

苦丁茶叶制虫茶粗多酚的抗氧化、抗突变和体外抗肝癌效果

赵欣, 王强

(重庆第二师范学院生物与化学工程系, 重庆 400067)

摘要: 本实验对苦丁茶叶制虫茶粗多酚(KMICP)的抗氧化、抗突变效果和对人肝癌 SMMC-7721 细胞体外抗癌效果进行了观察。25、50、75 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度 KMICP 处理下, 对 DPPH 自由基的清除能力分别为 27.8%、46.6%、85.9% 和 99.8%。1.25 和 2.5 mg/plate 浓度的 KMICP 对 MNNG (N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍) 诱发突变表现出的 49.5% 和 78.1% 的抗突变能力, 对 AFB₁ (黄曲霉毒素 B₁) 诱发突变的抑制效果也达到 54.8% 和 76.4%。KMICP 对体外生长的 SMMC-7721 细胞也表现出了明显的抑制作用, 浓度达到 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 癌细胞的生长被完全抑制。通过 RT-PCR 检验可以观察到 KMICP 处理 SMMC-7721 细胞后, 癌细胞的 Bax、I κ B- α 、TIMP-1 和 TIMP-2 表达上升, Bcl-2 和 NF- κ B 表达下降, 且高浓度的 KMICP 较低浓度对基因表达的影响更为明显。这些实验结果充分的说明了 KMICP 具有很好的体外抗氧化、抗突变和抗癌效果。

关键词: 虫茶; 苦丁茶; 多酚; 抗突变; 抗癌

文章编号: 1673-9078(2015)3-24-28

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.3.005

Antioxidant, Antimutagenic and *in vitro* Anticancer Effects of Crude Polyphenols in Insect Tea Made from Kuding Tea Leaves

ZHAO Xin, WANG Qiang

(Department of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

Abstract: In this study, the antioxidant, antimutagenic and *in vitro* anticancer effects of crude polyphenols in insect tea made from Kuding tea leaves (KMICP) on human hepatoma cells SMMC-7721 were investigated. The DPPH radical scavenging activity after treatment using 25, 50, 75, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KMICP was 27.8%, 46.6%, 85.9%, and 99.8%, respectively. KMICP at concentrations of 1.25 and 2.5 mg/plate showed antimutagenic effects on N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced mutation (49.5% and 78.1%, respectively) and aflatoxin B₁ (AFB₁)-induced mutation (54.8% and 76.4%, respectively). KMICP also showed significant inhibitory activity on SMMC-7721 cells *in vitro*, while the growth of cancer cells was completely inhibited at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ concentration. By reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) conducted on KMICP-treated SMMC-7721 cells, it was found that Bax, I κ B- α , TIMP-1, and TIMP-2 gene expression in cancer cells was increased, Bcl-2 and NF- κ B gene expression was decreased, and the effect of high-concentration KMICP was more significant than that of low-concentration KMICP. These results demonstrate that KMICP shows good *in vitro* antioxidant, antimutagenic, and anticancer properties.

Key words: insect tea; Kuding tea; polyphenol; antimutagenicity; anticancer

虫茶是一种制作方法奇特、富有民族特色的特殊特殊的固体冲泡茶饮料, 主要产于我国的贵州、湖南、广西、四川和云南的部分边远地区^[1]。当地人采集野

收稿日期: 2014-07-22

基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目 (KJ1401402), 重庆第二师范学院引进高层次人才科研启动费; 重庆第二师范学院创新团队计划 (KYC-cxtd03-20141002)

作者简介: 赵欣 (1981-), 男, 博士, 教授, 研究方向为食品营养和功能性食品

通讯作者: 王强 (1982-), 男, 副教授, 研究方向为食品营养和功能性食品

生的苦茶叶、化香树叶等多种野生植物的鲜嫩叶, 蒸煮后除去涩味, 自然晒干将叶片分层堆放在木桶里, 每层间均匀的淋上淘米水, 待叶子轻微自然发酵后散发出香气, 香气吸引化香夜蛾等昆虫在叶片中产卵, 孵化出的幼虫取食叶片, 排除虫粪颗粒, 然而选取幼虫的粪颗粒, 去除杂叶再经过暴晒和炒制等工艺生产出虫茶^[2]。苦丁茶是中国南方一种经常饮用的保健茶, 特别是在贵州等省份, 已有研究表明苦丁茶具有多种功效, 包括抗氧化、抗炎和抗癌^[3]。苦丁茶中含有丰富的多酚物质, 多酚物质有很强的清除自由基能力, 能够通过阻断脂质过氧化而达到增强体内酶活性, 从

