

# 中草药提取物抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人皮肤细胞凋亡的初步研究

冯冰<sup>1,2</sup>, 赵亚<sup>2</sup>, 方云<sup>1</sup>, 魏少敏<sup>\*1,2</sup>

(1. 江南大学 化学与材料工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 上海家化联合股份有限公司技术中心, 上海 201702)

**摘要:** 建立了过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)诱导人皮肤成纤维细胞损伤及凋亡模型, 并研究几种具有抗氧化作用的复方中草药提取物对细胞损伤及凋亡的影响。采用 MTT、Hoechst 染色及 TUNEL 等方法检测过氧化氢诱导细胞后以及加入中草药提取物后细胞的存活率、细胞形态以及细胞凋亡的状况。实验结果显示: 在浓度为 0.8 mmol/L, 作用时间 6 h, 过氧化氢能诱导人皮肤成纤维细胞损伤和凋亡( $p < 0.05$ ); 而抗氧化类中草药复方提取物等物质能够显著提高过氧化氢诱导的细胞存活率的降低, 并能明显减少凋亡细胞的数量( $p < 0.05$ ), 表明其对过氧化氢导致的细胞损伤和凋亡作用具有一定的抑制和防护作用。

**关键词:** 人皮肤成纤维细胞; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 细胞凋亡; 中草药

中图分类号: R 284.2

文献标志码: A

文章编号: 1673—1689(2012)09—0912—06

## Inhibitory Effect of Chinese Herbs Extracts on Human Dermal Fibroblasts Apoptosis Induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

FENG Bing<sup>1,2</sup>, ZHAO Ya<sup>2</sup>, FANG Yun<sup>1</sup>, WEI Shao-min<sup>\*1,2</sup>

(1. School of Chemical and Material Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122; 2. R&D Center, Shanghai Jahwa United Co.Ltd, Shanghai 201702, China)

**Abstract:** This study aims to establish the cell injury and apoptosis model of human dermal fibroblasts induced by hydrogen peroxide in vitro and investigate the protective effects of several Chinese herbs on hydrogen peroxide-induced oxidative stress injury. The viability of human dermal fibroblasts was measured with MTT chromatometry, then the morphological changes of cells were observed through Hoechst 33342 staining and the apoptotic cells were detected by TUNEL assay. The results showed that normal human dermal fibroblasts were damaged by hydrogen peroxide at a appropriate concentration (0.8 mmol/l) for 6 h. The results also indicated that Chinese herbs increased obviously the cell viability and decreased the apoptosis rate. It was concluded that Chinese herbs could protect human dermal fibroblasts from hydrogen peroxide-induced oxidative stress injury.

**Keywords:** human dermal fibroblast, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apoptosis, Chinese herbs

收稿日期: 2012-02-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(20871059)。

作者简介: 冯冰(1981—), 女, 河北唐山人, 应用化学专业博士研究生, 主要从事化妆品科学方面的研究。E-mail: hbbfb@163.com

\* 通信作者: 魏少敏(1952—), 男, 浙江余姚人, 教授级高工, 博士研究生导师, 主要从事生物医学、化妆品科学方面的研究。

E-mail: weishaomin@jahwa.com.cn

人皮肤成纤维细胞是人皮肤真皮中的主体细胞成分,在皮肤老化过程中扮演着重要的角色。人的皮肤成纤维细胞在氧化损伤等因素下会引起细胞凋亡的发生,造成细胞数量减少,细胞活性的降低,进而使得胶原等细胞外基质合成减少,最后导致真皮层形态和功能发生改变<sup>[1-2]</sup>。在临床上表现为:皮肤干燥粗糙、松弛、弹性降低、皱纹增多等皮肤老化的变化。因此,研究人皮肤成纤维细胞的凋亡对于抗老化类个人防护用品的研发具有重要的意义<sup>[3]</sup>。在造成的皮肤成纤维细胞凋亡的诸多因素中,过度氧化形成的自由基增加是最主要的因素之一。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>虽不是自由基,但它属活性氧类,有高反应性,可促进自由基的生成,引发生物膜的脂质过氧化反应,直接参与细胞凋亡过程<sup>[4-5]</sup>。氧化损伤通过细胞膜和细胞核的损伤导致细胞的凋亡,抗氧化剂可以通过抑制 ROS 而阻抑细胞凋亡。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>也是一种典型的细胞早老剂,有研究表明,较高浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>可诱导染色体异常、基因突变和 DNA 单链断裂<sup>[6]</sup>。因 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>易于获得,且性质相对稳定,所以它已成为研究细胞氧化损伤和凋亡的重要模型<sup>[7-8]</sup>。因此作者以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>来诱导人皮肤成纤维细胞凋亡,并研究几种中草药复方提取物对细胞凋亡的影响,为抗氧化中草药的筛选、开发及应用提供了理论依据,并为皮肤衰老与抗衰老化妆品的研究开发提供了科学资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

