细胞的活力的影响,结果

见 2。细胞单独染毒组的细胞活力不足空白对照组的 1/2,以细胞单独染毒组为阳性对照,添加槲皮素、黄芩素、丹参素钠的细胞组的活力降低的程度明显改善,改善程度分别为 43%、53%、54%,提示 3 种活性成分可以清除主流烟雾中的某些对细胞有害成分,降低吸烟对细胞的损伤。



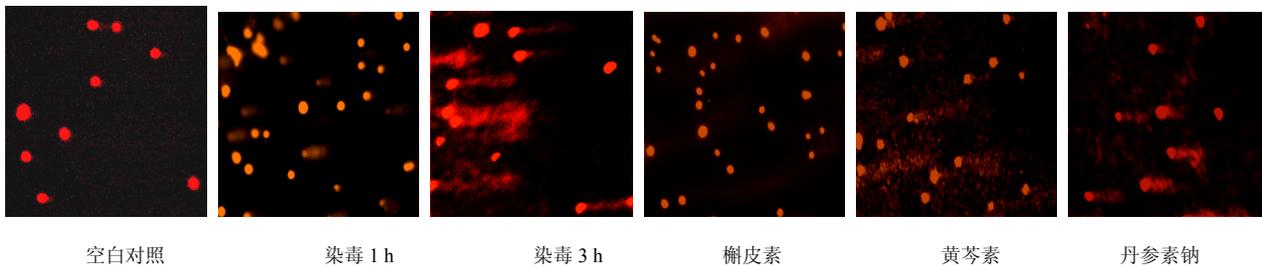
与空白对照组比较: ***P*<0.01; 与染毒 3 h 组比较: ###*P*<0.01
***P*<0.01 vs control group; ###*P*<0.01 vs group treated with cigarette smoke for 3 h

图 2 吸烟致 B-16 细胞活力降低及活性成分的影响

Fig. 2 Vitality of B-16 cell by treated with cigarette smoke or with active compounds together

3.3 染毒后 DNA 损伤的测定结果

3.3.1 细胞 DNA 损伤形态学观察 荧光镜显像的 B-16 细胞见图 3。空白对照组的细胞无明显拖尾现象,而染毒组的细胞均有拖尾现象,并且染毒时间比较长的实验组细胞,彗星尾巴明显比较长,而加入了槲皮素、黄芩素、丹参素钠的染毒组,彗星的程度有所改善,尤其是槲皮素添加组的拖尾现象改善程度比较明显。受试者颊黏膜细胞也出现了类似的结果。



空白对照 染毒 1 h 染毒 3 h 槲皮素 黄芩素 丹参素钠

图 3 吸烟致 B-16 细胞 DNA 损伤及各活性成分与之作用的彗星图像

Fig. 3 Comet assay images of B-16 cellular damaged DNA by treated with cigarette smoke or with active compounds together

3.3.2 CASP 分析彗星细胞的结果 CASP (comet assay software program) 为单细胞凝胶电泳图像的分析软件, 该软件可以自动计算彗星图像的相关参数^[8]。目前用来分析 DNA 损伤的彗星图像参数主要有彗星长度、彗星头部面积、彗星头部平均荧光亮度、彗星头部 DNA 含量、彗星尾部长度、彗星尾部重心、彗星尾部 DNA 含量、彗星尾部面积、彗星尾部距离、彗星尾矩、olive 尾矩、彗星尾部惯量等。这些彗星电泳常用的参数中, 彗星长度 (CL, comet length, 即整个彗星图像在彗尾方向上的最大长度) 和尾长 (TL, tail length, 即彗星尾部在彗尾方向投

影的长度) 的灵敏度比较高, 但是 CL 和 TL 的计算中没有涉及到 DNA 含量的变化。因此, CL 和 TL 不能充分反应 DNA 在高剂量损伤时的状态, 而尾矩 (TM, tail moment, 即彗星尾长与彗星尾部 DNA 含量的乘积) 和 Olive 尾矩 (OTM, olive tail moment, 即彗星尾部 DNA 含量与尾部距离的乘积) 不但反映彗星尾长的变化, 还反映了 DNA 含量的变化, 更能够较准确地反映高剂量损伤细胞 DNA 的状态。

