

槲皮素抑制黄曲霉毒素产生的机制初探

王淼焱¹, 张浩², 杨洁³, 胡梁斌¹, 莫海珍¹

(1. 河南科技学院食品学院, 河南新乡 453003) (2. 西北农林科技大学食品学院, 陕西杨凌 712100)

(3. 信阳茶叶试验站, 河南信阳 3790248)

摘要: 研究发现茶叶中的茶多酚单体普遍具有抑制黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 产生的活性, 而槲皮素的抑毒活性要高于等浓度下儿茶素类茶多酚。为了解槲皮素抑制黄曲霉毒素产生的分子机制, 对黄曲霉菌的抗氧化系统、毒素产生的相关基因进行了分析。试验结果显示槲皮素处理后降低黄曲霉菌内的 ROS 水平, 降低 MDA 含量。RT-PCR 结果证实槲皮素能够激活抗氧化系统转录因子 Yap1, 导致黄曲霉体内的抗氧化酶系统活性的增加, POD、CAT、SOD 都得到了显著的提高, 这很可能是槲皮素抑制 AFB₁ 产生的关键因素; 槲皮素能同时下调 AflR 与 AflS 的表达, 而 AflS 能够通过结合 AflR 调控产毒基因的表达, 这很可能是槲皮素抑制 AFB₁ 产生的核心分子机制, 这种机制也与其激活抗氧化系统缓解菌体内氧化胁迫的作用相对应。以上结果表明槲皮素作为一种高效的黄曲霉毒素合成抑制剂, 将对提高食品安全保障具有较高的应用价值。

关键词: 槲皮素; 黄曲霉毒素; 基因; 氧化胁迫; 抑制

文章编号: 1673-9078(2014)7-56-62

Inhibition Effect of Quercetin on Aflatoxin B₁ Production

WANG Miao-yan¹, ZHANG Hao², YANG Jie³, HU Liang-bin¹, MO Hai-zhen¹

(1. Department of Food Science, Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)

(2. College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

(3. Tea Experimental Station of Xinyang City, Xinyang 3790248, China)

Abstract: Many polyphenol monomers could inhibit aflatoxin B₁ production and Quercetin had higher inhibitory activity than other catechin polyphenols. To explore the inhibition effect of quercetin on aflatoxin B₁ production, the antioxidant system of *Aspergillus flavus* was monitored and the toxin genes express after quercetin treatment were analyzed. The results showed that quercetin treatment decreased the ROS and MDA concentration, confirming that this treatment could alleviate the oxidative stress of *Aspergillus flavus*. RT-PCR result showed that quercetin was able to activate the transcription factor Yap1 in antioxidant system to increase antioxidant enzyme activity, such as POD, COT and SOD activity. This induction may be a key factor for quercetin inhibition on AFB₁. Quercetin downregulated the expression of *AflR* and *AflS*. *AflR* and *AflS* could regulate toxin production by combining *AflR* expression gene, which is possibly the key mechanism of the inhibition effect of quercetin on AFB₁. This was also associated with activation of antioxidant systems in easing the fungi oxidative stress *in vivo*. In the case of *AflR* downward, the toxin gene expression was inhibited. Hence, quercetin can be employed as an efficient aflatoxin synthesis inhibitor with great application potential.

Key words: quercetin; aflatoxin; gene; oxidative stress; inhibition

黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AF) 是由寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*)、黄曲霉 (*A. flavus*) 等产毒菌株所产生的一类次生代谢产物^[1], 具有肝毒性和致癌、致畸、致细胞突变的作用^[2], 被联合国粮农组织

收稿日期: 2014-02-24

基金项目: 国家自然科学基金 (31101231); 教育部新世纪优秀人才项目 (NCET-12-0694); 河南省高校科技创新人才项目 (2012HASTIT020); 河南省科技攻关项目 (122102310308)

作者简介: 王淼焱 (1979-), 女, 硕士, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 莫海珍 (1972-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全控制

和世界卫生组织认定为 I 类致癌物质。黄曲霉毒素污染已成为谷物及其制品国际贸易争端以及经济损失的主要原因之一^[3]。采用无毒或者低毒的天然物质控制黄曲霉毒素污染成为世界关注的课题。茶叶中含有很多对人体具有生理调节功能的组分, 而且部分组分还对多种疾病有预防和治疗作用^[4-5]。有研究发现茶多酚中槲皮素能够阻止黄曲霉毒素 AFB₁ 向致癌性产物 AFB₁-8, 9-epoxide 的转化^[6]; 此外茶多酚中没食子酸也被发现能够抑制黄曲霉菌产生 AFB₁^[7]。我们在前期研究中发现茶叶水提取物能够抑制黄曲霉菌 AFB₁ 的产生, 而且不同种类茶叶的水提取物活性不同^[8]。在茶叶