DMEM 培养基、小牛血清:Gibco 公司产品;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,MTT(噻唑蓝),DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼),PI(碘化丙啶):Sigma 公司产品;Hoechst 33342 染色试剂盒:碧云天生物技术研究产品;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒:Roche 公司产品。

表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG):纯度 98%,sigma 公司产品;VC、VE:sigma 公司产品;富含黄芪、肉苁蓉及灵芝,黄芪、肉苁蓉及雪莲花,人参、白豆蔻、蔓荆子及桃花的中草药复方提取物 1、2、3:由上海家化技术中心提供(药材粉碎后,加入溶剂提取,过滤收集滤液,将滤液浓缩至适量。加入终提取液总量质量分数 20% 的甘油,以去离子水补至量。生药质量浓度 1 g/mL)。

### 1.2 主要仪器

培养箱 HERAcell 240i:Thermo 公司制造;酶标

仪 Multiskan Mk3:Thermo 公司制造。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 细胞培养** 分离获得新生儿包皮环切术后皮肤成纤维细胞,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养于含体积分数 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,传代培养后的人皮肤成纤维细胞呈圆形,培养 4 h 细胞开始贴壁生长,逐渐变为梭形,24 h 细胞基本贴壁,采用第 3~8 代的细胞进行实验,接种密度为 5×10<sup>4</sup> 个/mL,培养 24 h,细胞融合达到 70%,根据实验目的不同分别定量接种在细胞培养瓶以及 35 mm 培养皿中备用。

**1.3.2 MTT 法检测细胞活力** 用含不同中草药提取物浓度的成纤维细胞生长培养基制成细胞悬液。细胞密度为 5×10<sup>4</sup> 个/mL,接种在 96 孔细胞培养板上,每孔 200 μL(1×10<sup>4</sup> 个/孔)。于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养。实验结束前 4 h,每孔加入 MTT 20 μL,培养 4 h 后弃上清液。然后每孔加入 150 μL 二甲基亚砷(DMSO)振荡 15 min,使结晶充分溶解。置于酶联免疫检测仪上,以波长 570 nm 测定各孔吸光度值。按照下式计算细胞的存活率<sup>[9]</sup>:

细胞存活率 (%)=(对照组 OD 值-给药组 OD 值)/对照组 OD 值×100%

**1.3.3 Hoechst 33342 染色** 按 Hoechst 33342 染色试剂盒说明操作,将成纤维细胞以 1×10<sup>4</sup> 个/mL 的密度接种至孔内预置玻片的 6 孔细胞培养板中过夜,完全贴壁后,分别用不同浓度(0.2,0.4,0.6,0.8,1.0,1.2 mmol/L)的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 预处理细胞。孵育 6 h 后,吸弃培养液,加入 4% 多聚甲醛固定 20 min,弃固定液后用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 3 次,每次 5 min,吸弃后每孔加入 1 mL Hoechst33342 染色液染色 20 min,PBS 漂洗 3 次,用抗荧光淬灭封片剂将盖玻片封盖于载玻片上避光保存,荧光显微镜观察细胞核并拍照。

**1.3.4 TUNEL 染色** 以脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)法检测人皮肤成纤维细胞凋亡。将细胞以密度为 5×10<sup>4</sup> 个/mL 接种于 35 mm 培养皿中,用含质量分数 4% 多聚甲醛的 PBS 于 4 ℃ 固定 25 min,再用体积分数 0.1% Triton-X-100/PBS 液,使细胞通透性增强,加用荧光素 FITC 标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶(TDT)混合液,37 ℃ 孵育 60 min。在荧光、高倍(×100)显微镜下观察,以核呈绿色为阳性结果判定的标准。阴性对照为不加