而起到抗突变、抗癌症效果^[4], 经研究表明苦丁茶中的多酚物质在其功能性作用中发挥了很重要的作用^[5]。近年来有研究发现虫茶含有多种功能性成分, 包括多酚物质、矿物质元素和多种氨基酸, 其中多酚类物质的含量接近 10%^[6]。这些研究表明苦丁茶作为原料通过昆虫的代谢作用产生的虫茶仍然保留了很高含量的多酚类物质, 虫茶的抗癌功效也可能与其高含量的多酚物质有关, 但是关于虫茶多酚物质的组成缺乏相关的研究。

在我国肝癌是一种高发的恶性疾病, 肿瘤生长和转移十分迅速, 治疗十分困难, 造成患者死亡难以治愈, 死亡率高。现阶段对肝癌的控制最有效的手段是早期发现、早期诊断和早期治疗, 可见预防在肝癌处理中的有着十分重要的地位。除了现代西医的治疗方法外, 中医主张提高人体免疫力来预防和协助治疗癌症, 茶多酚已经被证明具有这些功效^[4], 针对普通人群可以通过饮茶来预防肝癌, 针对肝癌患者也可以通过摄取茶叶中的多酚类物质协助西医的手术和化疗等治疗手段。本研究对贵州地区以苦丁茶为原料制作的虫茶中提取的粗多酚物质进行了体外实验, 包括抗氧化、抗突变和抗癌基础研究, 这些研究将为进一步了解虫茶的功能性作用积累科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

虫茶: 贵州产原料叶为苦丁茶的虫茶, 冷冻干燥后粉碎。按文献方法^[5], 称取 50 g 冷冻干燥后的虫茶, 加入 50 mL 乙醇体积比为 45% 的乙醇溶液, 在 90 °C 水浴下浸提 30 min 一次, 在用相同方式浸提 2 次, 合并 3 次浸提液后过滤后的滤液调节 pH 值到 6, 加入沉淀剂(10 g AlCl₃ 和 20 g ZnCl₂ 溶于 270 mL 水中) 80 mL 沉淀后, 3000 r/min 离心分离 10 min, 弃去上清液, 在沉淀中加入 100 mL 的 12% 盐酸, 得上清液。在上清液中分两次分别加入 100 mL 乙酸乙酯萃取 2 次, 合并萃取液后旋转蒸发得到苦丁茶叶制虫茶粗多酚(KMICP)干物质。

1.2 癌细胞株

人肝癌 SMMC-7721 细胞购自于美国典型微生物菌种保藏中心(ATCC)。

1.3 试剂

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼)、MNNG (N-甲基-N'-硝基-亚硝基

胍)、AFB₁ (黄曲霉毒素 B₁)、RPMI-1640 细胞培养液、胎牛血清和 MTT[3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐], DMSO(二甲亚砜), 美国 Sigma 公司; CycleTEST™ PLUS DNA 染色试剂盒, 德国 Becton Dickinson 公司; Trizol 试剂、oligo dT₁₈、RNase、dNTP 和 MLV, 美国 Invitrogen 公司; RT-PCR (反转录聚合酶链式反应)引物 Bax、Bcl-2、NF-κB、IκB-α、TIMP-1 和 TIMP-2, 德国 Eppendorf 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器与设备

EYELA N-1001S 旋转蒸发器, 东京理化器械株式会社, UV-1750 型紫外分光光度计, 日本岛津公司; Thermo 3110 二氧化碳细胞培养箱, 美国 Thermo 公司; Combi-514R 冷冻离心机, 韩国 Hanil 株式会社; Bio-Rad 680 酶标仪、Bio-Rad 小型水平电泳槽, 美国 Bio-Rad 公司; ABI 2720 PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司。