的水浸提物中茶多酚的含量尤其高,因此在本研究中我们首先对常见茶多酚单体抑制产毒的活性进行了分析,发现槲皮素具有较强的抑毒活性。

槲皮素(querctin)是自然界分布较广的多羟基黄酮类化合物,广泛存在于水果、蔬菜、饮料和中草药中(图1)^[9]。槲皮素的作用机制是多元的,包括抗氧化清除自由基、调控基因表达及细胞信号转导等^[10-11]。槲皮素不具有遗传毒性和致癌性^[12],但能够抑制多种癌细胞的生长,在癌症预防和治疗方面有着广阔的应用前景^[6]。本研究在发现槲皮素能够高效地抑制黄曲霉毒素产生的基础上,进一步对其作用机制进行了初步研究。结果发现槲皮素的活性不仅与自身的抗氧化能力有关,可能还包括对黄曲霉菌生理生化系统的调节。为进一步了解槲皮素抑制黄曲霉毒素产生的分子机制,本文最后又从黄曲霉菌的抗氧化系统、黄曲霉毒素产生的相关基因入手,研究了槲皮素处理对黄曲霉产毒的影响机理。

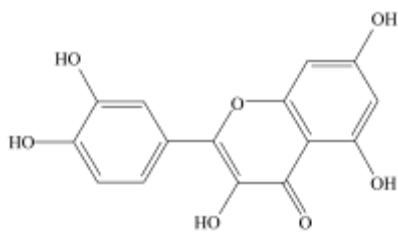


图1 槲皮素的化学结构

Fig.1 Chemical structure of quercetin

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验材料:黄曲霉菌 CGMCC3.2890,购于中国普通微生物菌种保藏管理中心,PDA培养基4℃保存。

试剂:黄曲霉毒素 B₁(afatoxin B₁, AFB₁),购于 sigma 公司;总茶多酚(TP)、槲皮素(querctin)、没食子酸(gallic acid)、儿茶素(catechin)及其衍生物包括(-)-没食子儿茶素(GC)、(-)-表没食子儿茶素(EGC)、(-)-表儿茶素(EC)、(-)-表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)、(-)-表儿茶素没食子酸酯(ECG)、(-)-儿茶素没食子酸酯(CG)、(-)-没食子儿茶素没食子酸酯(GCG),均购自 Nacalai Tesque Inc.(Kyoto, Japan),纯度大于98%;活性氧荧光探针 Carboxy-H₂DCFDA (Eugene, OR)、愈创木酚、三氯乙酸、TBA、TCA、槲皮素、过硫酸铵、SDS、β-巯基乙醇、联苯、抗坏血酸、四甲基乙二胺、核黄素、铁氰化钾等,均为分析纯。

1.2 仪器与设备

荧光分光光度计(RF5301),日本岛津公司;倒置荧光显微镜(NIKON TE2000-S)日本尼康公司;研磨珠均质器(Mini-Beadbeater-16)美国 Biospec 公司。

1.3 方法

1.3.1 茶多酚抑毒抑菌活性检测

采用96孔板培养法,对各种茶多酚单体的抑毒活性检测。每孔含有沙氏液体培养基200 μL(含有黄曲霉孢子1×10⁵ CFU/mL)。向各孔中分别加入各种茶多酚单体溶液,使各种茶多酚单体的浓度分别为5、10、25、50、100、200、400、800、1000 μg/mL。加完茶多酚单体的96孔板放在28℃的培养箱中培养60 h,然后对每孔培养基中的黄曲霉毒素进行检测。同时根据每孔黄曲霉的生长状况,记录各种茶多酚单体抑制黄曲霉生长的MIC(肉眼可以观察到的最低完全抑制浓度)。

1.3.2 AFB₁ 提取及含量测定

吸取一定量黄曲霉培养滤液,加三倍氯仿萃取,萃取液于60℃下用氮吹仪吹干,溶解于甲醇中,过0.22 μm微孔滤膜,然后用HPLC测定AFB₁的含量。色谱柱: COSMOSIL 5C18-MS-II Packed Column (4.6 mm I.D.×250 mm)(上海泉岛公司);柱温:22℃;进样量:10 μL;检测波长:365 nm;流动相:乙腈:甲醇:水(1:1:2, V/V/V);流速:1 mL/min^[13]。

