

镍与绿茶 EGCG 对舌鳞癌细胞毒性的影响

罗真兰, 王海波, 苏俭生

(同济大学 口腔医学院, 上海 200072)

摘 要: Ni^{2+} 是镍基牙科铸造合金中析出的主要金属离子, 是人体的致癌物质. 绿茶的主要活性成分表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对包括口腔癌在内的人体癌有化学预防作用. 本研究采用 LC/MS 法分析 EGCG 与 Ni^{2+} 间的相互作用. MTT 法检测 EGCG、 Ni^{2+} 及其相互作用对舌鳞癌细胞生长的影响. LC/MS 分析显示, Ni^{2+} 与 EGCG 同时加入时有 $[\text{EGCG-2Ni}^{2+}]$ 和 $[\text{EGCG-Ni}^{2+}]$ 形成. Ni^{2+} 和 EGCG 在一定范围内对舌鳞癌细胞生长的抑制呈时间及浓度依赖性. EGCG 与 Ni^{2+} 共同作用后可明显增强对舌鳞癌细胞的抑制作用, 且抑制作用与它们的浓度、加入的顺序及 Ni^{2+} 与 EGCG 的比例有关.

关 键 词: 牙科铸造合金; 绿茶; Ni^{2+} ; EGCG; 舌鳞癌细胞

中图分类号: R783

文献标识码: A

Effect of Interaction of Ni^{2+} and Green Tea Epigallocatechin Gallate on Tongue Carcinoma Cells

LUO Zhen-Lan, WANG Hai-Bo, SU Jian-Sheng

(School of Stomatology, Tongji University, Shanghai 200072, China)

Abstract: Ni^{2+} is the major ion release from nickel-based dental casting alloy and carcinogens. The major polyphenolic constituent present in green tea, (-)epigallocatechin-3-gallate (EGCG), shows chemoprevention on human cancer. The aim of this study was to determine the interaction between EGCG and Ni^{2+} and the biological effects on tongue squamous cell carcinoma. The interaction of EGCG and Ni^{2+} was analyzed by LC/MS. The cell viability was assessed by the MTT reduction assay. The results of LC/MS indicated that $[\text{EGCG-2Ni}^{2+}]$ and $[\text{EGCG-Ni}^{2+}]$ formed when EGCG and Ni^{2+} were added simultaneously. Ni^{2+} and EGCG both inhibited the proliferation of tongue carcinoma cells in a time- and dose-dependent manner. The cytotoxicity against tongue carcinoma cells was increased when EGCG and Ni^{2+} cotreated, and the inhibition effects were extremely dependent on the concentrations of EGCG and Ni^{2+} , addition order and the ratio of $[\text{Ni}^{2+}]$ to $[\text{EGCG}]$.

Key words: dental casting alloy; green tea; Ni^{2+} ; EGCG; tongue carcinoma cells

牙科铸造合金是牙科三大材料之一, 广泛用于牙列缺失和牙列缺损的修复、颌骨缺损的修复、口腔正畸、种植牙根以及口腔医疗操作的器械、设备等. 其中, 镍铬合金以其良好的物理机械性能和稳定的生物学性能, 长期以来成为临床上应用广泛的金属材料之一. 口腔是一个非常复杂的电解质环境,

牙科铸造合金制作的修复体戴入口腔后会发生多种形式的腐蚀, 析出多种金属离子, 引起口腔微环境变化, 对口腔组织产生不良影响. López-Alías 等^[1]研究发现镍铬合金析出的主要离子为镍(Ni)和铬(Cr), 而含铍镍铬合金析出的主要离子是 Ni、Cr 和铍(Be). 茶是世界上最普遍的饮料, 含有许多具有化学

收稿日期: 2011-02-27; 收到修改稿日期: 2011-05-17

基金项目: 国家自然科学基金(30840031, 30970726) National Natural Science Foundation of China (30840031, 30970726)

