

# 茶多酚等抗氧化剂对香烟烟雾致损 HEK293 细胞的保护性研究

高静<sup>1</sup>, 禹利君<sup>1\*</sup>, 周清明<sup>2\*</sup>, 黄建安<sup>1</sup>, 刘仲华<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学园艺园林学院茶学系 茶学教育部重点实验室, 长沙 410128;  
2. 湖南农业大学农学院烟草系, 长沙 410128)

**摘要:** **目的** 研究茶多酚等天然抗氧化剂对香烟烟雾致损的 HEK293 细胞的保护效能及 JAK2/STAT3 代谢调控机制。**方法** 香烟过滤嘴中添加茶多酚、白芦藜醇、维生素 C、芦丁、槲皮素、绿原酸、花青素、原花青素 8 种植物提取物后收集烟气, 对 HEK293 细胞进行 MTT 对比研究及运用 Western blot 技术分析其 Bcl-2、Bax、STAT3 蛋白表达量变化。**结果** 香烟烟雾可降低 HEK293 细胞存活率, 呈浓度依赖关系; 上调 HEK293 细胞中 Bcl-2 蛋白相对表达量, 下调 Bax、STAT3 蛋白相对表达量, 且各蛋白变化趋势呈浓度依赖效应; 在过滤嘴中添加茶多酚、白芦藜醇、维生素 C、芦丁、槲皮素、绿原酸、花青素、原花青素 8 种抗氧化剂明显抑制了香烟烟雾导致 HEK293 细胞死亡, 结果具有显著性差异( $P < 0.05$ ), 其中以茶多酚效果最佳。**结论** 8 种植物提取物均能对香烟所致 HEK293 细胞损伤产生一定的保护作用。

**关键词:** 香烟烟雾; 抗氧化剂; 细胞存活率; JAK2/STAT3

## Researches on tea polyphenols and other antioxidants protection abilities of HEK293 cells for cigarette smoke damage

GAO Jing<sup>1</sup>, YU Li-Jun<sup>1\*</sup>, ZHOU Qing-Ming<sup>2\*</sup>, HUANG Jian-An<sup>1</sup>, LIU Zhong-Hua<sup>1</sup>

(1. Key Lab of Tea Science of Ministry of Education, Tea Science Department, College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Tobacco Science Department, College of Agriculture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**ABSTRACT: Objective** To investigate the metabolic regulation mechanism of tea polyphenols and other natural antioxidants antagonizing cigarette smoke damaging HEK293 cells and its JAK2/STAT3. **Methods** Eight kinds of antioxidants, tea polyphenols, resveratrol, vitamin C, rutin, quercetin, chlorogenic acid, anthocyanins and proanthocyanidins, were added to cigarette filters and the smoke was collected. HEK293 cells were studied by MTT trail data and the protein expression Bcl-2, Bax, and STAT3 were analyzed by Western blot technique. **Results** Cigarette smoke could reduce the HEK293 cell survival rates in a dose-dependent manner. With up-regulate Bcl-2 protein relative expression, down-regulate Bax, and STAT3 protein relative

基金项目: 湖南省教育厅重点科学研究项目(12A069)

**Fund:** Supported by Key Scientific Research Project of the Education Department of Hunan Province (12A069)

\*通讯作者: 禹利君, 教授, 主要研究方向为茶及其关键功能成分的应用开发利用。E-mail: yulijun\_tea@qq.com

周清明, 教授, 主要研究方向为烟草工程。E-mail: Zqm0618@aliyun.com

\*Corresponding author: YU Li-Jun, Professor, Key Lab of Tea Science of Ministry of Education, Tea Science Department, College of Horticulture and Landscape, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China. E-mail: yulijun\_tea@qq.com

ZHOU Qing-Ming, Professor, Tobacco Science Department, College of Agriculture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China. E-mail: Zqm0618@aliyun.com

expression levels, each protein expression levels were in a dose-dependent effect for HEK293 cells. Comparing to the control, adding 8 kinds of antioxidants to cigarette filters could inhibit the increase of HEK293 cells death rates caused by cigarette smoke obviously. The results had significant differences ( $P < 0.05$ ), and tea polyphenols was the best. **Conclusion** Eight kinds of antioxidants can protect HEK293 cell from damage caused by cigarettes smoke.