1.3.3 胞内活性氧(ROS)水平

槲皮素处理过的黄曲霉及对照组经过24、36、48、60、72 h的培养,分别采样。取得的菌丝经磷酸缓冲液(PBS)洗涤后,加入20 μmol/L活性氧荧光探针 carboxy-H₂DCFDA (Eugene,OR),在30℃条件下孵育30 min;使用PBS洗涤两次,然后加入1 mL PBS缓冲液和0.1 g小玻璃珠,通过Mini-BeadBeater-16 (Biospec, USA)破碎菌丝;破碎的菌丝液在10,000 g离心,取上清,通过考马斯亮蓝法测定其可溶性蛋白含量,并通过荧光分光光度计测定其荧光强度(激发光450 nm,发射光520 nm)。同时取部分未经过 beater 破碎的菌丝通过荧光显微镜观察。

1.3.4 脂质过氧化分析

MDA的浓度可作为黄曲霉细胞脂质过氧化指标。槲皮素处理过的黄曲霉及对照组经过24、36、48、60、72 h的培养,分别采样。取得的样品通过6,000 g离心10 min后收集菌丝,然后在2 mL含有10%三氯乙酸中均质。匀浆在10,000×g离心10 min,吸取2 mL的上

清液,与 2 mL 的 TBA 溶液(0.25% TBA 溶于 10% TCA)混合。混合液在 95 °C 条件下加热 30 min, 然后迅速冷却, 随后在 6,000 g 离心 10 min, 上清液在 532 nm 测其吸光度, 在 600 nm 测定非特异吸光度。MDA 含量计算依据公式:

$$C=6.45 (D_{532}-D_{600}) -0.56D_{450}$$

1.3.5 SOD、CAT 和 POD 活性测定

POD 酶活测定采用愈创木酚法^[4], 取 500 mL pH 6.0 PBS 缓冲液置于烧杯中, 加入 280 μL 愈创木酚, 加热溶解完全, 冷却至室温后加 30% 过氧化氢 190 μL 混匀, 制成反应液。取 3 mL 反应液加入 0.5 mL 粗酶液, 37 °C 温育 30 min, 于 470 nm 波长下测定 OD 值。以 37 °C 条件下, 每毫克组织蛋白每分钟催化产物生成 1 μg 的底物酶量为一个酶活单位。

SOD 酶活测定采用 NBT (氯化硝基四氮唑兰) 光还原法^[4]。吸取 2.4 mL 50 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液, 加入 0.2 mL 195 mmol/L 硫氨酸, 0.1 mL 3 μmol/L EDTA, 0.2 mL 1.125 mmol/L NBT, 0.1 mL 核黄素 60 μmol/L, 最后加入 0.1 mL 粗酶液。加完 1 号管避光, 其他管置于 4000 Lx 日光灯下 25 °C 准确反应 10 min, 反应结束后所有管用黑布遮盖以终止反应, 避光管为对照, 在波长 560 nm 测定 OD 值。以每毫克蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位。

CAT 活性测定: 配制 0.3% H₂O₂ 溶液作为底物溶液: 吸 5 mL 30% H₂O₂, 用 0.05 mol/L pH 7.0 PBS 定容到 500 mL。反应体系包含 1 mL 0.3% H₂O₂ 溶液、1.9 mL H₂O、0.1 mL 酶液, 测定 OD_{240 nm} 降低速度。将每毫克蛋白每分钟 OD 减少 0.01 定义为 1 个活力单位。

1.3.6 RT-PCR

将黄曲霉菌接种在含有 50 mL 沙氏液体培养基的三角瓶中, 加入槲皮素, 使其终浓度达到 100 μg/mL, 放入 28 °C 的摇床中, 120 r/min 摇动培养。分别在 48 h (产毒前期), 72 h (产毒初期), 以及 96 h (产毒中后期) 取样。通过 2 层纱布过滤除掉培养基, 将获得的菌丝放入液氮中速冻备用。

菌丝体 RNA 采用试剂盒方法提取 (Qiagen, Inc., Valencia, CA, RNeasy plant mini kit); 用 LAMDA-25 紫外可见分光光度计测定 260 和 280 nm 的吸收值, 由 260 nm 吸收值计算 RNA 含量^[15], 由 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 得知总 RNA 纯度; 取等量 RNA 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 检查 RNA 的完整性。将提取的菌丝总 RNA 用 “First Strand cDNA Synthesis Kit” (TOYOBO, Japan) 进行第一链 cDNA 的合成; 引物序列和退火温