1.5 方法

1.5.1 DPPH 法测定粗茶多酚的氧化效果

利用 DPPH 试剂测定苦丁茶叶制虫茶粗多酚(KMICP)的抗氧化效果, 将 100 μL 浓度为 25、50、75 和 100 μg/mL 的 KMICP 溶液和 100 μL 以甲醇为溶剂的 0.15 mmol/L 的 DPPH 自由基溶液混匀后室温下避光放置 30 min 后用分光光度计在 517 nm 波长下测定光度值。通过 OD 值计算出 KMICP 清除 DPPH 自由基能力(%)=[(对照值-对照空白值)-(样品值-样品空白值)]×100/(对照值-对照空白值), 其中对照组为 100 μL 的 DPPH 溶液和 100 μL 甲醇的混合液, 空白组以 100 μL 甲醇代替 DPPH 溶液和 KMICP 溶液^[7]。

1.5.2 Ames 法测定粗茶多酚的抗突变效果

采用 TA100 鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸营养缺陷型菌株进行回复突变实验, 对照组试管加入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液或 S9 混合液、0.1 mL 浓度为 10⁹ 个/mL 的 TA100 菌培养液和 50 μL MNNG 或 AFB₁ 致突变物; 自发回变组除不加入致突变物外其他与对照组相同; KMICP 组除加入对照组相同试剂外还按浓度 1.25 mg/皿和 2.5 mg/皿组加入 KMICP 溶液。实验液混合振荡后在 37 °C 下进行培养 30 min 加入 2 mL 的顶层培养基充分混匀后, 倒平板在底层培养基上后在 37 °C 下培养 48 h, 然后通过数菌落计算细胞生长抑制率=[(对照组菌落数-样品处理组菌落数)/(对照组菌落数-自发回变组菌落数)]×100%^[7]。

1.5.3 MTT 法测定粗茶多酚对人肝癌细胞生

长抑制率

在 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 细胞培养基培养人肝癌 SMMC-7721 细胞, 每 2 d 更换一次培养基。实验开始后调整癌细胞浓度为 1×10⁵ 个/mL, 按每孔 100 μL 加入细胞悬液于 96 孔板中培养 24 h, 细胞贴壁后弃去孔内培养液, 再在孔中加入含从 0 到 200 μg/mL 浓度 KMICP 的培养液 100 μL 继续培养 48 h 后弃去孔内培养液, 然后加入 100 μL 含 0.5 mg/mL 的 MTT 试剂的培养液后置于细胞培养箱放置 4 h。最后再次弃去孔内培养液, 在孔中加入 100 μL 的 DMSO 后室温避光放置 30 min, 然后在 540 nm 处测定 OD 值, 通过计算 OD 值得到细胞生长抑制率=[(OD_{样品}-OD_{对照})/OD_{对照}]×100%^[1]。

1.5.4 RT-PCR 法检测粗茶多酚对人肝癌细胞基因表达的影响

将人肝癌 SMMC-7721 细胞接种于直径为 10 cm 细胞培养皿中, 按细胞生长抑制实验的方法进行细胞培养和样品处理后用 RNAzol 试剂提取样品处理后 SMMC-7721 细胞的总 RNA。将提取的总 RNA 浓度调整至 1 μg/μL。取 2 μL 的 RNA 提取液分别加入 oligodT₁₈, RNase, dNTP 和 MLV 酶各 1 μL, 5×buffer 10 μL, 在 37 °C 120 min, 99 °C 4 min, 4 °C 3 min 的条件下合成 cDNA。然后以反转录-聚合酶链反应法扩增 Bax、Bcl-2、NF-κB、IκB-α、TIMP-1 和 TIMP-2 表达, 同时以持家基因 GAPDH 作为对照内参照。最后以含浓度溴化乙锭的 1% 琼脂电泳检查 PCR 扩增产物^[1]。

1.5.5 数据分析

对实验进行重复实验 3 次, 得到的结果以平均值±标准偏差表示后使用 SAS 统计软件对所得数据采用 one-way ANOVA 法分析数据结果在 p<0.05 水平上是否具有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 苦丁茶叶制虫茶粗多酚的体外抗氧化效果

通过测定 KMICP 的 DPPH 自由基清除能力可以初步判断 KMICP 的抗氧化活性。通过图 1 可知, 25、50、75 和 100 μg/mL 四个浓度处理下, KMICP 均能表现出对 DPPH 自由基的清除能力, 分别为 27.8%, 46.6%、85.9% 和 99.8%, 且随着 KMICP 浓度升高, 自由基清除能力显著提高 (p<0.05), 可见 KMICP

