

表没食子儿茶素没食子酸酯对 人皮肤 HaCat 细胞的辐射保护作用

葛杨杨 谷庆 刘静 葛欣 唐益庭 罗居东 陈光烈 张舒羽 曹建平

(苏州大学医学部放射医学与防护学院 江苏省放射医学与防护重点实验室 苏州 215123)

摘要 用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 比色法检测不同浓度 EGCG 处理 HaCat 细胞 24、48 和 72 h 的生长变化, 确定 EGCG 的最适作用浓度; 将细胞分为对照组、EGCG 单独处理组、X 射线单独照射组、EGCG 联合 X 射线照射组, 克隆形成实验检测 EGCG 对 HaCat 细胞的辐射保护作用; DCFH-DA 检测细胞内 ROS 变化; Annexin V-FITC 检测细胞凋亡的变化; DNA 片段分析出现凋亡的片段; 流式细胞术检测细胞周期变化。结果表明, EGCG 在 0—50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内可刺激 HaCat 细胞增殖, 高浓度则抑制生长, 其效应呈时间依赖性; 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 能提高放射后 HaCat 细胞的克隆形成率; EGCG 能抑制 X 射线诱导的细胞凋亡, 与单纯照射组相比, 药物+照射组凋亡率由 9.25% 降至 7.82%, 能抑制 X 射线诱导的凋亡片段; 相比于单纯照射组, EGCG 降低了 X 射线诱导的 HaCat 细胞 G_2/M 期阻滞。提示 EGCG 对人皮肤 HaCat 细胞具有辐射保护作用; EGCG 可能通过抑制 X 射线引起的 ROS, 从而抑制细胞凋亡及降低辐射诱导的细胞 G_2/M 期阻滞发挥辐射保护作用。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯, 人皮肤 HaCat 细胞, 活性氧, 辐射防护, 细胞凋亡, 细胞周期

中图分类号 TL71, R811.5

放射治疗越来越多的应用于临床上恶性肿瘤的治疗。放射性皮肤损伤是肿瘤放射治疗中常见的早期反应, 此外核事故也是放射性皮肤损伤的另一重要诱因^[1,2]。因此, 减轻正常皮肤细胞辐射损伤意义重大。绿茶富含茶多酚, 其中表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 是含量最高也是最为重要的一种组分。茶多酚具有广泛的生物效应, 主要包括抗突变、抗肿瘤形成、抗炎抗病毒及清除自由基和抗氧化等作用^[3]。实验研究表明^[4]EGCG 能减轻紫外线诱导的皮肤损伤, 但联合 X 射线共同对皮肤细胞的作用鲜有报道。本文研究了 EGCG 对皮肤细胞的辐射防护作用及其辐射防护机制。

1 实验材料和方法

1.1 药物及试剂

表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG) 购于美国 Sigma 公司; DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 培养基购于南京凯基生物科技发展有限公司; 胎牛血清购于美国 Hyclone 公司; 噻唑蓝 (MTT) 购于上海生物工程有限公司; Annexin V-FITC 凋亡

试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司, 活性氧检测试剂盒 (Reactive oxygen species assay kit) 购于碧云天生物技术研究。

1.2 细胞培养

人皮肤 HaCat 细胞株购于南京凯基生物科技发展有限公司, 培养于含 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素各 100 U/mL 的 DMEM 培养液, 37℃、5% CO_2 孵箱中培养, 2 天传代一次。

1.3 辐照条件

采用美国 RADSOURCE 公司直线加速器, 剂量率 1.15 Gy/min, 射线能量 160 kV, 照射细胞。克隆形成实验使用的吸收剂量为 0、2、4、6 和 8 Gy; 细胞凋亡、活性氧分析使用的吸收剂量为 10 Gy。

1.4 EGCG 对细胞增殖影响

将处于对数生长期的 HaCat 细胞消化为浓度为 $4 \times 10^4/\text{mL}$ 细胞悬液, 接种于 96 孔板, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 贴壁后加入浓度分别为 0、5、10、25、50、100、250 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG, 各浓度 3 个平行样,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81172597、81102078)、江苏省高校重大科研项目 (11KJA310001) 资助