度参照表 1。

表 1 黄曲霉产毒相关基因的引物和退火温度

Table 1 Primer design and annealing temperature

基因	引物序列	温度 Tm/°C
yap	Forward 5'-TGCAACCTCTCTACAAGCCG-3'	49
	Reverse 5'-CCGAAGTCTCGAGAAAGAGCC-3'	
afIK	Forward 5'-GAACTGCTTCAGTTGCCGTG-3'	49
	Reverse 5'-ACGAGGGTTTCGTTTCTGGAC-3'	
afID	Forward 5'-TCCAGGCACACATGATGGTC-3'	49
	Reverse 5'-TGTGGATAACGAAGTGCCCC-3'	
afIQ	Forward 5'-TTAAGGCAGCGGAATACAAG-3'	58
	Reverse 5'-GACGCCCAAAGCCGAACACAAA-3'	
afIR	Forward 5'-GCACCTGTCTTCCCTAACA-3'	57
	Reverse 5'-ACGACCATGCTCAGCAAGTA-3'	
afIS	Forward 5'-GGAATGGGATGGAGATG-3'	46
	Reverse 5'-GGAATATGGCTGTAGGAAG-3'	
18S rDNA	Forward 5'-ATGGCCGTTCTTAGTTGGTG-3'	55
	Reverse 5'-GTACAAAGGGCAGGGACGTA-3'	

1.4 数据分析

运用 SPSS 12.0 数据处理系统, 采用 Duncan's 新复极差法 (DMRT) 进行显著性分析。所有图表数据的结果都是三次实验数据的平均值±SD。

2 结果与分析

2.1 槲皮素对黄曲霉菌丝生长和毒素产生的抑制

表 2 茶多酚对黄曲霉生长和黄曲霉毒素产生的影响

Table 2 Effects of some tea polyphenols on the growth and aflatoxin production of *A. flavus*

茶多酚	抑菌/(MIC, μg/mL)	抑毒/(MIC, μg/mL)
TP	>1000	800
CG	>1000	1000
Gallic acid	>1000	800
Quercetin	800	100
ECG	>1000	800
EGCG	>1000	>1000
EGC	>1000	400
C	>1000	1000
EC	>1000	>1000
GCG	>1000	>1000
GC	>1000	1000

各种茶多酚单体和茶多酚混合物均表现出了对黄曲霉毒素的抑制作用，但是能够在低于 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 完全抑制黄曲霉毒素产生的茶多酚单体只有 GC、C、ECG、EGC 和槲皮素（表 2）。其中槲皮素的活性最强，在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时就能完全抑制黄曲霉毒素产生。而且槲皮素是唯一能够在低于 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 完全抑制黄曲霉生长的茶多酚单体（表 2）。