TDT 液处理的细胞。每皿细胞在上下左右中随机取 5 个视野。

细胞凋亡率=染绿色荧光细胞数/活细胞与染上绿色荧光的凋亡细胞的总和。

**1.3.5 DPPH 自由基清除能力分析** DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 自由基由于苯环的共轭和位阻及硝基的吸电子作用, 是一种稳定的自由基, 其溶液在 517 nm 处有强吸收<sup>[10]</sup>。

样品处理: 样品用蒸馏水稀释, 设立样品管(T)、样品对照管(T<sub>0</sub>)、阳性对照管(C)和阴性对照管(C<sub>0</sub>)。在样品管和样品对照管中各加入 1.0 mL 对应浓度的样品溶液, 阳性对照管和阴性对照管中以稀释溶剂代替。加入 DPPH 乙醇溶液 1 mL(12 mg/dL), 补充蒸馏水至终体积为 4 mL, 混匀。室温下 5 min, 将各反应溶液移入比色皿中, 在 517 nm 处测光密度值(OD)。

DPPH 自由基清除率(抑制率)计算:

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - (T - T_0) / (C - C_0)$$

式中: T 为样品管 OD; T<sub>0</sub> 为样品对照管 OD; C 为阳性对照管 OD; C<sub>0</sub> 为阴性对照管 OD。

#### 1.4 统计学分析

统计软件为 SAS6.0, 结果用均数±标准差表示, 各组总体比较采用单因素方差分析, 组间均数比较采用 t 检验, p<0.05 为统计学差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 及作用时间对人皮肤成纤维细胞存活率的影响

为了确定人皮肤成纤维细胞的半数存活时间及浓度, 分别制备了不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 mmol/L), 经不同处理时间(3, 6, 12, 24 h), 进而利用常规 MTT 法检测了不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时间对人皮肤成纤维细胞活力的影响。结果显示, 细胞的存活率随作用时间及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度的增大而降低, 具有明显的浓度依赖性, 见图 1。当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度 ≥ 1.0 mmol/L 时, 细胞的存活率接近于 0, 细胞基本死亡。根据细胞半数存活率, 确定 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的诱导条件为: 作用时间 6 h, 浓度范围在 0.4~0.8 mmol/L。

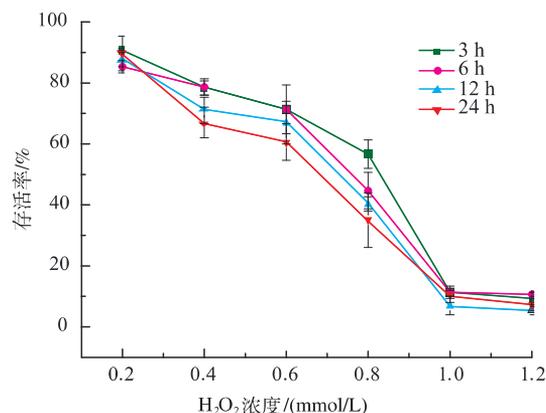
### 2.2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人皮肤成纤维细胞凋亡的形态观察

倒置显微镜下观察, 正常细胞形态呈长梭形<sup>[11]</sup>(图 1 B(a)), 经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的细胞, 细胞表面产生了

许多泡状或芽泡状突起(图 1 B(b)), 这是细胞凋亡过程中形成凋亡小体在外观上的具体表现。用 Hoechst 染色, 荧光显微镜下观察细胞形态: 正常对照组细胞核较大且染色均匀, 呈弥散均匀的蓝色荧光(图 1 B(c)), 凋亡细胞组的细胞核致密浓染, 呈明亮的蓝白色, 比正常细胞要强, 凋亡细胞核内可见浓染致密的颗粒状荧光, 呈现出凋亡细胞典型的核固缩、核碎裂表现, 尤其以 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度为 0.8 mmol/L 时较为明显(图 1 B(d))。