作者简介: 罗真兰(1983-), 女, 硕士. E-mail: zhenlanluo@sina.com

通讯作者: 苏俭生, 教授. E-mail: sjs@tongji.edu.cn

保护和预防的成分,并且富含类黄酮,包括儿茶素及其衍生物^[2].绿茶中儿茶素的主要成分表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)无论从细胞培养还是体内肿瘤模型中都显示出显著抑制癌细胞增殖的潜能^[3-7].但有许多研究表明 EGCG 对口腔鳞癌细胞有细胞毒性且可诱导凋亡^[8-10].也有研究发现 EGCG 的生物活性受金属离子尤其是过渡金属离子的影响^[11-12].儿茶素与牙科铸造合金析出的金属离子间的络合反应及形成络合物的生物学效应的研究,国内外尚未见报道.本研究旨在检测绿茶儿茶素的主要活性成分 EGCG 与镍铬铸造合金析出的 Ni^{2+} 之间相互作用后对舌鳞癌细胞的生物学效应,为牙科铸造合金的改性提供生物基础.

1 材料和方法

1.1 化学药品及试剂

纯 EGCG 购自 Sigma 公司,舌鳞癌细胞(Cal27 细胞株,ATCC 细胞库).MTT、DMEM、胎牛血清、胰酶、链霉素、青霉素等购自南京凯基生物科技有限公司. NiCl_2 、无水乙醇、丙酮、 NaCl_2 、 CaCl_2 、 NaH_2PO_4 、 Na_2S 、尿素(urea)等购自上海国药集团化学试剂有限公司.甲酸胺和乙腈购自上海贝基生物科技有限公司.试剂为超纯级或分析纯级.

1.2 LC/MS 分析

将 1 mmol/L Ni^{2+} 和 1 mmol/L EGCG 分别溶于去离子水中,然后将等比例的 EGCG 溶液分别与 Ni^{2+} 溶液混合,调整 pH 值到 6.5 配成待测液.液相色谱仪联合质谱仪(LC/MS)系统(液相型号:agilent 1200,质谱型号:agilent 1946A,美国)检测上述待测液中的络合物.液相色谱分离参数为:紫外检测器的检测波长为 280 nm.使用色谱柱 VARIAN pursuit 3 C18 进行分离,柱温为 30℃,流速为 0.25 mL/min.梯度洗脱:0~10 min 99%A+1%B~40%A+60%B,溶液 A 为水+0.1%甲酸胺,溶液 B 为乙腈(100%).质谱采用负离子总离子流扫描模式,扫描范围为 100~1000 m/z,毛细管电压 4000 V,锥孔电压 100 V.源温:120℃,脱气温度:350℃,氮气作为干燥气体,流速为 600 L/h.通过液相色谱分离溶液中的各个化学物质,质谱得出各个化学物质的质荷比(m/z),最后对每一质谱图中分子离子峰的分析从而推断物质的分子式及化学结构.

1.3 细胞培养

舌鳞癌细胞用含有 10%胎牛血清、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素和 100 units/mL 青霉素的 DMEM 细胞培养液

在 37℃ 并含 5% CO_2 的培养箱中培养.细胞消化使用 0.25%的胰酶.

1.4 MTT 法检测细胞存活率

用 MTT 法检测 EGCG 和 Ni^{2+} 对舌鳞癌细胞生长的影响.将 EGCG 或 NiCl_2 溶于人工唾液中(NaCl 0.4 g/L; KCl 0.4 g/L; CaCl_2 0.6004 g/L; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.78 g/L; $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 0.005 g/L; urea 1.000 g/L).将细胞接种到 96 孔板中培养 24 h 后用不同浓度的 EGCG 或 Ni^{2+} 分别处理 24、48 和 72 h. Ni^{2+} 的浓度范围为 50~1000 $\mu\text{mol/L}$, EGCG 的浓度范围为 25~500 $\mu\text{mol/L}$.处理完后用 PBS 冲洗细胞,并加入 5 mg/mL MTT 液后在 37℃ 下培养 4 h.形成的甲瓚蓝颗粒用二甲亚砜溶解.用酶标仪在 570 nm 波长时检测每个孔的吸光度值(ABS).细胞存活率计算如下:

Cell viability(%)=

$$\frac{ABS_{(\text{treatment,withcells})} - ABS_{(\text{treatment,withoutcells})}}{ABS_{(\text{control,withcells})} - ABS_{(\text{control,withoutcells})}} \times 100\%$$

实验还研究了 EGCG 和 Ni^{2+} 加入次序对舌鳞癌细胞生长的影响,EGCG 和 Ni^{2+} 按三种顺序加入:(1)先加 EGCG,即细胞接种到 96 孔板中培养 24 h 后先加入 EGCG 处理 30 min,再加入 Ni^{2+} ,细胞继续培养 48 h;(2)先加 Ni^{2+} ,即细胞接种到 96 孔板中培养 24 h 后先加入 Ni^{2+} 处理 30 min,再加入 EGCG,细胞继续培养 48 h;(3)EGCG 与 Ni^{2+} 同时加入,即细胞接种到 96 孔板中培养 24 h 后同时加入 EGCG 和 Ni^{2+} ,细胞继续培养 48 h.细胞存活率用 MTT 法检测.

另外,实验将 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 与不同浓度的 Ni^{2+} 同时加入人工唾液,研究了不同比例 Ni^{2+} 和 EGCG 对舌鳞癌细胞的生物学效应,细胞在加药后培养 48 h.

1.5 数据分析

所有数据记录为平均值±标准差,单因素方差分析检验用于分析数据的统计学意义,设 $p < 0.05$ 时有统计学意义.

2 结果

2.1 Ni^{2+} -EGCG 络合物的 LC/MS 分析

为检测 EGCG 与 Ni^{2+} 之间的反应,将 EGCG 和 Ni^{2+} 混合,LC/MS 分析结果如图 1 所示.通过液相色谱图峰可见分离得到的主要有出峰时间为 0.774 和 6.488 min 的两个物质(图 1(A)).图 1(B₁)、(B₂)为质谱图,结果显示 493.0(m/z)和 571.1(m/z)的两个分子离子峰分别对应[EGCG-2Na]和[EGCG-2 Ni^{2+}]-4H 的

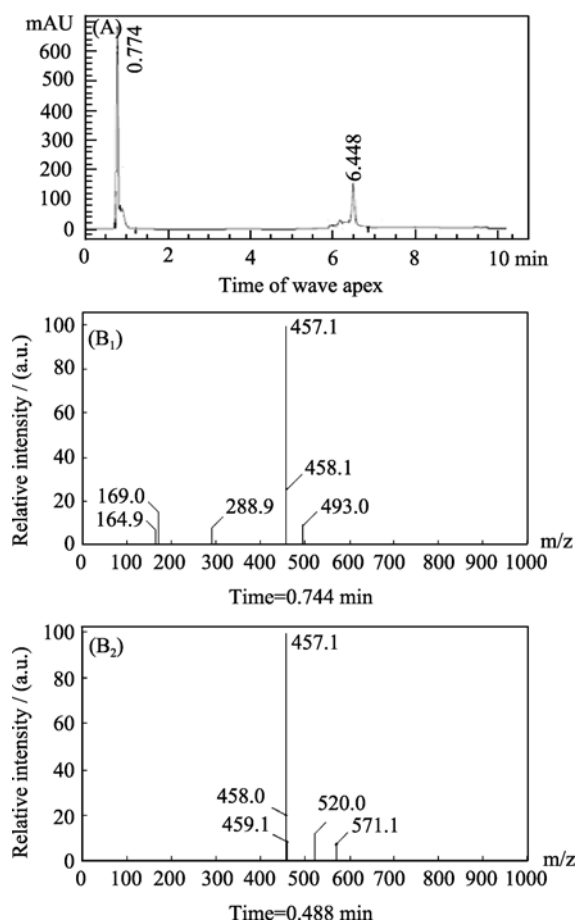


图1 负离子模式 LC/MS 分析 EGCG 与 Ni^{2+} 间的相互作用
Fig. 1 LC/MS analysis of the interaction between Ni^{2+} and EGCG in the negative ion mode
A is LC-DAD chromatogram signal at 280 nm; B is the MS chromatograms

分子量. 碎片离子峰 458.0(m/z) 和 458.1(m/z) 为 EGCG; 457.1(m/z) 为 $[\text{EGCG}-\text{H}]^-$; 288.9(m/z) 和 520.0(m/z) 分别为表儿茶酸和 $[\text{EGCG}-\text{Ni}^{2+}]^-$. 还有两个未知碎片离子为 164.9(m/z) 和 169.0(m/z).