具有很强的抗氧化效果。DNA、蛋白质和脂质发生氧化损伤可导致多种疾病, 特别是 DNA 的氧化损伤是人体组织发生癌变的主要原因之一, DPPH 法已经被广泛地应用于检测食品和植物提取物的体外抗氧化能力, 以判断其潜在的人体内抗氧化效果^[7]。

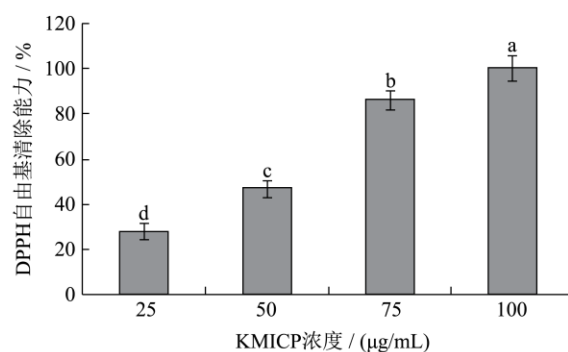


图 1 苦丁茶叶制虫茶粗多酚 (KMICP) 的 DPPH 自由基清除能力
Fig.1 DPPH radical-scavenging activity of crude polyphenols of insect tea made from Kudung tea leaves (KMICP)

注: ^{a-d}不同字母表示各组间差异显著 (p<0.05), 相同字母表示各组间差异不显著 (p>0.05), 同表 1, 图 2。

2.2 苦丁茶叶制虫茶粗多酚的体外抗突变效果

通过 Ames 突变抑制实验可以看出 KMICP 对 MNNG 和 AFB₁ 诱导 TA100 突变有较强的抑制作用。浓度 1.25 mg/皿的 KMICP 对 MNNG 和 AFB₁ 诱导 TA100 突变抑制率达到 49.5% 和 54.8% (表 1)。当 KMICP 浓度达到 2.5 mg/皿时, 抑制率显著提高, 对 MNNG 诱导突变的抑制率达 78.1%, 对 AFB₁ 诱导突变也达到 76.4% 的抑制率 (p<0.05)。通常认为人体内的正常细胞发生突变会引发癌变, 通过阻断和抑制正常细胞的突变可以达到预防和治疗癌症的效果, 有研究表明 MNNG 和 AFB₁ 作为强力化学诱变剂和致癌剂均可以诱发癌症, 通过检验食品中功能性成分对这两种诱导剂对 TA100 菌突变诱导的抑制可以观察功能性成分对致癌突变的抑制作用^[8]。体外抗突变实验表明 KMICP 有较强的抗突变能力, 说明其可能具有潜在的抑制癌症的功效。

2.3 苦丁茶叶制虫茶粗多酚对肝癌细胞的体外增殖抑制效果

MTT 法可用于检测食品中功能性成分对癌细胞体外增殖效果, 可用于初步判断其抗癌效果^[9]。实验结果表明 0 到 100 μg/mL 浓度 KMICP 可以使人肝癌

SMMC-7721 细胞的体外生长受到明显抑制, 当浓度超过 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后 SMMC-7721 细胞在体外的生长已经大幅度降低, 浓度达到 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后, 癌细胞的生长被完全抑制, KMICP 对 SMMC-7721 细胞的抑制率

达到 100% (图 2), 所以在本研究中选择 25、50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 这三个浓度继续进行 KMICP 对癌细胞相关基因表达影响的测定。

表 1 苦丁茶叶制虫茶粗多酚 (KMICP) 在致突变物 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍 (MNNG, 0.4 $\mu\text{g}/\text{皿}$) 和黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁, 0.4 $\mu\text{g}/\text{皿}$) 诱导 TA100 菌株下抗突变效果

Table 1 Inhibitory activity of KMICP against N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (0.4 $\mu\text{g}/\text{disc}$) and AFB₁-induced mutations (0.4 $\mu\text{g}/\text{disc}$) of nutrient-deficient *Salmonella* Typhimurium strain TA100