### 2.3 不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对人皮肤成纤维细胞凋亡的影响

用原位末端标记法(TUNEL)在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况, 并半定量测定细胞的凋亡率<sup>[12]</sup>。在荧光显微镜下观察, 正常对照组几乎没有绿色荧光出现, 而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理过的细胞组均可见发绿色荧光的阳性细胞, 核固缩或碎裂, 呈典型的凋亡细胞表现, 并且数量随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度的增大而增加(图 1C), 其中图 1C(a)为没有经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理过正常细胞, 绿色荧光基本没有。图 1C(b~f)显示 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度分别为 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L, 由此可见 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度越大, 凋亡细胞随之增加, 但当浓度达到 1.0 mmol/L 时, 凋亡细胞不再增加, 推断此时细胞多数已经坏死, 故没有被 TUNEL 染色。在 100×高倍镜下, 每组随机选择 5 个不连续视野计数凋亡细胞, 发现凋亡细胞百分比与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 剂量呈正相关 (p<0.05)(图 1D)。TUNEL 是脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法检测人皮肤成纤维细胞凋亡, 对检测细胞凋亡具有特异性, 从而进一步验证了细胞的凋亡。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能自由弥散于生物膜, 可促进自由基的生成, 导致细胞的坏死和凋亡<sup>[4]</sup>。本研究结果也印证了该结论。



A

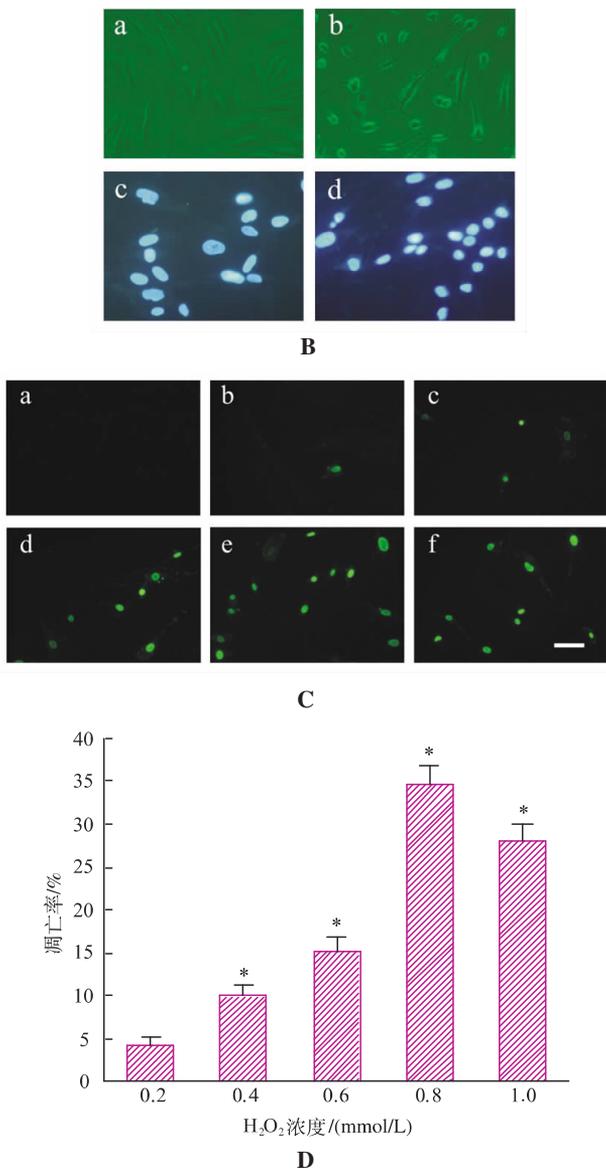


图 1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对培养人皮肤成纤维细胞活力及凋亡的影响

Fig.1 Effect of viability and apoptosis by different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in human dermal fibroblasts

### 2.4 3 种中草药复方提取物对 DPPH 自由基的清除能力

为研究 3 种中草药复方提取物对细胞损伤和凋亡的影响,先用检测 DPPH 自由基的清除能力,以推测其自身的抗氧化性能。图 2 显示中草药提取物对 DPPH 自由基的清除作用,以及具有明确抗氧化作用的 EGCG、VC 及 VE 阳性对照的结果<sup>[13-15]</sup>。可见 EGCG 当质量浓度达到 200 μg/mL 时,对 DPPH 自由基的清除率能够达到 91.42%±2.81%,VC 及 VE 对 DPPH 的清除率分别可以达到 67.44%±2.32%及