EGCG 含有多个酚羟基, 具有较强的酸碱缓冲能力, 可作为多基配体与中心离子如 Ni^{2+} 、 Bi^{3+} 、 Cr^{6+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mo^{6+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 等过渡

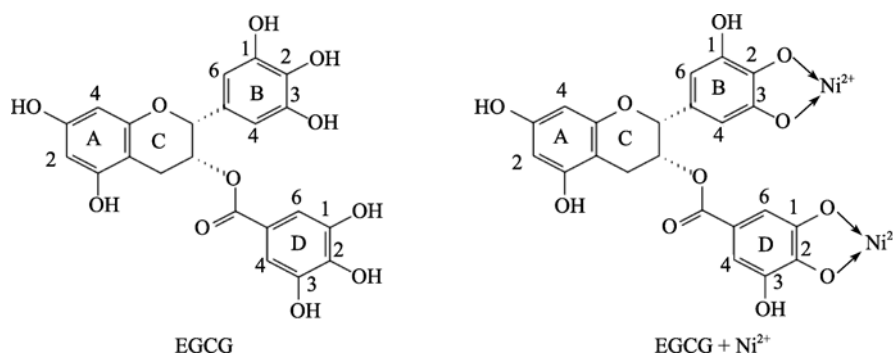


图2 EGCG 与 Ni^{2+} 络合结构
Fig. 2 Construction of complexes of EGCG and Ni^{2+}

金属离子络合, 形成环状的螯合物^[13-14]. EGCG 主要通过 D 环和 B 环上的两个羟基去质子化与金属离子结合, 而且 D 环形成的配位键比 B 环更强, 可以推测 EGCG 主要通过 D 环(没食子环)与金属离子结合, 其次通过 B 环(没食子儿茶酸环)与金属离子结合, D 环上的两个羟基去质子化, 然后与金属离子结合形成 $[\text{金属离子}(\text{EGCG} \pm \text{H})]^0$, 而在 $[\text{金属离子}(\text{EGCG} \pm \text{H})]^0$ 中, B 环上的一个羟基和 D 环上的两个羟基被去质子化, 然后金属离子与 D 环上的两个氧原子和 B 环上的两个氧原子结合形成聚合物结构^[14]. Esparza 等^[15] 研究发现儿茶素可与 Zn^{2+} 和 Cu^{2+} 形成摩尔比为 1:1 的复合物. EGCG 与金属离子尤其是过渡元素金属离子间可发生复杂的化学反应, 并且改变其生物学活性和新陈代谢, 由此可以推断 EGCG 与 Ni^{2+} 发生反应后的结构如图 2 所示.

2.2 EGCG 和 Ni^{2+} 对舌鳞癌细胞存活率的影响

图 3 显示 EGCG 浓度 $< 100 \mu\text{mol/L}$ 时, 处理 24 h 可促进舌鳞癌细胞生长, 处理 48 h 和 72 h 对细胞生长无明显影响. EGCG 浓度在 $100 \sim 150 \mu\text{mol/L}$ 时 EGCG 对舌鳞癌细胞的生长抑制可呈浓度及时间依赖性. 当 EGCG 浓度 $> 150 \mu\text{mol/L}$ 时, 舌鳞癌细胞的存活率在三个时间处理组中都维持在较低水平.