**KEY WORDS:** cigarette smoke; antioxidants; cell survival rates; JAK2/STAT3

## 1 引言

香烟烟气中含有多种损害人体健康的化学物质,可引起组织细胞损伤、诱发癌症<sup>[1-5]</sup>。茶多酚(tea polyphenols, TP)<sup>[6]</sup>、白芦藜醇(resveratrol, Res)<sup>[7]</sup>、维生素C(vitamin C, VC)<sup>[8]</sup>、芦丁(rutin, Rut)<sup>[9]</sup>、槲皮素(querctetin, Que)<sup>[10]</sup>、绿原酸(chlorogenicacid, Chl)<sup>[11,12]</sup>、花青素(anthocyanins, Ant)<sup>[13]</sup>、原花青素(proanthocyanidins, Pro)<sup>[14,15]</sup>等天然产物具有很好的抗氧化能力,原料来源广、毒副作用小,直接作为细胞抗氧化剂使用可产生良好的保护效果,是否能作为香烟滤嘴添加剂减少香烟烟雾(cigarette smoking, CS)的危害,还未见报道。据此,本研究以茶多酚、白芦藜醇、维生素C、芦丁、槲皮素、绿原酸、花青素、原花青素8种天然抗氧化剂添加到香烟滤嘴中,对比研究香烟烟雾通过抗氧化剂过滤后,对HEK293细胞毒害的影响,为后期抗氧化剂的合理选择提供理论支持。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验材料

人胚肾细胞系 HEK293 由中南大学湘雅医学院刘静教授惠赠;香烟样品由湖南农业大学周清明教授惠赠;改造装置所用外接过滤嘴(型号 JD-0211)购自超爵烟嘴公司;茶多酚(TP)(96%)由湖南农业大学园艺园林学院茶学教育部重点实验室提供;白芦藜醇、维生素C、芦丁、槲皮素、绿原酸、花青素、原花青素纯度均为96%以上,由湖南华诚生物资源有限公司惠赠。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 细胞培养

人胚肾细胞 HEK293 复苏后,于10%新生牛血清、青霉素 100000 U/L、链霉素 100000 U/L 的 RPMI-1640 培养基中培养(37℃、5%CO<sub>2</sub>),每隔2~3 d

用0.05%胰酶(含EDTA)消化细胞,按1:3传代,选取传代3次后处于对数期生长的HEK293细胞用于实验,后续使用HEK293细胞可连续传代。

#### 2.2.2 香烟烟雾收集液的制备

自制香烟抽吸装置,模仿人吸烟的频率与吸力抽吸香烟烟雾,收集1支香烟的烟雾于5 mL无血清的RPMI-1640培养基(连接烟雾管浸入培养基中),制成香烟烟雾收集液,用1 mol/L NaHCO<sub>3</sub>调RPMI-1640培养基pH至7.2~7.4后,0.22 μm滤菌头过滤除菌,即为100%的香烟烟雾收集液,简称为CS1,后续用含血清的RPMI-1640培养基稀释后于30 min内用于实验。在上述吸烟装置的基础上,利用购买的外接过滤嘴进行改装,去掉外接过滤嘴中起过滤作用部分,将香烟本身过滤嘴剪成两半,中间分别加入8种100 μmol抗氧化剂,香烟烟雾收集方式与CS1相同,制得8种100%浓度的香烟烟雾收集液,简称为CS2。

#### 2.2.3 香烟烟雾 CS1 处理 HEK293 细胞

参考文献 MTT 方法<sup>[16]</sup>并加以改进,通过 MTT 实验检测 CS 对人胚肾上皮细胞系 HEK293 存活率的影响,并确定 CS 对 HEK293 的半数细胞抑制浓度(IC<sub>50</sub>值)。取处于对数生长期的 HEK293 细胞,胰酶消化后将细胞吹打成单细胞悬液,血球计数板计算细胞悬液密度,取适量细胞稀释到所需密度(4×10<sup>5</sup>个/9 mL)。接种于96孔细胞培养板,每孔接种 HEK293 细胞4000个、总体积为90 μL,培养12 h。待细胞贴壁后,每孔加入10 μL不同浓度的烟雾收集液CS1,使CS1终浓度分别为0%、0.1%、0.2%、0.4%、0.8%、1.6%、3.2%,同时设置调零组。培养24 h后,吸弃孔中培养基,加入90 μL新鲜无血清RPMI-1640培养基,每孔加入10 μL 5 mg/mL的MTT溶液,将细胞置于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养4 h,小心吸弃孔中的培养基,每孔中各加入100 μL DMSO,振荡摇匀15 min后,酶标仪检测570 nm处各孔的吸光值(A<sub>570 nm</sub>)。各处理设3个平行,2次重复。根据公式,计算