69.7%±1.51%。3 种中草药复方提取物的 DPPH 清除率亦可达 36.7%±1.43%,42.87%±2.91%及 40.54%±2.4%。结果提示,3 种中草药复方提取物都有可能具有一定的抗氧化作用。

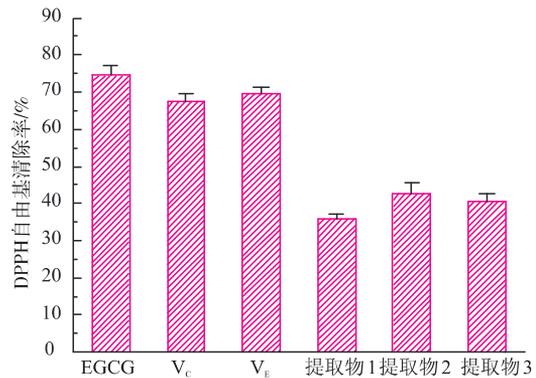


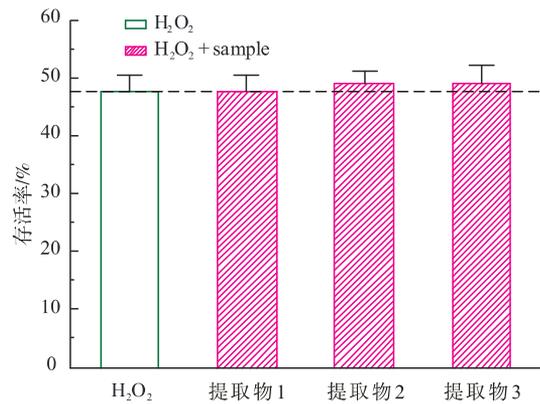
图 2 不同中草药提取物对 DPPH 自由基的清除能力

Fig.2 DPPH scavenging activities of with Chinese herbs

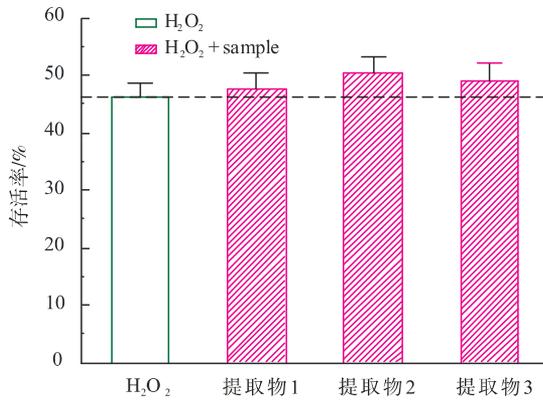
### 2.5 3 种中草药复方提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的细胞损伤及凋亡的防护作用

应用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人皮肤成纤维细胞凋亡模型,在茶多酚(EGCG)、VC 及 VE 作为对照的条件下,研究 3 种具有抗氧化作用的复方中草药提取物对细胞损伤和凋亡的影响见图 3。结果显示,在存在这些抗氧化物质的情况下,细胞的存活率明显上升,其中 EGCG、VC 及 VE 处理组与仅用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比,细胞存活率由 46.09%±1.64%分别增加至 78.68%±2.39%,67.94%±1.69%及 65.35%±2.77%,并有显著性差异( $p < 0.05$ )(图 3C)。但 3 种中草药复方提取物的处理方式不同,结果不尽相同。即在提取物事先与细胞孵育,或将其同时和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与细胞孵育,与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比没有显著性差异(图 3A,B),但在提取物提前与细胞孵育 24 h 后,并其与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 同时存在时,此时的处理组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组相比具有显著的差异( $p < 0.05$ ),细胞存活率可以分别增加至 57.48%±1.93%,60.33%±2.42%及 62.12%±2.54%(图 3D)。再用 TUNEL 法检测细胞的凋亡情况,在加入 EGCG 的绿色荧光阳性细胞数量,比仅用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理组的细胞数量明显减少(图 3E),在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组及加入了 EGCG 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组随机选择 5 个不连续视野计数凋亡细胞,发现 EGCG 存在的组凋亡细胞百分比较仅有 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的组明显减少( $p < 0.05$ ),凋亡率由 38.12%±1.09%降低为 28.05%±1.67%(图 3F)。3 种中草药复方提取物中,提取物 1 处理组与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理