Ni^{2+} 浓度 $< 150 \mu\text{mol/L}$ 时, 细胞处理 24、48 和 72 h, Ni^{2+} 对舌鳞癌细胞生长抑制表现出时间及浓度依赖性. Ni^{2+} 浓度 $> 150 \mu\text{mol/L}$ 时, 随着处理时间增加, 舌鳞癌细胞存活率显著下降, 呈明显时间依赖性. Ni^{2+} 浓度在 $200 \sim 600 \mu\text{mol/L}$ 时, 同一时间处理组中, 舌鳞癌细胞存活率处于同一水平. Ni^{2+} 浓度 $> 600 \mu\text{mol/L}$ 时, 处理 24 h 舌鳞癌细胞存活率与 Ni^{2+} 浓度在 $200 \sim 600 \mu\text{mol/L}$ 时处于同一水平, 处理 48 h 和 72 h 细胞存活率随浓度增加而降低(图 4). 这一结果表明 Ni^{2+} 可抑制舌鳞癌细胞的生长. 虽然传统观点认为 Ni^{2+} 是一种致癌物质, 这是因为 Ni^{2+} 是一种细胞毒性离子, 高浓度的 Ni^{2+} 通过多种途径进入

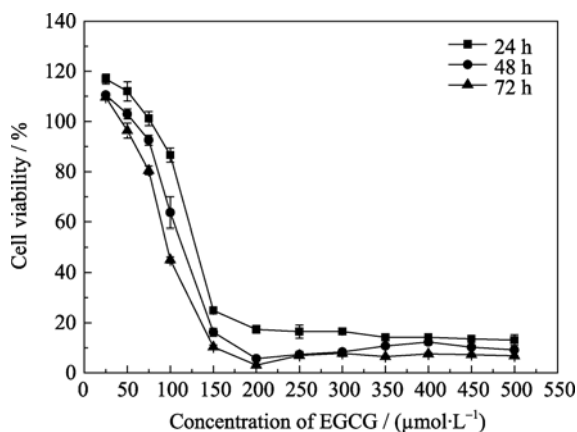


图 3 EGCG 浓度对舌鳞癌细胞存活率的影响

Fig. 3 Cytotoxicity of EGCG concentration(50–500 μmol/L) against tongue carcinoma cells

Data are mean ± SD, $n=6$

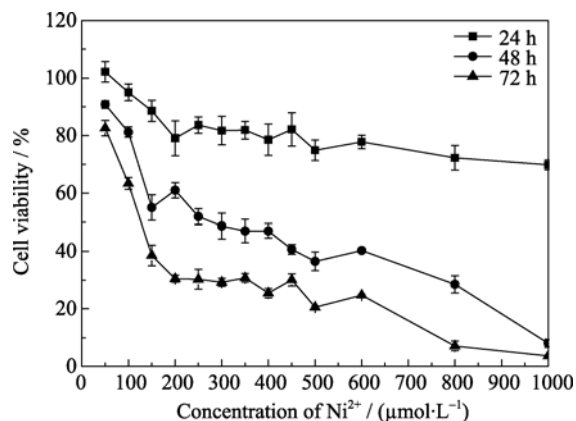


图 4 Ni²⁺浓度对舌鳞癌细胞存活率的影响

Fig. 4 Cytotoxicity of Ni²⁺ concentration(50–1000 mol/L) against tongue carcinoma cells

Data are mean ± SD, $n=6$

细胞后造成细胞器质损伤而凋亡, 但 Ni²⁺的细胞毒性对细胞没有选择性, 本课题组前期研究发现, Ni²⁺对牙龈成纤维细胞也具有细胞毒性, 这与其对舌鳞癌细胞的细胞毒性是相似的^[16].

2.3 Ni²⁺与 EGCG 相互作用对舌鳞癌细胞生长的影响

细胞接种于 96 孔板 24 h 后, 选择 50、100 和 150 μmol/L EGCG 分别与 50、100、200 和 300 mol/L Ni²⁺同时加入处理舌鳞癌细胞 48 h, 用 MTT 来检测 Ni²⁺与 EGCG 相互作用对细胞生长的影响, 以单独添加 Ni²⁺溶液处理组为对照组. 结果显示: 在 EGCG 与 Ni²⁺共同作用下, Ni²⁺对舌鳞癌细胞生长的抑制作用明显增强, 且随着 Ni²⁺浓度增加, 抑制作用也逐渐增强(图 5).