2.2 槲皮素处理缓解黄曲霉菌丝内氧化胁迫

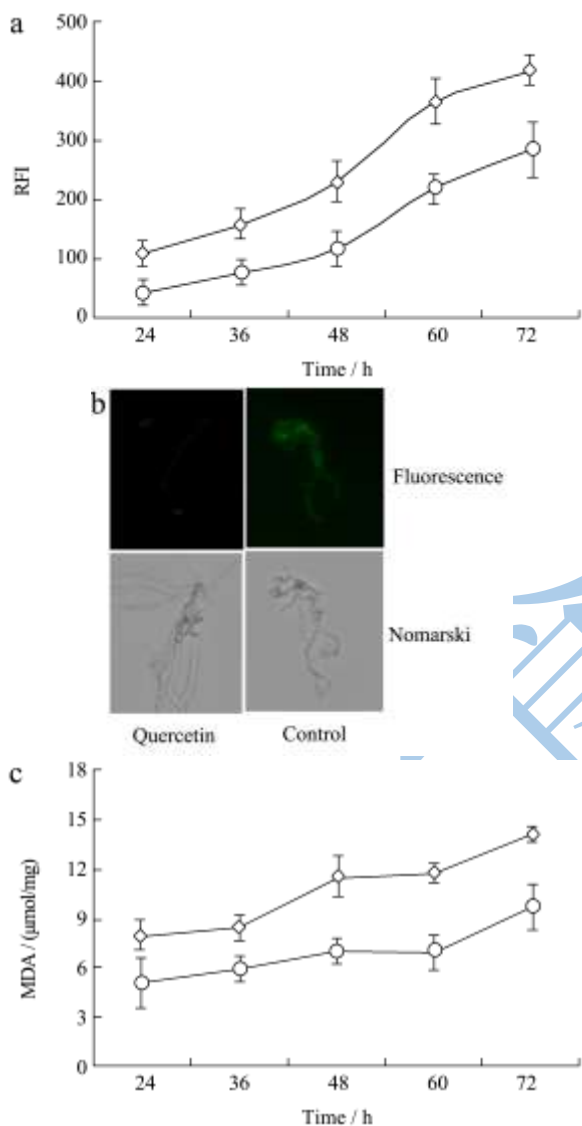


图 2 槲皮素对黄曲霉体内氧化水平的影响

Fig.2 Effects of quercetin on the oxidant/antioxidant equilibrium in *A. flavus*

Note: A: Effects of quercetin on the ROS levels in *A. flavus*. RFI: related fluorescence intensity in *A. flavus*; B: Mycelia with the treatment of quercetin for 48 h stained by carboxy-H2DCFDA under microscope TE2000-S, Nikon. C: Effects of quercetin on the MDA content in *A. flavus*. \diamond , the control; \circ , the

treatment with quercetin.

黄曲霉菌丝内氧化还原平衡状态被证实与产毒密切相关^[6]。槲皮素本身具有抗氧化活性，因此槲皮素可能会对黄曲霉菌丝的氧化胁迫水平产生影响。试验结果表明槲皮素处理导致黄曲霉菌丝内 ROS 水平普遍低于对照（图 2a、b），在处理 24 h 后仅为对照的 38.72%，到处理后 72 h 时，达到对照的 68.23%，明显缓解了黄曲霉菌丝内氧化胁迫。MDA 含量分析结果表现出了相同的趋势：槲皮素处理导致 MDA 水平下降，在处理 24 h 后达到对照的 63.83%，到处理后 72 h 时，达到对照的 68.98%（图 2c）；这表明槲皮素可以缓解黄曲霉菌丝脂质过氧化。

2.3 槲皮素激发了黄曲霉体内抗氧化系统

Yap1 是抗氧化系统的转录因子，能够启动抗氧化系统的转录。RT-PCR 结果显示 Yap1 在产毒前期就被激活，转录水平大幅提升，而且在整个产毒过程一直处于较高的表达水平（图 3a、b）。进一步的抗氧化酶活性检测结果确定了黄曲霉在槲皮素作用下抗氧化系统的激活，POD、CAT、SOD 都得到了显著的提高（图 4）。通过计算得出槲皮素处理导致黄曲霉菌丝 POD 活性增加了 2.13 倍，CAT 活性增加了 1.76 倍以上，SOD 活性增加了 84.24%。

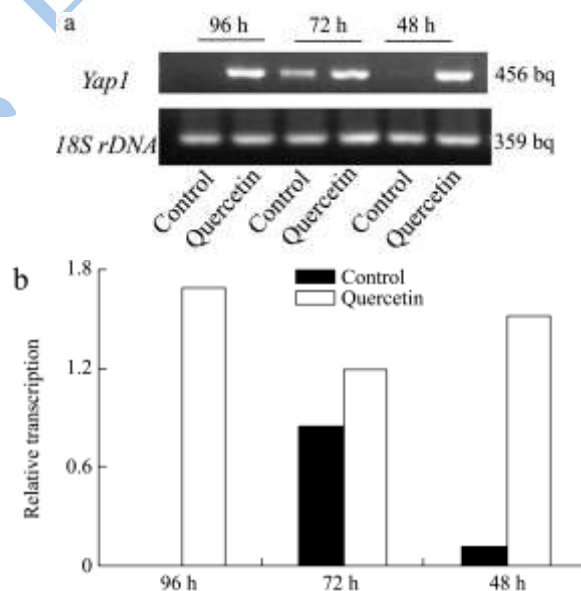


图 3 槲皮素对 Yap1 转录水平的影响

Fig.3 Effects of quercetin on the transcription of Yap1

Note: A: The PCR products in the agarose gel were under the ultraviolet light after electrophoresis, and their sizes were shown at the right; B: the relative Yap1 transcription normalized on 18S rRNA level were reported.