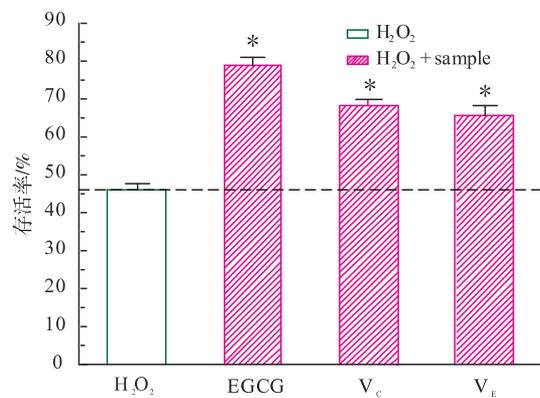
组没有明显差异 ( $p>0.05$ ), 而提取物 2 及提取物 3 均有显著差异 ( $p<0.05$ ), 细胞凋亡率降至  $31.98\% \pm 1.34\%$  及  $33.07\% \pm 1.45\%$  (图 3F)。结果表明, 3 种中草药复方提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人皮肤成纤维细胞损伤具有显著的防护作用, 其中提取物 2、3 能够显著抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的人皮肤成纤维细胞凋亡, 其作用机理有待于进一步研究。



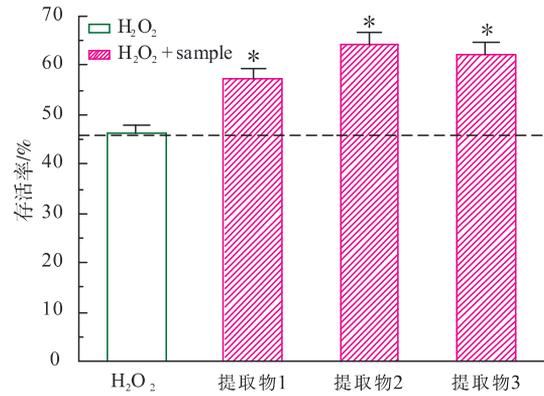
(a)



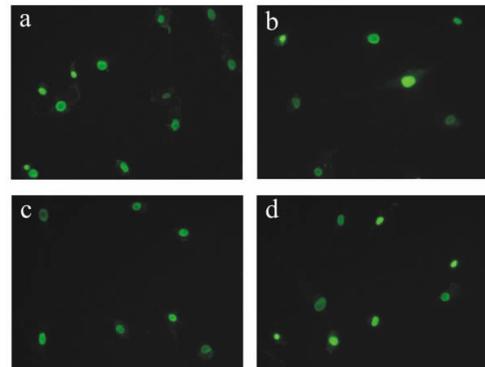
(b)



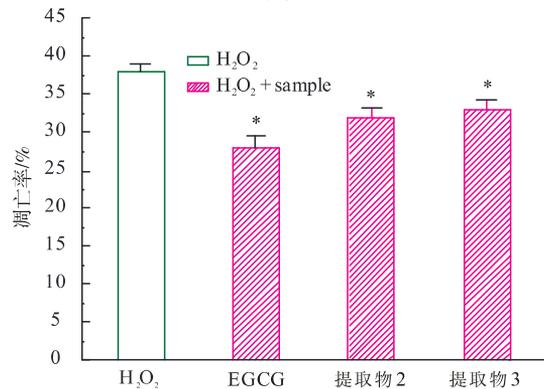
(c)



(d)



(e)



(f)

图 3 中草药提取物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的人皮肤成纤维细胞活力及凋亡的影响

Fig.3 Effect of Chinese herbs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced decrease in human dermal fibroblasts viability and apoptosis

### 3 结语

通过外源性 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人皮肤成纤维细胞凋亡, 并利用 MTT、Hoechst 染色及原位 TUNEL 实验证实了 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够明显损害人皮肤成纤维细胞, 且在一定浓度能诱导该细胞凋亡。作者选用的 3 种中草药复方提取物表现出了良好的抗氧化性能和防护作用,

并在 TUNEL 实验中表现出具有显著抑制氧化诱导的细胞凋亡作用。

作者应用 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导人的皮肤成纤维细胞凋亡,研究几种中草药复方提取物对细胞凋亡的影响。结果表明:该平台简便、快捷,可用于筛选与研究具有抗氧化作用的化妆品添加剂,并为皮肤衰老与抗衰老化妆品的研究开发提供了科学手段和理论依据。