2.4 EGCG 和 Ni²⁺加入顺序对舌鳞癌细胞存活率的影响

选择 100 μmol/L Ni²⁺与不同浓度的 EGCG(50、

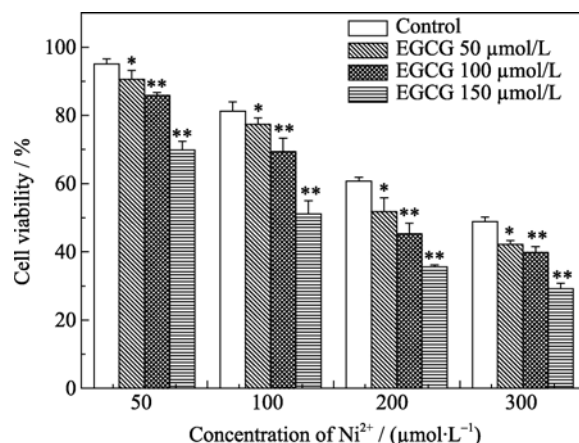


图 5 EGCG 与 Ni²⁺共同处理舌鳞癌细胞 48 h 后的细胞存活率

Fig. 5 Effects of EGCG and Ni²⁺ concentrations on the cytotoxicity of EGCG against tongue carcinoma cells

Treatment of Ni²⁺ alone was used as a control. Data are mean ± SD, $n=6$ (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$)

100 和 150 μmol/L)研究不同加入顺序对舌鳞癌细胞生长的影响, 结果如图 6 所示. 从图 6 可以看出, 对于相同浓度的 EGCG, 先加 EGCG 组的细胞存活率是最低, 同时加入组细胞存活率最高, 两者间的差别有高度统计学差异.

2.5 Ni²⁺与 EGCG 不同比例对舌鳞癌细胞存活率的影响

实验选择 100 μmol/L EGCG 与不同浓度的 Ni²⁺同时加入处理细胞 48 h, 研究不同[Ni²⁺]/[EGCG]对舌鳞癌细胞存活率的影响, 以 100 μmol/L EGCG 单独处理组(细胞存活率: 63.7±6.3)为对照组. 结果如图 7 所示: 当[Ni²⁺]/[EGCG]<1 时, 舌鳞癌细胞的存活率较对照组有显著增加, 差别有统计学意义; 当

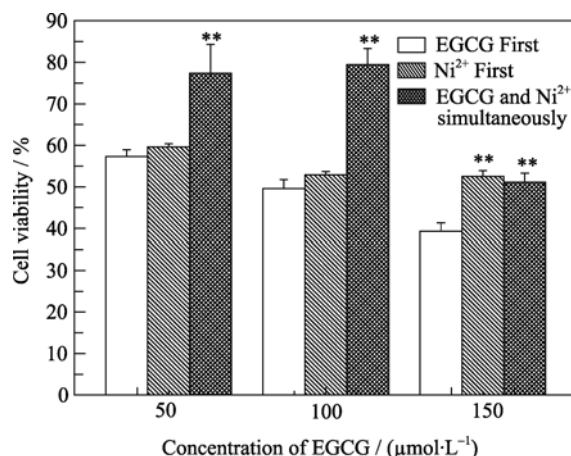


图 6 EGCG 与 Ni²⁺不同加入顺序对舌鳞癌细胞存活率的影响

Fig. 6 Effect of the addition order of EGCG and Ni²⁺ on the viability of tongue carcinoma cells

The cells were treated with 100 mol/L Ni²⁺ in combination with certain concentrations of EGCG Data are mean ± SD, $n=4$ (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$)

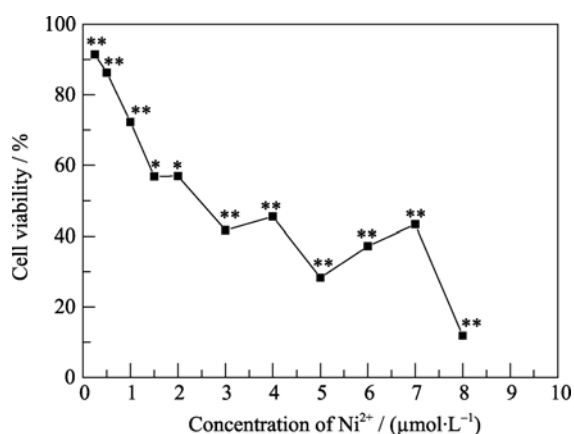


图7 Ni^{2+} 与EGCG(100 $\mu\text{mol/L}$)不同比例对舌鳞癌细胞存活率的影响

Fig. 7 Effects of the ratio of Ni^{2+} to EGCG on the viability of tongue carcinoma cells