实验以尾矩、Olive 尾矩为衡量指标, 定量比较了吸烟致人类黏膜细胞、活性成分与之作用的结果, 见表 1。

表 1 在线吸烟或与各活性成分存在对人类黏膜细胞 DNA 损伤的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effects of on-line cigarette smoking and active composition on exfoliated buccal cellular DNA damage ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	剂量/(mol·L ⁻¹)	尾矩	Olive 尾矩
空白对照	—	3.40±2.15	5.35±2.69
烟雾染毒 1 h	—	31.93±10.42**	19.98±7.01**
阳性对照 (烟雾染毒 3 h)	—	109.30±29.23**	52.97±17.80**
烟雾染毒 3 h+槲皮素	1	31.59±6.72 ^{##}	16.15±4.01 ^{##}
烟雾染毒 3 h+黄芩素	1	41.59±10.43 ^{##}	24.35±8.26 ^{##}
烟雾染毒 3 h+丹参素钠	1	28.29±7.78 ^{##}	22.44±5.63 ^{##}

与空白对照组比较: ** $P<0.01$; 与阳性对照组比较: ^{##} $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs positive control group

随着染毒时间增加, 细胞的尾矩、Olive 尾矩值逐渐增大, 差异均具有统计学意义。3 种活性成分在浓度为 1 mmol/L 时均减轻在线吸烟对人类黏膜细胞 DNA 的损伤, 若定义活性成分引起尾矩降低的百分数为: (阳性对照组—某活性成分添加组) / (阳性对照组—空白对照组) × 100%, 则由表 1 中各平均值计算得尾矩降低百分数为: 槲皮素 73.4%、黄芩素 63.9%、丹参素钠 76.5%; Olive 尾矩降低的百分数为: 槲皮素 77.3%、黄芩素 60.1%、丹参素钠 64.1%。这些数值也定量反映了各活性成分对 DNA 的保护作用。

4 讨论

吸烟已成为继高血压之后人类健康的第 2 号杀手, 每年有近 500 万人因吸烟导致的肺癌、口腔癌、消化道癌等各种肿瘤而死亡。我国的吸烟人数位居世界前列, 且近年来有低龄化的趋势。烟草工业巨大的经济利益决定了短时间内禁止使用烟草几乎是不可能的。因此, 采取修复或预防香烟毒性的措施, 即通过阻止早期致癌物作用, 逆转或捕获恶化前期细胞的发展来阻止 DNA 损伤, 从而预防侵入性癌

症的发展, 具有十分重要的意义。为此, 本实验通过研究吸烟造成的细胞毒性、DNA 损伤, 体外考察典型中药活性成分黄酮类成分黄芩素、槲皮素、丹参素钠的影响, 以期寻找高效安全的防护先导药物。

MTT 法具有灵敏度高、重复性好、经济快速、易自动化等特点, 并且与台盼蓝计数法、生长曲线法和集落形成法、3H-TdR 掺入试验等检测细胞活力的方法有较好的一致性, 已广泛应用于抗肿瘤药物的初步筛选^[9-10]、细胞毒性检测^[11-12]以及肿瘤化学药物放射敏感性的测定^[13-14]。单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis, SCGE) 又称彗星实验 (comet assay), 是一项在单细胞水平上检测细胞内 DNA 损伤和修复的技术^[15-16], 具有低耗、灵活、方便等优点而备受科研工作者青睐。本研究也借助了这两种可靠的评价手段从 DNA 水平上确证了吸烟的毒性, 结果表明, 所选吸烟主流烟雾剂量确实引起细胞活力下降、细胞 DNA 损伤, 烟雾与 DNA 作用时间越长, 两种真核细胞均显示 DNA 损伤越严重。实验所用的 B-16 细胞虽为黑色素瘤细胞, 但其根源于哺乳动物细胞, 且有完整的胞核, 简单易

养。许多癌细胞系如 A549 细胞^[17]、Hela 细胞^[18]、HepG2 细胞^[19]等纷纷被用于环境污染物的毒性评价,且均证实了环境污染物对哺乳动物癌细胞和非癌细胞造成损伤,本实验的结果同样证实了吸烟对哺乳动物细胞的损伤作用在不同类型的细胞中存在一定的普遍性。