组别	浓度 / (mg/皿)	TA100		TA100+S9	
		MNNG, 0.4 $\mu\text{g}/\text{皿}$		AFB ₁ , 0.4 $\mu\text{g}/\text{皿}$	
		均值±标准偏差	突变抑制率/%	均值±标准偏差	突变抑制率/%
对照	/	1056±104 ^a	/	1108±126 ^a	/
自发回变	/	59±10 ^d	/	55±8 ^d	/
KMICP	1.25	562±45 ^b	49.5	531±40 ^b	54.8
	2.5	277±34 ^c	78.1	303±28 ^c	76.4

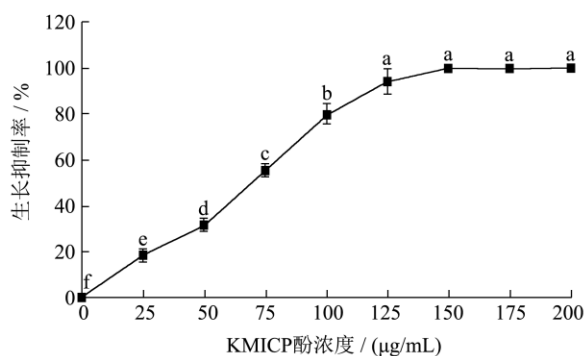


图 2 苦丁茶叶制虫茶粗多酚 (KMICP) 对 SMMC-7721 细胞的体外生长抑制效果

Fig.2 *In vitro* inhibitory effect of KMICP on SMMC-7721 cells

2.4 苦丁茶叶制虫茶粗多酚对肝癌细胞 Bax 和 Bcl-2 基因表达的影响

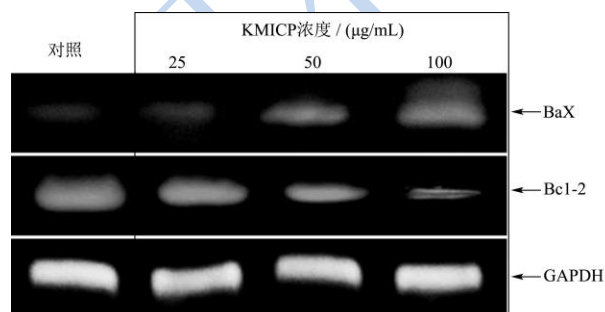


图 3 苦丁茶叶制虫茶粗多酚 (KMICP) 对 SMMC-7721 细胞 Bax 和 Bcl-2 基因表达的影响

Fig.3 Effect of KMICP on the gene expression of Bax and Bcl-2 in SMMC-7721 cells

在癌细胞凋亡过程中 Bax 和 Bcl-2 是主要的基因表达, Bcl-2 作为原癌基因可与促凋亡基因 Bax 形成

二聚体, 当 Bax 的含量高于 Bcl-2 时, Bax 同聚体的含量升高, 从而促使癌细胞凋亡, 促进癌细胞死亡^[3]。SMMC-7721 细胞经 KMICP 处理后除了在生长率发生显著变化外, 癌细胞的基因表达也发生了一系列变化。癌细胞的 Bax 的 mRNA 表达强度经 KMICP 处理后出现增加, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的 KMICP 处理后表达较 25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理更为强烈, 经 KMICP 处理后癌细胞的 Bcl-2 表达表现出与 Bax 相反的趋势 (图 3)。通过实验结果可以认为 KMICP 可以明显调控癌细胞的凋亡基因, 在一定浓度下使癌细胞出现凋亡, 起到抑制肝癌的作用。

2.5 苦丁茶叶制虫茶粗多酚对肝癌细胞 NF- κ B 和 I κ B- α 基因表达的影响

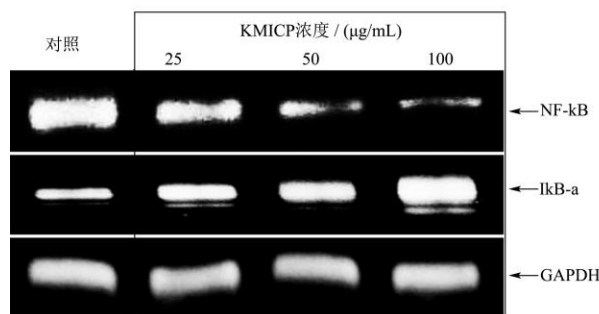


图 4 苦丁茶叶制虫茶粗多酚 (KMICP) 对 SMMC-7721 细胞 NF- κ B 和 I κ B- α 基因表达的影响

Fig.4 Effect of KMICP on the gene expression of NF- κ B and I κ B- α in SMMC-7721 cells