Treatment of EGCG alone was used as control (cell's viability of $63.7\% \pm 6.3\%$). Data are mean \pm SD, $n=6$ (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$)

其比例 >1 时,细胞存活率较对照组有显著降低,差别有显著统计学意义。

有研究表明: Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 可改变EGCG对前列腺癌细胞的生物学活性^[15,17-19],而 Ni^{2+} 也可通过多种途径进入细胞,与某些生物成分结合,并改变多种细胞系细胞的功能、形态和超微结构^[20-23]。Chen等^[19]研究发现低浓度的EGCG可通过其对细胞膜高亲和性从而改善细胞膜对 Zn^{2+} 的吸收。本研究中发现 Ni^{2+} 和EGCG都能抑制舌鳞癌细胞的生长,EGCG与 Ni^{2+} 共同作用使其对舌鳞癌细胞的抑制作用显著增强,这可能是因为EGCG与 Ni^{2+} 形成 Ni^{2+} -EGCG复合物,也可能是EGCG增加舌鳞癌细胞细胞膜通透性使细胞对 Ni^{2+} 的摄取增多,也可能是两种机理共同作用的结果,但要确定具体的作用机理还需进一步深入地研究。Yu等^[24]在研究EGCG和 Cd^{2+} 对PC-3细胞的作用时发现EGCG和 Cd^{2+} 加入的顺序会影响两者对PC-3细胞的作用。本实验通过EGCG和 Ni^{2+} 不同加入顺序对舌鳞癌细胞存活率的影响研究发现,当EGCG和 Ni^{2+} 同时加入时细胞的存活率最高,因此,推测不同的加入顺序可能使 Ni^{2+} 、EGCG及细胞间的相互作用发生复杂的变化,不同的加入顺序产生不同的生物学效应可能与上述不同的作用机理有关,具体的作用机理是今后深入研究的方向。LC/MS分析证实了当EGCG和 Ni^{2+} 同时加入时可形成 Ni^{2+} -EGCG络合物,且 $[\text{EGCG}-\text{Ni}^{2+}]$ 和 $[\text{EGCG}-2\text{Ni}^{2+}]$ 同时存在于溶液中,这说明 Ni^{2+} 与EGCG间的反应是比较复杂的,受到两者的比例及浓度的影响。

3 结论

实验证实了EGCG与 Ni^{2+} 反应后可有络合物产生;EGCG和 Ni^{2+} 都能抑制舌鳞癌细胞的生长;EGCG与 Ni^{2+} 共同作用可显著增强对舌鳞癌细胞的抑制,且抑制效应与两者的浓度、加入的顺序及 Ni^{2+} 与EGCG的比例有关;但络合反应及其对舌鳞癌细胞生长抑制的分子机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] López-Alías J F, Martínez-Gomis J, Anglada J M, *et al.* Ion release from dental casting alloys as assessed by a continuous flow system: nutritional and toxicological implications. *J. Dent. Mater.*, 2006, **22(9)**: 832-837.
- [2] Nagle D G, Ferreira D, Zhou Y D. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG): chemical and biomedical perspectives. *Phytochemistry*, 2006, **67(17)**: 1849-1855.
- [3] Thomas R, Kim M H. Epigallocatechin gallate inhibits HIF-1 degradation in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, **334(2)**: 543-548.
- [4] Nishikawa T, Nakajima T, Moriguchi M, *et al.* A green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma, possibly through inhibition of Bcl-2 family proteins. *J. Hepatol.*, 2006, **44(6)**: 1074-1082.
- [5] Annabi B, Currie J C, Moghrabi A, *et al.* Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCG. *Leuk Res.*, 2007, **31(9)**: 1277-1284.
- [6] Noda C, He J, Takano T, *et al.* Induction of apoptosis by epigallocatechin-3-gallate in human lymphoblastoid B cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, **362(4)**: 951-957.
- [7] Thangapazham R L, Singh A K, Sharma A, *et al.* Green tea polyphenols and its constituent epigallocatechin gallate inhibits proliferation of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.*, 2007, **245(1/2)**: 232-241.
- [8] Hsu S D, Yamamoto T, Borke J, *et al.* Green tea polyphenol-induced epidermal keratinocyte differentiation is associated with coordinated expression of p57/KIP2 and caspase 14. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2005, **312(3)**: 884-890.
- [9] Babich H, Krupka M E, Nissim H A, *et al.* Differential *in vitro* cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. *Toxicol. Vitro*, 2005, **19(2)**: 231-242.
- [10] Yamamoto T, Digumarthi H, Aranbayeva Z, *et al.* EGCG-targeted p57/KIP2 reduces tumorigenicity of oral carcinoma cells: role of