各组细胞的存活率、 $IC_{50}$  值。

细胞存活率(%)=(烟雾处理组的  $A_{570\text{ nm}}$ /空白对照组的  $A_{570\text{ nm}}$ ) $\times 100\%$

#### 2.2.4 香烟烟雾 CS2 处理 HEK293 细胞

HEK293 细胞培养与“2.2.3”相同, 根据 CS1 对 HEK293 细胞作用的  $IC_{50}$  值, 在  $IC_{50}$  值附近取 2%、1% 两个烟雾处理浓度, 以此浓度为参考, 收集烟雾 CS2 处理 HEK293 细胞 24 h 后, 用 MTT 法测定 570 nm 处吸光值, 与 CS1 比较, 分析添加抗氧化剂后收集的 CS2 对 HEK293 细胞存活率的影响。

#### 2.2.5 香烟烟雾 CS1 对 HEK293 细胞 Bax、Bcl-2、STAT3 蛋白表达的检测

$2\times 10^6$  个对数生长期的 HEK293 细胞培养于 5 mL 含 10% 血清的培养基中, 实验组分别加入一定浓度的 CS1, 在 37 °C 细胞培养箱中分别培养 24 h 后, 离心收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 加入蛋白裂解液裂解细胞, 收取细胞总蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。20  $\mu\text{g}$  蛋白经变性不连续 SDS-PAGE 电泳分离后, 将蛋白质点转移至 PVDF 膜上, 室温下用封闭液封闭 2 h, 加入不同的一抗, 分别为兔抗人 Bax (1:100)、Bcl-2 (1:200)、STAT3 (1:200) 内参 GAPDH (1:200), 4 °C 冰箱孵育过夜, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:10000)于室温下孵育 2 h, 加入化学发光底物显色, 于化学发光检测系统中显影、拍照, 各样品结果以 GAPDH 作为内参校正。用 AIC Alpha View 软件对图像进行灰度分析。

#### 2.2.6 统计方法

应用 SPSS19.0 软件进行方差分析, 各组间采用多重比较分析法(LSD 法)分析; 每组设置 3 个平行, 2 次重复。统计学数据用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 对计量资料, 两样本均数比较采用  $t$  检验, 多个样本均数比较应用单因素方差分析。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 3 结果与分析

### 3.1 CS1 对 HEK293 细胞形态的影响

根据图 1 的实验结果可知, 经 0.5% CS1 作用 24 h 后的 HEK293 细胞与对照组比较, 细胞数目略微减少, 透光性改变, 少量细胞出现皱缩; 经 1.0% CS1 作用 24 h 后, 细胞数目明显减少, 部分细胞变大, 明显可见细胞内含有较多颗粒, 部分细胞变圆、细胞内出现较大透明的空泡、细胞核紧贴细胞膜; 经 2.0% CS1 作用 24 h 后, 细胞数目大量减少, 细胞

变大、细胞内有较多颗粒、透光性改变。

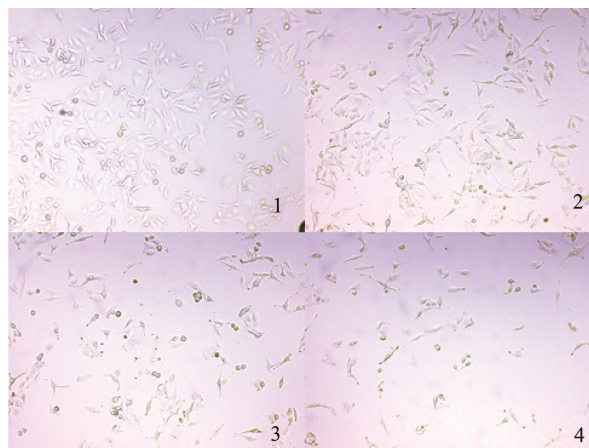


图 1 不同浓度 CS1 对 HEK293 细胞形态的影响 (X 40)

Fig. 1 Different concentrations of CS1 affected HEK293 cells morphologies

注: CS1 浓度表示 1: 0%; 2: 0.5%; 3: 1.0%; 4: 2.0%.