NF- κ B 是一种重要的转录因子, 可以调控多种基因的表达, 并且参与癌细胞的增殖和凋亡等过程^[3]。同时, NF- κ B 被绑定到抑制蛋白 I κ B- α 上, 在一些外

界因子刺激下, I κ B- α 释放出 NF- κ B, 更多的 NF- κ B 有利于癌细胞的生长和增殖^[10]。通过 KMICP 的刺激, 癌细胞中 I κ B- α 的 mRNA 表达增加; NF- κ B 的释放被控制, 表达减弱, 并且随着 KMICP 浓度的增加, 趋势越为明显(图 4)。可见, KMICP 可以通过调控 NF- κ B 和 I κ B- α 的表达强度, 起到控制癌细胞增殖并且可能通过调控其他的基因表达加强促进癌细胞的凋亡。

2.6 苦丁茶叶制虫茶粗多酚对肝癌细胞 TIMP

-1 和 TIMP-2 基因表达的影响

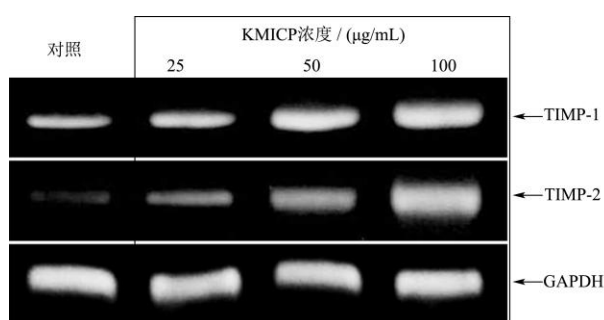


图 5 苦丁茶叶制虫茶粗多酚(KMICP)对 SMMC-7721 细胞 TIMP-1 和 TIMP-2 基因表达的影响

Fig.5 Effect of KMICP on the gene expression of TIMP-1 and TIMP-2 in SMMC-7721 cells

TIMP-1 和 TIMP-2 均是天然蛋白酶抑制剂, 可以影响肿瘤的转移, 调节他们的活性是控制肿瘤转移的有效途径^[11]。有动物实验表明, 当 TIMP-1 的表达强烈时, 小鼠的自发的肝癌转移被明显抑制^[12]。本研究的结果也得出了相似的结果, KMICP 处理过的癌细胞的 TIMP-1 和 TIMP-2 表达较未经任何处理的癌细胞明显升高, 且随着 KMICP 浓度的增大, TIMP-1 和 TIMP-2 表达增加的幅度也增大(图 5)。结合细胞生长抑制率和癌细胞中 Bax、Bcl-2、NF- κ B 和 I κ B- α 表达的测定结果, 可以看出 KMICP 通过调控 TIMP-1 和 TIMP-2 表达增加来抑制癌细胞的转移, 与 KMICP 调控基因以控制生长增殖和促进癌细胞凋亡结合, 对癌细胞进行抑制, 起到预防癌症的作用。

3 结论

本研究通过 DPPH 法, Ames 法和 MTT 法对苦丁茶叶制虫茶粗多酚(KMICP)的体外抗氧化、抗突变和抗肝癌效果进行了实验。实验结果显示, KMICP 对 DPPH 自由基具有很强的清除能力, 对 MNNG 和 AFB₁ 诱导 TA100 菌的突变具有显著的抑制效果, 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的生长也有明显的抑制作

用。经过分子生物学方法利用 RT-PCR 技术进一步观察了 KMICP 对 SMMC-7721 细胞中多种基因的 mRNA 表达有很大的影响。KMICP 可以通过上调 Bax 表达和下调 Bcl-2 表达来促进癌细胞的凋亡; 通过上调 I κ B- α 表达和下调 NF- κ B 表达来抑制癌细胞的增殖生长, 通过上调 TIMP-1 和 TIMP-2 表达来抑制癌细胞的转移, 通过这些途径 KMICP 可能对 SMMC-7721 细胞起到抑制作用, 发挥其对癌症的预防和治疗作用。结合 KMICP 可以通过其抗氧化和抗突变能力, 说明其可以在癌变前对机体的非正常变化起到抑制作用, 维持机体正常, 避免癌变。由此可以看出 KMICP 可以作为天然提取的保健食品功能性成分进一步加以利用。但是本研究仅对 KMICP 的体外效果进行了实验, 同时也缺乏对虫茶多酚物质具体组成与体外抗癌功效的关系进行深入研究, 所以要想深层次的探讨 KMICP 的作用机制和对人体的有效程度, 需要进一步的研究虫茶多酚的具体组成以及进行动物体内实验和临床研究。