有研究表明,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能够促进自由基的生成,引发生物膜的脂质过氧化反应,从而导致细胞的坏死和凋亡<sup>[4]</sup>。因此,作者可以进一步探讨 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起人皮肤成纤维细胞凋亡的机理、以及各种物质的防护作用机理,通过检测脂质过氧化引起的 SOD 酶、MDA 等物质的活性变化来做进一步的研究。

## 参考文献:

- [1] Chung J H, Youn S H, Kwon O S, et al. Enhanced proliferation and collagen synthesis of human dermal fibroblasts in chronically photodamaged skin[J]. **Photodermatol Photoimmunol Photomed**, 1996, 12: 84-89.
- [2] Vogel H G. Age-dependent changes in skin biomechanics, measurements in vitro and in vivo [J]. **Z Gerontol**, 1994, 27: 182-185.
- [3] Nishimori Y, Edwards C, Pearse A, et al. Degenerative alterations of dermal collagen fiber bundles in photodamaged human skin and UV-irradiated hairless mouse skin: possible effect on decreasing skin mechanical properties and appearance of wrinkles[J]. **J Invest Dermatol**, 2001, 117: 1458-1463.
- [4] Baek S M, Kwon C H, Kim J H, et al. Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells[J]. **J Lab Clin Med**, 2003, 142(3): 178-186.
- [5] 李文明, 刘洪涛, 李佳佳, 等. 川芎有效成分的体外抗氧化研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2010, 29(1): 64-69.  
LI Wen-ming, LIU Hong-tao, LI Jia-jia, et al. Isolation and antioxidative activity of the substrate isolated from chuanxiong[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2010, 29(1): 64-69. (in Chinese)
- [6] Chen Q, Fischer A, Reagan J D, et al. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells [J]. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1995, 92: 4337-4341.
- [7] Yasuda K, Aoshiba K, Nagai A. Transforming growth factor- $\beta$  promotes fibroblast apoptosis induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [J]. **Exp Lung Res**, 2003, 29: 123-134.
- [8] Parthasarathy S, Bin Azizi J, Ramanathan S, et al. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae Family) leaves[J]. **Molecules**, 2009, 14: 3964-3974.
- [9] 吕静, 陶文沂, 程景才, 等. 十字花科蔬菜提取物抗肿瘤作用的研究[J]. **食品与生物技术学报**, 2007, 26(4): 105-109.  
LU Jing, TAO Wen-yi, CHENG Jing-cai, et al. Antitumor effects of extract from cruciferous vegetables [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2007, 26(4): 105-109. (in Chinese)
- [10] Kai M, Klaus H V, Sebastian L, et al. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements[J]. **Sensors**, 2007, 7: 2080-2095.
- [11] Tu Y, Mithieux S M, Annabi N, et al. Synthetic elastin hydrogels that are coblended with heparin display substantial swelling, increased porosity, and improved cell penetration[J]. **J Biomed Mater Res A**, 2010, 95(4): 1215-1222.
- [12] Lee G, Ge B. Growth inhibition of tumor cells in vitro by using monoclonal antibodies against gonadotropin-releasing hormone receptor[J]. **Cancer Immunol Immunother**, 2010, 59(7): 1011-1019.
- [13] Bae J Y, Choi J S, Choi Y J, et al. Epigallocatechin gallate hampers collagen destruction and collagenase activation in ultraviolet-B-irradiated human dermal fibroblasts: involvement of mitogen-activated protein kinase [J]. **Food Chem Toxicol**, 2008, 46: 1298-1307.
- [14] Kobayashi S, Waki T, Nakanishi I, et al. Potent 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging activity of novel antioxidants, double-stranded tyrosine residues conjugating pyrocatechol[J]. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, 2010, 58(11): 1442-1446.
- [15] Lawenda B D, Smith D E, Xu L, et al. Do the dietary supplements epigallocatechin gallate or vitamin e cause a radiomodifying response on tumors in vivo-A pilot study with murine breast carcinoma[J]. **J Soc Integr Oncol**, 2007, 5(1): 11-17.