### 3.2 CS1 对 HEK293 细胞存活率的影响

根据表 1 和图 2 的 MTT 实验结果可知: 人胚肾细胞系 HEK293 细胞经 0%~3.2% 的 CS1 处理 24 h 后, 细胞的存活率随着 CS1 浓度的增高而明显下降, 显示出浓度依赖性效应; 对人胚肾上皮细胞系 HEK293 的半数细胞抑制浓度( $IC_{50}$  值)约为 2.0%。由此可知, CS1 对体外培养的 HEK293 细胞有显著的抑制作用, 其抑制率呈剂量依赖性关系。

### 3.3 CS1 对 HEK293 细胞中 Bax、Bcl-2、STAT3 蛋白表达的影响

根据图 3 实验结果可知: HEK293 细胞经过 CS1 处理 24 h 后, 以内参蛋白 GAPDH 条带校正并定量分析(图 3), 显示 CS1 能够下调促凋亡蛋白 Bax 的表达; 1.0% CS1 处理与 0.5% CS1 处理比较, 对 Bax 表达没有明显差异; CS1 上调抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 随着 CS1 浓度的增加, Bcl-2 的表达上调增强, 呈正相关效应; CS1 下调 STAT3 的表达, 且随着 CS1 浓度的增加 STAT3 的下调趋势增强, 呈负相关效应。STAT3 表达与 Bax 表达呈正相关、与 Bcl-2 表达呈负相关。与对照组比较, CS1 处理使 HEK293 细胞中 Bax、Bcl-2、STAT3 三种细胞凋亡相关蛋白的表达都发生了变化。据此推测, CS1 处理可通过调控 HEK293 细胞中凋亡相关蛋白的表达, 从而影响 HEK293 细胞的存活率。

表 1 不同浓度 CS1 对 HEK293 细胞存活率的影响 (作用 24 h)

Table 1 Different concentrations of CS1 affected HEK293 cells survival rates (24h)

CS 浓度(%)	存活率 $x$ (%)	存活率 $\bar{x} \pm SD$ (%)
0	100	
0	100	100±0
0	100	
0.1	96.56	
0.1	95.95	96.31±0.32
0.1	96.42	
0.2	92.46	
0.2	92.67	92.17±0.70
0.2	91.37	
0.4	90.79	
0.4	89.97	90.67±0.65
0.4	91.25	
0.8	82.79	
0.8	84.43	83.46±0.86*
0.8	83.17	
1.6	68.47	
1.6	68.89	68.44±0.46**
1.6	67.97	
3.2	12.87	
3.2	12.9	12.93±0.09**
3.2	13.03	

注: 1: 0%(对照); 2: 0.1%; 3: 0.2%; 4: 0.4%; 5: 0.8%; 6: 1.6%; 7: 3.2%。\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ 。

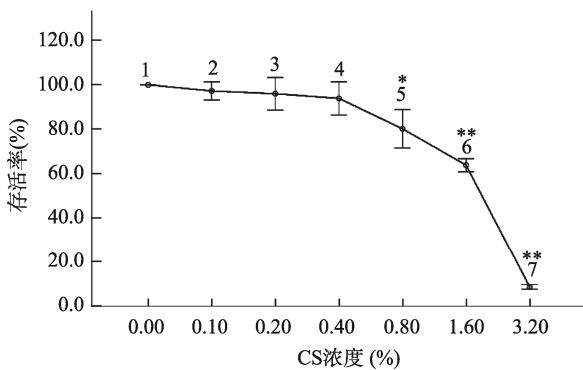


图 2 不同浓度 CS1 对 HEK293 细胞存活率的影响(24 h)

Fig.2 Different concentrations of CS1 affected HEK293 cells survival rates (24 h)

注: 同表 1

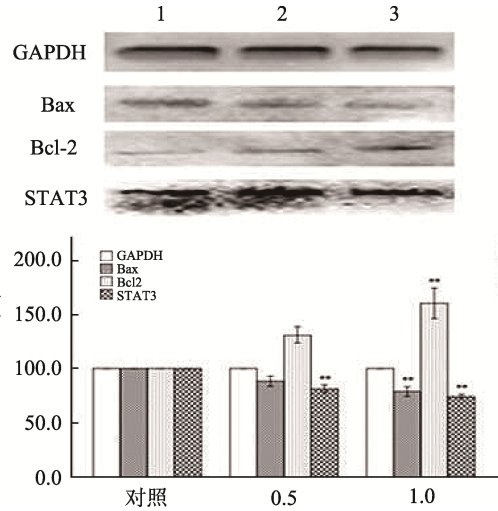


图 3 不同浓度 CS1 对 HEK293 细胞 Bax、Bcl-2、STAT3 蛋白表达的影响

Fig. 3 Different concentrations of CS1 affected Bax, Bcl-2, STAT3 proteins expression levels in HEK293 cells