参考文献

- [1] 冯霞, 罗敏, 赵欣. 虫茶对癌细胞生长和肿瘤转移抑制作用的研究[J]. 现代食品科技, 2013, 29(8): 1898-1901, 1905
FENG Xia, LUO Min, ZHAO Xin. Inhibitional effect of sandy tea on the carcinoma cells growth and tumor metastasis [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(8): 1898-1901, 1905
- [2] 励建荣, 周李婷. 中国虫茶现状及其研究开发思路[J]. 农产品加工 学刊, 2005, 34(3): 4-7
LI Jian-rong, ZHOU Li-ting. Current situation of Chinese insect tea and way of further research and development [J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2005, 34(3): 4-7
- [3] 刘芳容, 王强, 张静, 等. 苦丁茶对 MCF-7 人乳腺癌细胞的体外抗癌效果[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2013, 33(2): 185-192
LIU Fang-rong, WANG Qiang, ZHANG Jing, et al. In vitro anticancer effect of Ilex kudingcha Tseng in MCF-7 human breast adenocarcinoma cells [J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2013, 33(2): 185-192
- [4] Bhattacharya U, Mukhopadhyay S, Giri A K. Comparative antimutagenic and anticancer activity of three fractions of black tea polyphenols thearubigins [J]. Nutrition and Cancer, 2011, 63(7): 1122-1132
- [5] 童华荣, 高爱红, 袁海波, 等. 女贞苦丁茶挥发性油成分分析[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 53-55

- TONG Hua-rong, GAO Ai-hong, YUAN Hai-bo, et al. Volatile oils of kudingcha from *Ligustrum henryi* and *L. robustum* [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2004, 13(1): 53-55
- [6] 许光明,彭新君,王彩君,等.三叶虫茶中多酚类物质离子沉淀法提取工艺研究[J].湖南中医药大学学报,2007,27(2):46-49
- XU Guang-ming, PENG Xin-jun, WANG Cai-jun, et al. Extraction of polyphenols in *aglossa dimidiata* with ions Al^{3+} and Zn^{2+} sedimentation [J]. Journal of TCM Univ. of Hunan, 2007, 27(2): 46-49
- [7] Zhao X, Wang Q, Li G J, et al. *In vitro* antioxidant, anti-mutagenic, anti-cancer and anti-angiogenic effects of Chinese Bowl tea [J]. Journal of Functional Foods, 2014, 7: 590-598
- [8] Zhao X, Bak S S, Rhee S H, et al. Fermentation period influences on antimutagenic and in vitro anticancer effects of Shuidouchi [J]. Journal of Journal of Cancer Prevention, 2008, 13(1): 40-46
- [9] 宋家乐,李贵节,赵欣.金莲花总黄酮诱导人HT-29结肠癌细胞凋亡机制的研究[J].现代食品科技,2013,30(6):7-12
- SONG Jia-le, LI Gui-jie, ZHAO Xin. Apoptotic mechanism in human HT-29 colon cancer cells induced by total flavones from *Trollius chinensis* Bunge [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 30(6): 7-12
- [10] Sánchez-Pérez I, Benitah S A, Martínez-Gomariz M, et al. Cell stress and MEKK1-mediated c-Jun activation modulate NFkappaB activity and cell viability [J]. Molecular Biology of the Cell, 2002, 13(8): 2933-2945
- [11] Mysliwiec A G, Ornstein D L. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer [J]. Clinical Colorectal Cancer, 2002, 1(4): 208-219
- [12] Krüger A, Fata J E, Khokha R. Altered tumor growth and metastasis of a T-cell lymphoma in Timp-1 transgenic mice [J]. Blood, 1997, 90(5):1993-2000