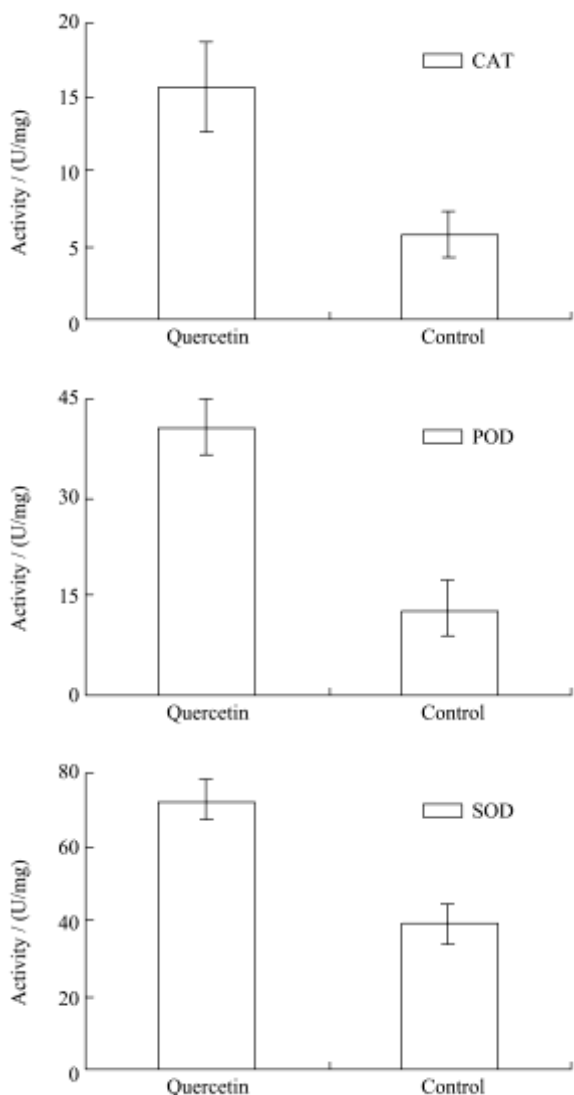


图4 槲皮素处理 48h 对抗氧化酶 CAT、POD 和 SOD 酶活的影响

Fig.4 Effects of quercetin treatment for 48h on the activities of CAT, POD and SOD

2.4 槲皮素抑制产毒相关基因的表达

黄曲霉产毒相关基因成簇存在于基因组内,其中 *AflR* 和 *AflS* 是调控基因。为了深入了解槲皮素对毒素产生抑制的机制,我们选择了部分跟产毒相关的基因,并对它们的转录状况进行了检测。这些基因涵盖了黄曲霉毒素合成相关基因簇的上、中、下游^[17]。RT-PCR 结果显示无论是调控基因还是结构基因在槲皮素存在的条件下转录水平都发生了下调,但是下调程度各不相同(图 5a、b)。总的来说槲皮素对调控基因 *aflR* 和 *aflS* 的下调程度弱于对合成基因的下调程度;尤其 *aflK* 的转录对槲皮素处理的响应最明显(图 5b)。这些结果暗示槲皮素可能通过下调调控基因来影响合成基因的转录,因为槲皮素的调控信号在