注: 1: 对照; 2: 0.5% CS1 处理; 3: 1.0% CS1 处理。

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ 。

### 3.4 8 种抗氧化剂干预 CS 对 HEK293 细胞存活率的影响

由表 2 可知, 过滤嘴添加抗氧化剂后所收集的烟雾收集液 CS2 相比于单纯的香烟烟雾收集液 CS1, 除 1% 的 CS2 损伤下 Pro 处理组未产生显著性差异外, 其他各组都对 HEK293 的存活率有明显提升, 结果具有统计学差异, 即这些氧化剂对烟雾损伤 HEK293 细胞都具有保护作用。其中以茶多酚效果最佳, 无论是 1% 还是 2% 烟雾损伤下, 相比其他处理, 茶多酚处理组 HEK293 细胞存活率都最高, 且与单纯烟气模型组比较具有显著差异。其次,  $V_C$  与 Res 对烟雾损伤 HEK293 细胞的保护效果也较强。

## 4 讨论

香烟烟雾的危害主要与细胞氧化损伤有关, 香烟烟雾能够对多种细胞产生氧化应激损伤, 抑制细胞的生长和增殖, 使细胞内 ROS 含量上升, 对细胞的 DNA 造成损伤<sup>[1-5]</sup>, 而茶多酚等抗氧化剂能减少衰老、色素沉着、肝损伤、氧化应激等产生的细胞毒性, 体外试验均有较多研究<sup>[6-15]</sup>。但是否能在香烟滤嘴中发挥抗氧化作用, 减少烟雾的毒害, 未见系统研究。本研究以 HEK293 细胞作为研究对象, 通过添加茶多酚、白芦藜醇、维生素 C、芦丁、

表 2 8 种抗氧化剂对不同浓度烟雾损伤 HEK293 细胞存活率的影响(%)  
 Table 2 Eight kinds of antioxidants affected the survival rates of HEK293 cells which were damaged by different concentrations of CS

处理	存活率 $x_1$	存活率 $\bar{x}_1 \pm SD$	存活率 $x_2$	存活率 $\bar{x}_2 \pm SD$
TP	98.98		92.04	
	108.63	102.5±5.3*	115.27	105.14±11.90*
	100		108.11	
Res	99.63		100.37	
	102.03	99.32±2.88*	93.72	96.67±3.39*
	96.3		95.93	
VC	82.07		105.73	
	99.82	93.10±9.63*	95.38	100.55±5.18*
	97.41		100.55	
Rut	87.62		94.45	
	82.07	87.00±4.65*	97.23	94.45±1.40*
	91.31		95.56	
Que	97.92		89.31	
	89.25	89.90±7.71*	81.85	88.59±6.42*
	82.54		94.62	
Ant	87.99		84.1	
	79.48	86.69±6.66*	81.52	84.10±2.32*
	92.61		79.48	
Pro	83.55		94.45	
	79.85	80.65±2.59	81.7	87.92±6.38*
	78.56		87.62	
Chl	80.78		99.45	
	96.3	93.10±11.07*	88.72	94.08±5.37*
	102.22		94.09	
Mod group	73.94		66.91	
	74.68	72.28±3.54	61.37	65.06±3.20
	68.21		66.91	

注: TP 为茶多酚、Res 为白芦藜醇、VC 为维生素 C、Rut 为芦丁、Que 为槲皮素、Ant 为花青素、Pro 为原花青素、Chl 为绿原酸、Mod group 是单纯 CS1 处理, 为模型组; 细胞存活率 1 为 1% 的 CS2 处理结果; 细胞存活率 2 为 2% 的 CS2 处理结果; \* 表示各氧化剂组与 Mod group 比较的结果,  $P < 0.05$ .