第一作者: 葛杨杨, 女, 1987 年 7 月出生, 2010 年毕业于苏州大学, 现为苏州大学医学部放射医学与防护学院研究生

通讯作者: 曹建平, 博士生导师, 教授, E-mail: jpciao@suda.edu.cn

收稿日期: 初稿 2012-12-21, 修回 2013-01-16

继续培养 20、44 和 68 h 后每孔加入 20 μL MTT 溶液, 孵育 4 h, 弃上清, 每孔加入 150 μL 的 DMSO, 振荡溶解 10 min, 酶标仪 (背景波长 570 nm、参考波长 630 nm) 测各孔吸光度 (A) 值。

1.5 克隆形成实验

将对数生长期细胞消化后制备单细胞悬液, 取不同个数细胞接种于六孔板中, 设置 0、2、4、6 和 8 Gy 五个剂量点, 每个剂量点设 3 个平行样, 待其贴壁给予 EGCG 使终浓度为 0、50 $\mu\text{mol/L}$, 继续培养 2 h 后接受照射, 继续培养 14 天, 甲醇固定, Giemsa 染色 30 min, 计数含 50 个细胞以上的细胞集落, 按下式计算克隆存活率: 克隆存活率 (%) = (处理组克隆数/对照组克隆数) $\times$ 100%。实验重复三次, 取平均值。采用“多靶单击模型”计算增敏剂增益比 (Sensitizer enhancement ratios, SER): $\text{SER} = \text{单纯照射组 } D_0 \text{ 值} / \text{照射+药物组 } D_0 \text{ 值}$ 。“多靶单击模型”方程: $SF = 1 - [1 - \exp(-D/D_0)]^N$, $Dq = D_0 \ln N$, 其中, SF 为细胞存活率, D 为放射剂量 (Gy), D_0 代表平均致死剂量, Dq 代表准阈剂量, N 为外推数。绘制细胞剂量存活曲线。

1.6 活性氧 (ROS) 检测

设正常对照组、单纯药物组、照射组、照射+药物组, 将对数生长期的 HaCat 细胞消化后接种于六孔板中, 使其为 60%—70% 的密度。照前 2 h, 在药物组、照射+药物组中加入浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG, 照射组及照射+药物组用 10 Gy X 射线照射细胞, 继续培养 6 h 后, 去除细胞培养液, PBS 洗两遍, 加入 1 mL 稀释好的 DCFH-DA (按照 1:1000 用无血清培养液稀释), 使终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清培养液洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA。使用激光共聚焦显微镜直接观察细胞内的荧光强度。

1.7 细胞凋亡检测

将对数生长期的 HaCat 细胞消化以适当密度接种于六孔板。细胞贴壁后, 在药物组、照射+药物组中加入浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG, 2 h 后用 0、10 Gy X 射线照射细胞, 继续培养 48 h。①流式细胞仪检测: 用胰酶消化细胞, 制备单细胞悬液, 调整细胞浓度为 10^6 个/mL, 离心 2 遍 (1000 r/min, 5 min), 悬浮细胞, Annexin V 和 PI 染液, 避光染 15 min 后流式细胞仪检测凋亡; ②DNA 片段分析: 提取细胞基因组 DNA, 制备 2% 琼脂糖凝胶, 调整电压至

35V, 电泳 6 h, 将凝胶放在紫外灯下观察结果, 并用凝胶成像系统拍照。

1.8 细胞周期检测

将对数生长期的 HaCat 细胞消化以适当密度接种于六孔板。细胞贴壁后, 在药物组、照射+药物组中加入浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG, 2 h 后用 0、16 Gy X 射线照射细胞, 继续培养 24 h 后用胰酶消化, 制备单细胞悬液, PBS 洗涤细胞 2 次, 70% 冷乙醇固定过夜。检测前加 PI 染色 (4 $^{\circ}\text{C}$ 避光染 30 min) 后流式细胞仪检测细胞周期。