这个过程发生了放大现象。

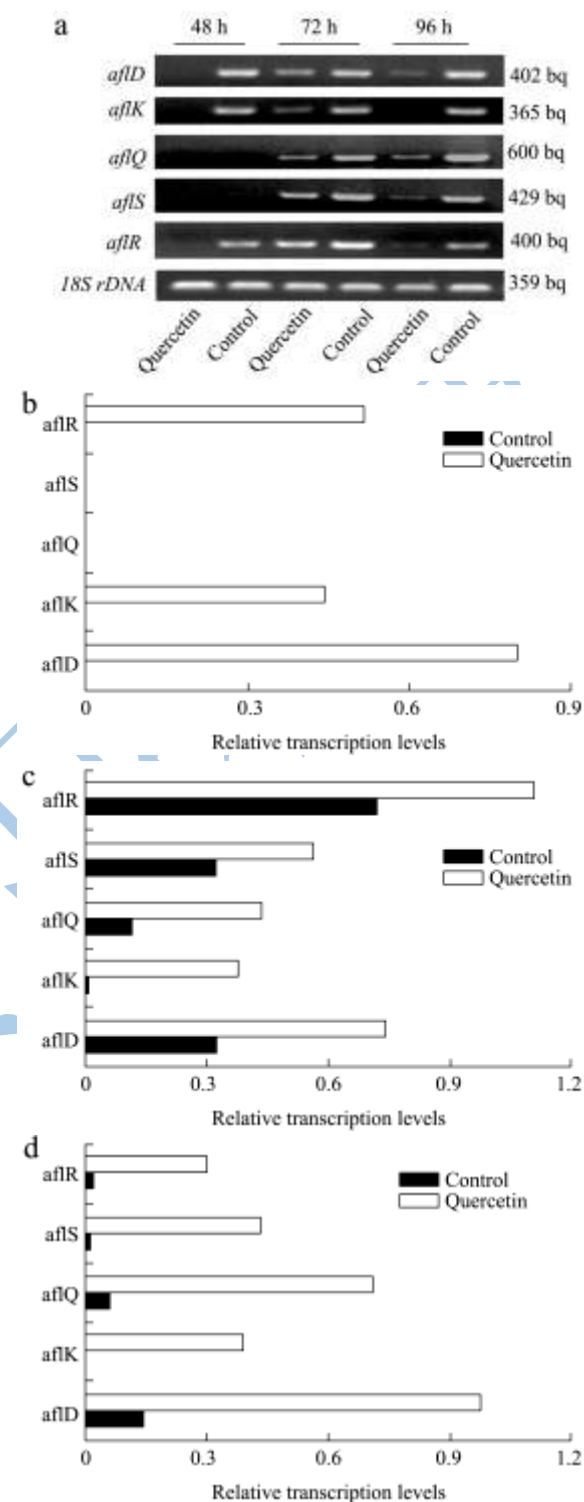


图5 槲皮素对产毒相关基因转录的影响

Fig.5 The transcription levels of some genes associated with aflatoxin biosynthesis in *A. flavus* with quercetin exposure

Note: a: The PCR products in the agarose gel were under the ultraviolet light after electrophoresis, and their sizes were shown at the right; b, c, d: the relative *aflR*, *aflS*, *aflQ*, *aflK* and *aflD* transcription normalized on 18S rRNA level were reported;

b: 48 h, c: 72 h, d: 96 h.

3 讨论

据联合国粮农组织 (FAO) 估计, 每年全世界平均有 2% 的粮食由于霉变而不能使用, 由黄曲霉毒素污染所造成的损失可达数千亿美元。黄曲霉毒素的合成调控网络非常复杂, 至少 25 个基因参与了黄曲霉毒素的合成调控^[6]。目前已发现的黄曲霉毒素抑制剂主要包含生物碱、抗生素、双黄酮、钙离子阻断剂、香豆素类、黄酮类、氧肟酸、氧类脂、多烯不饱和脂肪酸、萜类化合物、某些挥发组分等^[7], 但是关于它们的作用机制目前研究较少。

黄曲霉体内的氧化还原状态被证实与产毒密切相关^[17]。槲皮素具有良好的抗氧化能力^[9], 我们的研究结果证实, 槲皮素处理能够缓解黄曲霉菌的氧化胁迫状态。但是槲皮素在各种茶多酚中不是抗氧化能力最强大的, 其抑制毒素产生的能力却最强。因此, 除了自身的抗氧化能力, 应该还有其他机制的参与。我们的研究表明, 槲皮素能够激活抗氧化系统转录因子 Yap1, 导致黄曲霉体内的抗氧化酶活性增加, 这种诱导机制很可能是槲皮素抑制 AFB₁ 产生的关键因素。

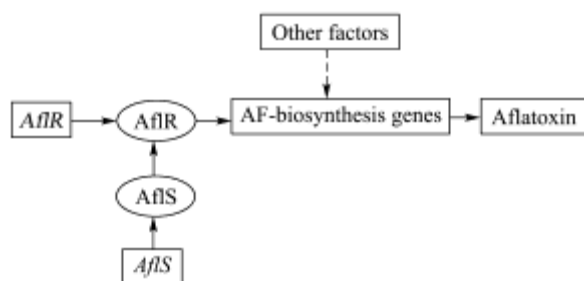


图 6 AfIR 和 AfIS 调控黄曲霉毒素合成的途径

Fig.6 AfIR and afIS are involved in signaling pathways regulating aflatoxin biosynthesis^[18]

氧化还原平衡参与毒素产生调控主要是通过调控黄曲霉毒素调控基因 AfIR 来实现的^[17]。我们的研究发现槲皮素既能下调 AfIR 的表达, 又能下调 AfIS 的表达。而 AfIS 能够通过结合 AfIR 调控产毒基因的表达 (图 6)。因此抑制 AfIR 的作用很可能是槲皮素抑制 AFB₁ 产生的核心分子机制, 这种机制也与其激活抗氧化系统缓解菌体内氧化胁迫的作用相对应。在 AfIR 下调的情况下, 产毒基因的表达会受到抑制。因此槲皮素处理的菌丝的产毒基因全面下调。