- c-Jun N-terminal kinase. *Tox Appl. Ph.*, 2007, **224**(3): 318–325.
- [11] Furukawa A, Oikawa S, Murata M, *et al.* (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, **66**(9): 1769–1778.
- [12] Azam S, Hadi N, Khan N U, *et al.* Prooxidant property of green tea polyphenols epicatechin and epigallocatechin-3-gallate: implications for anticancer properties. *Toxicol. Vitro*, 2004, **18**(5): 555–561.
- [13] Zhang L C, Yu H N, Sun S L, *et al.* Investigations of the cytotoxicity of epigallocatechin-3-gallate against PC-3 cells in the presence of Cd^{2+} *in vitro*. *Toxicol Vitro*, 2008, **22**(4): 953–960.
- [14] Navarro R E, Santacruz H, Inoue M. Complexation of epigallocatechin gallate (a green tea extract, EGCG) with Mn^{2+} : nuclear spin relaxation by the paramagnetic ion. *J. Inorg. Biochem.*, 2005, **99**(2): 584–588.
- [15] Esparza I, Salinas I, Santamara C, *et al.* Electrochemical and theoretical complexation studies for Zn and Cu with individual polyphenols. *Anal. Chim. Acta*, 2005, **543**(2): 267–274.
- [16] 苏俭生, 罗真兰, 王海波. Ni^{2+} 与 EGCG 相互作用对牙龈成纤维细胞的生物学效应. *复旦学报*, 2001, **37**(5): 519–525.
- [17] Yu H N, Yin J J, Shen S R. Growth inhibition of prostate cancer cells by epigallocatechin gallate in the presence of Cu^{2+} . *J. Agric Food Chem.*, 2004, **52**(3): 462–466.
- [18] Yu H N, Yin J J, Shen S R. Effects of epigallocatechin gallate on PC-3 cell cytoplasmic membrane in the presence of Cu^{2+} . *Food Chem.*, 2006, **95**(1): 108–115.
- [19] Chen X, Yu H N, Shen S G, *et al.* Role of Zn^{2+} in epigallocatechin gallate affecting the growth of PC-3 cells. *J. Trace. Elem. Med. Biol.*, 2007, **21**(2): 125–131.
- [20] Messer R L, Bishop S, Lucas L C. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials.*, 1999, **20**(18): 1647–1657.
- [21] Garceau N, Pichaud N, Couture P. Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by *in vitro* exposure to Cd, Cu and Ni. *Aquat Toxicol.*, 2010, **98**(2): 107–112.
- [22] Cangul H, Broday L, Salnikow K, *et al.* Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Toxicol Lett.*, 2002, **127**(1): 69–75.
- [23] Kasprzak K S, Sunderman F W, Salnikow K. Nickel carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 2003, **533**(1): 67–97.
- [24] Yu H N, Shen S R, Yin J J. Effects of interactions of EGCG and Cd^{2+} on the growth of PC-3 cells and their mechanisms. *Food Chem. Toxicol.*, 2007, **45**(2): 244–249.