1.9 统计学处理

实验均重复三次。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示; 使用 SPSS18.0 分析数据, 细胞存活率及克隆形成率采用重复测量的方差分析, 细胞凋亡率采用完全随机分组两因素析因方差分析, 细胞周期采用 t 检验, 以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGCG 对 HaCat 细胞生长影响

如表 1 所示, MTT 法不同浓度的 EGCG 作用不同时间对 HaCat 细胞的生长效应。EGCG 在 0—50 $\mu\text{mol/L}$ 范围促进 HaCat 细胞的增殖, 增殖率随着药物浓度和作用时间的延长而增加 ($F=244.553$ 、149.401, $p < 0.05$), 呈时间-剂量效应关系。EGCG 在低浓度促进细胞生长, 作用 72 h 后当浓度高于 100 $\mu\text{mol/L}$ 时则有抑制作用, 可见, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的药物浓度在各时间点对细胞无毒性作用且增殖作用最明显, 故用来做进一步实验研究。

2.2 克隆形成实验观察 EGCG 对 HaCat 细胞的辐射防护作用

EGCG 联合 X 射线作用后 HaCat 细胞克隆存活影响见图 1。照射加 EGCG 组, 与对照组相比, HaCat 细胞存活分数显著增加, 2、4、6 和 8 Gy 剂量点差异有统计学意义 ($t=4.743$ 、10.02、12.494、16.745, $p < 0.05$)。HaCat 细胞剂量-存活曲线的主要参数: 单纯照射组和照射+EGCG 组平均致死剂量 (D_0) 分别为 2.43 和 2.63 Gy, 准阈剂量 Dq 分别为 1.78 Gy、2.53 Gy。HaCat 细胞的 EGCG 加照射组与单纯照射组相比, 平均致死剂量 D_0 值增大, 准阈剂量 Dq 值增大, 曲线的直线部分的斜率即 $1/D_0$ 变小, 肩区增大, 提示 EGCG 预处理后, HaCat 细胞辐射抗拒性增加。

表1 不同浓度EGCG处理对HaCat细胞生长的影响吸光度值
Table 1 Effect of EGCG on the growth of HaCat cells OD value ($\bar{X} \pm s$)

EGCG 浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGCG concentration	时间 / h Time		
	24	48	72
0	0.491 ± 0.051	0.571 ± 0.025	0.670 ± 0.064
5	0.585 ± 0.046^a	0.719 ± 0.036^b	0.843 ± 0.038^c
10	0.575 ± 0.028^a	0.717 ± 0.028^b	0.859 ± 0.012^c
25	0.646 ± 0.026^a	0.824 ± 0.032^b	0.869 ± 0.027^c
50	0.679 ± 0.038^a	0.807 ± 0.037^b	0.858 ± 0.025^c
100	0.68 ± 0.047^a	0.817 ± 0.011^b	0.676 ± 0.021
250	0.542 ± 0.041	0.466 ± 0.023^b	0.267 ± 0.007^c
500	0.391 ± 0.014	0.343 ± 0.015^b	0.188 ± 0.013^c

注：^a，与 24 h, 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $p<0.05$; ^b，与 48 h, 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $p<0.05$; ^c，与 72 h, 0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, $p<0.05$ 。
Note: ^a, compare with 24 h, 0 $\mu\text{mol/L}$, $p<0.05$; ^b, compare with 48 h, 0 $\mu\text{mol/L}$, $p<0.05$; ^c, compare with 72 h, 0 $\mu\text{mol/L}$, $p<0.05$.

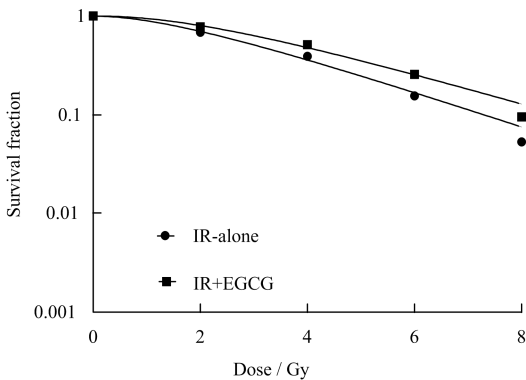


图1 EGCG 单独或联合 X 射线共同处理后 HaCat 细胞的克隆存活率
Fig.1 Clonogenic survival rate of HaCat cells after EGCG treatment (50 $\mu\text{mol/L}$) or with X-ray irradiation