研究证实,吸烟导致各种癌变的最终原因是氧化应激学说,香烟烟雾中含有的多达 1×10^{16} 个/支的 ROS 是吸烟有害健康的主要机制,而 ROS 导致的细胞毒性和 DNA 损伤是肿瘤发生的基本途径,而且具有遗传毒性^[20-21]。实验中选用的活性成分大都具有抗氧化效果,槲皮素、黄芩素、丹参素更是较常报道的体内外 ROS 的清除剂^[22-26]。本研究条件下,此 3 种活性成分均可明显地缓解吸烟的细胞毒性和所致的 DNA 损伤。鉴于烟雾中破坏细胞和 DNA 最主要的还是其中的 ROS,本研究中活性成分在此保护细胞的主要机制与其清除 ROS 的活性是不可分割的。

本研究中槲皮素对吸烟致细胞 DNA 损伤的影响与文献报道的其可改善吸烟致体内 DNA 损伤的结果一致。Malaveille 等^[27]也发现食物中的黄酮类成分槲皮素可以显著地抑制吸烟者膀胱部位的 DNA 损伤;Gupta 等^[28]发现一定剂量(10、30 mg/kg)槲皮素可以改善烟草中存在的致肝癌物二乙基亚硝胺导致的大鼠 DNA 损伤,同时显示抗氧化效果,因而可以预防二乙基亚硝胺的肝毒性;这些研究证明本实验体外研究结果与体内研究结果的相关性。有关丹参素、黄芩素对吸烟致体内 DNA 损伤影响的报道罕见,但有报道称丹参素能够显著地提高晶状体上皮细胞对抗氧化应激损伤的能力,对晶状体上皮细胞 DNA 损伤有保护作用^[29],还能显著地减少辐射所致的人胚肝 L-02 细胞内的 DNA 损伤^[30];黄芩素也可预防乳腺癌细胞中 DNA 的甲基化^[31],还可通过清除 ROS 的机制保护心肌细胞、神经细胞免受氧化损伤^[32]。这些体外研究均显示黄芩素、丹参素也是值得进一步进行体内研究的先导药物。

综上所述,本实验利用在线吸烟捕集烟雾染毒两种真核细胞,MTT 法与 SCGE 考察了吸烟的细胞及遗传毒性,并发现黄酮类活性成分黄芩素、槲皮素、丹参素钠对细胞和 DNA 有高效保护作用,其防护作用与其清除 ROS 的能力密切相关。但其保护细胞和 DNA 的其他机制,以及作用于活体动物的效果,还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] DeMarini D M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review [J]. *Mutat Res*, 2004, 567(2/3): 447-474.
- [2] Maertens R M, White P A, Rickert W, et al. The genotoxicity of mainstream and sidestream marijuana and tobacco smoke condensates [J]. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22(8): 1406-1414.
- [3] 唐 栩, 许东晖, 梅雪婷, 等. 26 种黄酮类天然活性成分的药理研究进展 [J]. *中药材*, 2003, 26(1): 46-49.
- [4] Rojas E, Valverde M, Sordo M, et al. DNA damage in exfoliated buccal cells of smokers assessed by the single cell gel electrophoresis assay [J]. *Mutat Res*, 1996, 370(2): 115-120.
- [5] Chen H, Chu G, Cao Z, et al. Magnetic bead-based approach to monitoring of cigarette smoke-induced DNA oxidation damage and screening of natural protective compounds [J]. *Talanta*, 2010, 80(3): 1216-1221.
- [6] 陈红君, 刘 霞, 余自成, 等. 黄酮类活性成分对吸烟致质粒DNA损伤的保护作用 [J]. *中南药学*, 2013, 11(7): 506-509.
- [7] 高建军, 丰盛梅, 金慰芳. 碱性单细胞凝胶电泳铺胶技术的改进 [J]. *复旦学报: 医学版*, 2004, 31(3): 311-312.
- [8] Końca K, Lankoff A, Banasik A, et al. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay [J]. *Mutat Res*, 2003, 534(1/2): 15-20.
- [9] 申志华, 揭 伟, 陈 锦, 等. 苦参碱对人卵巢癌细胞株 HO-8910PM 增殖及侵袭运动能力的影响 [J]. *中草药*, 2008, 39(3): 386-390.
- [10] 万贵平, 张真真, 蔡雪婷, 等. 七叶皂苷钠抑制人白血病 Jurkat 细胞增殖的机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(1): 106-110.
- [11] 何 华, 葛志伟, 刘 雳, 等. 甘草黄酮对阿霉素细胞毒性的影响及其构效关系研究 [J]. *中草药*, 2010, 41(6): 941-945.
- [12] 王 红, 刘 琼, Ali A bdella, 等. 灯盏乙素拮抗硒对人肝细胞 L-02 毒性的研究 [J]. *中草药*, 2004, 35(4): 57-59.
- [13] 孔肇路. 肿瘤增敏药物的增敏作用及机制研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2004.
- [14] 巩念明. 盐酸洛拉曲克纳米制剂对 MFC 细胞的抗增殖作用 [D]. 济南: 山东大学, 2006.
- [15] 金顺姬, 段 链, 黄 梅, 等. 白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂 I 和 VI 所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2003, 34(12): 62-65.
- [16] 史大永, 贺 娟, 许 凤, 等. 松节藻醇提取物对正常小鼠抗氧化活性的影响 [J]. *中草药*, 2009, 40(1): 97-99.