4 结论

槲皮素处理能够缓解黄曲霉菌的氧化胁迫状态, 激活抗氧化系统转录因子 Yap1, 下调黄曲霉调控基因

的表达, 最终抑制了黄曲霉毒素的产生。因此槲皮素含量可以作为茶叶遭受黄曲霉毒素污染风险评估的重要参数, 同时由于其本身的安全性和功能性, 可以作为抗毒剂应用于食品行业中黄曲霉毒素污染控制。

参考文献

- [1] Piekkola S, Tumer P C, Aadel-Hamid M, et al. Characterisation of aflatoxin and deoxynivalenol exposure among pregnant Egyptian women [J]. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 2012, 29(6): 962-971
- [2] Calvo A M, Wilson R A, Bok J W, et al. Relationship between secondary metabolism and fungal development [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 447-459
- [3] 汪小舟, 祝阳. 黄曲霉毒素的毒害及防除 [J]. 现代食品科技, 2005, 21(2): 223-224
WANG Xiao-zhou, ZHU Yang. Hazard of aflatoxin and prevention and detoxification of food and feed contaminated by aflatoxin [J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(2): 223-224
- [4] Chiang C T, Weng M S, Lin-Shiau S Y, et al. Pu-erh tea supplementation suppresses fatty acid synthase expression in the rat liver through downregulating Akt and JNK signalings as demonstrated in human hepatoma HepG2 cells [J]. Oncology Research, 2006, 16(3): 119-128
- [5] Kuo K L, Weng M S, Chiang C T, et al. Comparative studies on the hypolipidemic and growth suppressive effects of oolong, black, pu-erh, and green tea leaves in rats [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(2): 480-489
- [6] Chirumbolo S. Quercetin in cancer prevention and therapy [J]. Integrative Cancer Therapies, 2013, 12(2): 97-102
- [7] Holmes R A, Boston R S, Payne G A. Diverse inhibitors of aflatoxin biosynthesis [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(4): 559-572
- [8] Mo H Z, Zhang H, Wu Q H, et al. Inhibitory effects of tea extract on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [J]. Letters in applied microbiology, 2013, 56(6): 462-466
- [9] Shen Y, Ward N C, Hodgson J M, et al. Dietary quercetin attenuates oxidant-induced endothelial dysfunction and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a high-fat diet: A critical role for heme oxygenase-1 [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2013, 65: 908-915
- [10] Zhang L, Liu Y J, Gao K J, et al. Decreasing pro-inflammatory cytokine and reversing the

- immunosenesence with extracts of Pu-erh tea in senescence accelerated mouse (SAM) [J]. Food Chemistry, 2012, 135(4): 2222-2228
- [11] 王静波,赵江林,彭曦心,等.苦荞芽中黄酮类化合物含量及其抗氧化性的研究[J].现代食品科技,2013,29(5):965-968
WANG Jing-bo, ZHAO Jiang-lin, PENG Lian-xin, et al. Development on flavonoids and antioxidant activity of tartary buckwheat sprout [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(5): 965-968
- [12] Wang D, Meng J, Xu K, et al. Evaluation of oral subchronic toxicity of Pu-erh green tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) extract in Sprague Dawley rats [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 142(3): 836-844
- [13] Wang H, Helliwell K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography [J]. Food Research International, 2001, 34(2): 223-227
- [14] Xue YF, Liu L, Liu ZP, et al. Protective role of Ca against NaCl toxicity in Jerusalem artichoke by up-regulation of antioxidant enzymes [J]. Pedosphere, 2008, 18(6): 766-774
- [15] 陈惠萍,徐朗莱.壳聚糖调节不结球白菜叶片 GDH 和 GS 基因的差异表达研究[J].西北植物学报, 2006, 26(3): 507-511
CHEN Hui-ping, XU Liang-lai. Chitosan regulation to differentiated expression of GDHmRNA and GS mRNA in the leaves of no-heading Chinese cabbage [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(3): 507-511
- [16] Cleveland T E, Yu J, Fedorova N, et al. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology [J]. Trends in Biotechnology, 2009, 27(3): 151-157
- [17] Rrverberi M, Zjalic S, Ricelli A, et al. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the *ApyapA* gene [J]. Eukaryot Cell, 2008, 7(6): 988-1000
- [18] Geoglanna D R, Payne G A. Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: from gene to genome [J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(2): 113-125