2.3 EGCG 及 X 射线对 HaCat 细胞 ROS 的影响

照射前 2 h, EGCG 预处理能显著抑制 X 射线诱导的 HaCat 的氧化应激。装载 DCFH-DA 探针后, 通过荧光显微镜观察细胞内荧光表达强度, 结果表明 10 Gy X 射线照射后荧光表达明显增加, 提示胞内 ROS 显著增加, 而对照组几乎见不到荧光表达, EGCG 处理组荧光强度较单照组降低, 提示 EGCG 显著降低了辐射诱导的 ROS 的产生, 见图 2。

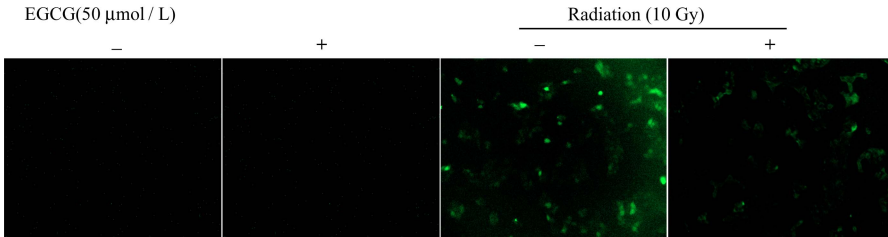


图2 EGCG 单独或联合 X 射线共同处理后 HaCat 细胞 ROS 的变化
Fig.2 Changes of ROS of HaCat cells after EGCG treatment (50 $\mu\text{mol/L}$) or with X-ray irradiation

2.4 凋亡分析

EGCG 及 X 射线对 HaCat 细胞凋亡变化的影响见图 3。由图 3A 可见, 琼脂糖凝胶电泳观察到, 照射组提取基因组细胞 DNA 片段中 180 bp 左右凋亡片段明显增多, 而 HaCat 细胞药物联合照射组与单纯照射组相比, 明显降低了 X 射线产生的 DNA 凋亡片段。由图 3B 可见, 10 Gy X 射线照射后, 细胞凋亡率较对照组相比明显增高, 采用两样本 t 检验分析 X 射线与 EGCG 作用对细胞凋亡的影响, 50 $\mu\text{mol/L}$ EGCG 联合 10 Gy X 射线照射后与单纯照射作用相比, 细胞凋亡率由 9.25%降至 7.82%, 有统计学差异 ($t=1.691$, $p<0.01$)。图 3B 流式细胞术检测细胞凋亡, 同样证实 EGCG 药物联合照射组可降低辐射诱导的细胞凋亡。

2.5 周期分析

EGCG 及 X 射线对 HaCat 细胞周期变化的影响见表 2 和图 4。与对照组相比, 单纯药物组没有明显变化, X 射线照射能明显增加 HaCat 细胞的 G_2/M 期细胞比例, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EGCG 联合 X 射线照射后与单纯照射作用相比, G_2/M 期细胞的比例下降, 有统计学意义 ($t=2.30$, $p<0.01$), 提示 EGCG 预处理可以干扰 X 射线照射导致的细胞周期的改变。