- [17] 王起恩, 柳德米拉·曲路, 韩春华, 等. 温石棉与烟溶液作用后人肺泡上皮细胞 DNA 的损伤及修复 [J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34(1): 25-27.
- [18] 邹亚玲, 来瑞平, 周利红, 等. 多氯联苯增强苯并(a)芘致 HepG2 细胞 DNA 的损伤作用 [J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(2): 97-100.
- [19] 王 丽, 乔永康, 姚得松, 等. 甲醛对三种真核细胞 DNA 的损伤作用 [J]. 中华预防医学杂志, 2006, 40(1): 57-59.
- [20] Borgerding M F, Bodnar J A, Chung H L, *et al.* Chemical and biological studies of a new cigarette that primarily heats tobacco. Part 1. Chemical composition of mainstream smoke [J]. *Food Chem Toxicol*, 1998, 36(7): 169-182.
- [21] 聂坤荣, 诸亚君. 吸烟致癌的自由基机制 [M]. 国外医学: 肿瘤学分册, 1992, 19(4): 204-208.
- [22] 申 亮, 纪洪芳, 柴建国, 等. 对九种天然产物清除自由基活性的理论评价 [J]. 生物物理学报, 2005, 21(5): 332-338.
- [23] 王 朔, 王振杰, 赵 峰. 丹参素对血管内皮细胞氧化应激损伤保护作用的实验研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(20): 2493-2494.
- [24] Boots A W, Haenen G R, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 585(2/3): 325-337.
- [25] 高 燕, 顾振纶, 蒋小岗, 等. 黄芩素药理学研究新进展 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1765-1767.
- [26] Malaveille C, Hautefeuille A, Pignatelli B, *et al.* Dietary phenolics as anti-mutagens and inhibitors of tobacco-related DNA adduction in the urothelium of smokers [J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17(10): 2193-2200.
- [27] Tian S, Du L D, Wang S B, *et al.* Pharmacokinetic study of baicalein and its major metabolites after iv administration in dogs [J]. *Chin Herb Med*, 2011, 3(3): 196-201.
- [28] Gupta C, Vikram A, Tripathi D N, *et al.* Antioxidant and antimutagenic effect of quercetin against DEN induced hepatotoxicity in rat [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(1): 119-128.
- [29] 路 航, 骆滨江, 修巍威, 等. 丹参素对体外晶状体上皮细胞损伤的保护作用 [J]. 国际眼科杂志, 2010, 10(6): 1049-1051.
- [30] 郭 娟, 张琰君, 曾丽华, 等. 丹参素对电离辐射损伤人胚肝细胞 L-02DNA 的防护作用 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(2): 499-500.
- [31] Paluszczak J, Krajka-Kuźniak V, Baer-Dubowska W. The effect of dietary polyphenols on the epigenetic regulation of gene expression in MCF7 breast cancer cells [J]. *Toxicol Lett*. 2010, 192(2): 119-125.
- [32] Jiang F, Chang C W, Dusting G J. Cytoprotection by natural and synthetic polyphenols in the heart: novel mechanisms and perspectives [J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(37): 4103-4112.