槲皮素、绿原酸、花青素、原花青素 8 种植物提取物纯品到香烟过滤嘴, 探讨这 8 种抗氧化剂对 CS 所致细胞毒害的拮抗作用, 比较其对 CS 诱导的人胚肾上皮细胞损伤的保护效能。研究结果显示 CS 能降低 HEK293 细胞的存活率, 并且有浓度依赖关系; 滤嘴中添加了这些抗氧化剂后, 明显消减了 CS 导致

HEK293 细胞存活率下降, 从机制上分析, 这些抗氧化剂可能与 CS 导致 HEK293 细胞中 Bax、Bcl-2、STAT3 三种细胞凋亡相关蛋白的表达起着相反作用, 较少炎症发生, 促进 HEK293 细胞正常生长。后续试验将考虑对 8 种天然抗氧化剂处理后的 HEK293 细胞 Bax、Bcl-2、STAT3 等蛋白表达进行检测分析, 以便

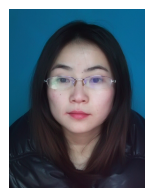
深入研究其抑制香烟损伤的分子生物学机制,更加系统地进行机制探究。

### 参考文献

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, 58: 71–96.
- [2] Bryant A, Cerfolio RJ. Differences in epidemiology, histology, and survival between cigarette smokers and never-smokers who develop non-small cell lung cancer [J]. *Chest*, 2007, 132: 185–192.
- [3] Clark J, You M. Chemoprevention of lung cancer by tea [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2006, 50: 144–151.
- [4] Ryk C, Kumar R, Thirumaran RK, *et al.* Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1, APEX1, XRCC3 and NBS1, and the risk for lung cancer in never-and ever-smokers [J]. *Lung Cancer*, 2006, 54: 285–292.
- [5] Kamataki T, Fujieda M, Kiyotani K, *et al.* Genetic polymorphism of CYP2A6 as one of the potential determinants of tobacco-related cancer risk [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338: 306–310.
- [6] Assuncao M and Andrade J P, Protective action of green tea catechins in neuronal mitochondria during aging [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2015, 20: 247–262.
- [7] Ai Z, Li C, Li L, *et al.* Resveratrol inhibits beta-amyloid-induced neuronal apoptosis via regulation of p53 acetylation in PC12 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(4): 2429–2434.
- [8] Schober SM, Peitsch WK, Bonsmann G, *et al.* Early treatment with rutoside and ascorbic acid is highly effective for progressive pigmented purpuric dermatosis [J]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2014, 12(12): 1112–1119.
- [9] Xu PX, Wang SW, Yu X L, *et al.* Rutin improves spatial memory in Alzheimer's disease transgenic mice by reducing Abeta oligomer level and attenuating oxidative stress and neuroinflammation [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 264: 173–180.
- [10] Magalingam KB, Radhakrishnan A, Ramdas P, *et al.* Quercetin glycosides induced neuroprotection by changes in the gene expression in a cellular model of Parkinson's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 55(3): 609–617.
- [11] Ji L, Jiang P, Lu B, *et al.* Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(11): 1911–1919.
- [12] Meng S, Cao J, Feng Q, *et al.* Roles of chlorogenic Acid on regulating glucose and lipids metabolism: a review [J]. *Evid Based Comp Alternat Med*, 2013, 2013: 801457.
- [13] da Silva Santos V, Bisen-Hersh E, Yu Y, *et al.* Anthocyanin-rich acai (*Euterpe oleracea* Mart.) extract attenuates manganese-induced oxidative stress in rat primary astrocyte cultures [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2014, 77(7): 390–404.
- [14] Duan Y, Wang Z, Zhang H, *et al.* The preventive effect of lotus seedpod procyanidins on cognitive impairment and oxidative damage induced by extremely low frequency electromagnetic field exposure [J]. *Food Funct*, 2013, 4(8): 1252–1262.
- [15] Ahmad SF, Zoheir KM, Abdel-Hamied HE, *et al.* Grape seed proanthocyanidin extract has potent anti-arthritis effects on collagen-induced arthritis by modifying the T cell balance [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(1): 79–87.
- [16] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods*, 1983, 65(1): 55–63.

(责任编辑: 杨翠娜)

### 作者简介



高静,在读硕士研究生,主要研究方向为茶及其关键功能成分的应用开发利用。  
E-mail: 280555529@qq.com



禹利君,博士,教授,主要研究方向为茶及其关键功能成分的应用开发利用。  
E-mail: yulijun\_tea@qq.com



周清明,博士,教授,主要研究方向为烟草工程。  
E-mail: Zqm0618@aliyun.com