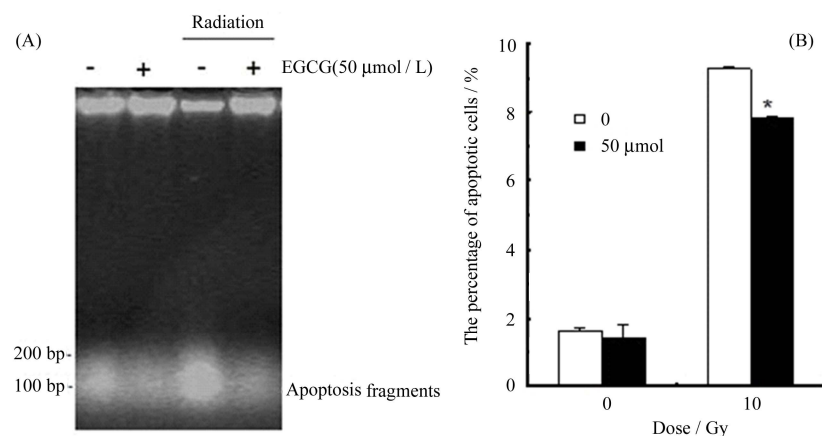


图3 EGCG及X射线作用后,抽提HaCat细胞DNA,琼脂糖凝胶电泳观察凋亡DNA片段(3A),胰酶消化HaCat细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡分数。与单纯辐照组相比,* $p<0.05$ (3B)

Fig.3 Extract the HaCat cell DNA after EGCG and radiation, then use the agarose gel electrophoresis to observe the apoptotic DNA fragments (3A), trypsinization digest the cells, the apoptotic cells were detected by the flow cytometry. Compare with the single radiation group, * $p<0.05$ (3B)

表2 EGCG及X射线作用后HaCat细胞周期变化
Table 2 Effect of EGCG on cell cycle distribution of HaCat cells ($\bar{X} \pm s, \%$)

分组 Group	G_0/G_1	S	G_2/M
对照组 Control	50.43 ± 0.82	32.56 ± 0.95	16.97 ± 0.42
药物组 Drug	50.56 ± 0.89	32.37 ± 0.58	18.58 ± 0.78
辐照组 Radiation	23.40 ± 1.93	36.17 ± 1.02	40.43 ± 1.40
联合组 Combination	$40.05 \pm 2.98^*$	32.23 ± 2.04	$27.72 \pm 3.55^*$

注:与辐照组相比,* $p<0.01$ 。 Note: compare with the single radiation group, * $p<0.01$.

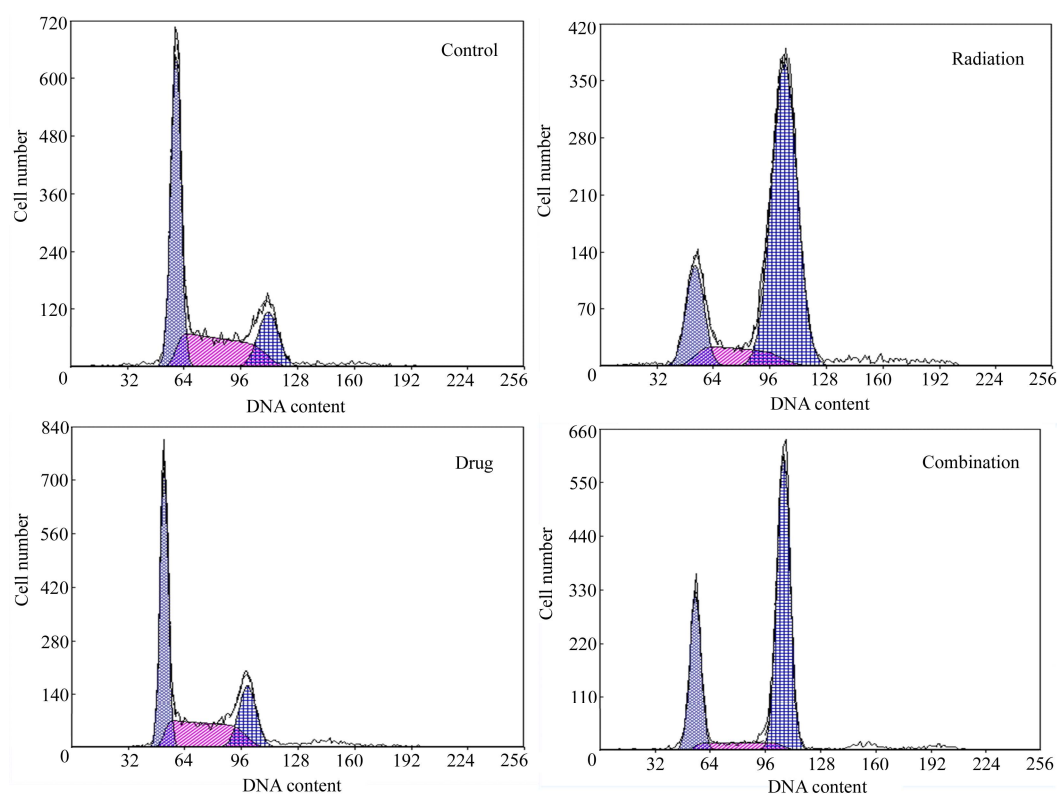


图4 不同处理组中HaCat细胞周期分布
Fig.4 Cell cycle distribution of HaCat cells in different groups

3 讨论

体内外实验研究表明绿茶及其多酚对多种类型的人类肿瘤细胞有治疗作用^[5-7],此外,临床试验表明饮茶与癌症发生率成负相关^[8]。目前有研究发现 EGCG 对肿瘤细胞和正常细胞有双重效应,其能促使肿瘤细胞的凋亡,且能诱导正常细胞的增殖分化^[9],能够促进人毛发的生长^[10]。已有报道 EGCG 能增强肿瘤细胞对射线的辐射敏感性^[11],但目前鲜见对正常细胞的辐射敏感性研究,本实验从多方面研究其对正常细胞的辐射敏感性的影响并初步探讨其可能的机制。

本研究 MTT 检测结果显示 EGCG 在 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度及以下,24、48 和 72 h 三个时间点对 HaCat 细胞均无明显毒性作用,可促进正常表皮细胞增殖分化,这可能与 EGCG 诱导 p57 的表达有关^[9],故本实验选择 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度进行辐射防护作用的研究。克隆形成实验是反映细胞辐射敏感性的较好指标,本克隆实验研究数据首次显示 EGCG 联合照射时细胞克隆存活率高于单独照射组 ($p < 0.05$),说明 EGCG 降低了人皮肤 HaCat 细胞对 X 射线的辐射敏感性,增强了其辐射抗拒性。同时,反应放射敏感性大小的平均致死剂量 D_0 值增加,表明 EGCG 对 HaCat 细胞有辐射保护作用。凋亡实验证实 EGCG 也能防护放射线诱导的人皮肤细胞的凋亡,可能通过 caspase-3 途径降低细胞死亡^[12],caspase 途径是凋亡的主要途径之一^[13]。细胞周期中不同时相的细胞敏感性不同,其中 G_2 期和 M 期细胞最敏感。辐射可以改变细胞周期进程^[14],诱导 G_2/M 期检查点激活,导致 G_2/M 期阻滞,以便在有丝分裂前启动或完成修复。本实验中经过 EGCG 处理的细胞联合 X 射线照射后 G_2/M 期细胞阻滞数量减少,而使细胞接近有丝分裂期的水平较低,对细胞起到辐射保护的作用。

放射生物效应产生的关键是电离辐射的直接作用和生物体所产生的自由基的间接作用,引起一系列的损伤过程。自由基对生物大分子产生诸如脂类等不可逆的信号。因此,能有效地清除体内有害自由基是电离辐射的防护的关键。EGCG 能帮助清除放射线辐射后产生的自由基,降低了辐照产生的 OH $\cdot$ 等活性氧自由基所导致的脂类过氧化作用水平,从而提高细胞的活存,可以看出 EGCG 能通过抑制细胞辐射后产生的活性氧来增加细胞对射线的抗性,这为 EGCG 辐射防护的机制提供了依据。正常细胞周期受一系列调节因子调控,包括细胞周期素、

细胞周期蛋白依赖性激酶、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子。X 射线联合 EGCG 引起的 G_2 期阻滞减少可能与 cyclinB、cdc2 等蛋白有关。

放射性皮肤损伤是肿瘤放射治疗最常见的并发症,约 87% 的放疗患者会出现红斑及其以上的放射性皮肤反应。慢性放射性皮肤损伤与受照皮肤长时间产生活性氧簇 (ROS) 及促炎性反应因子导致细胞凋亡有关。所以研究清除自由基类辐射防护药物显得尤为重要。有文献报道自由基类药物能减轻紫外线导致的皮肤细胞氧化应激损伤^[15]。而本实验确定了 EGCG 对人正常皮肤细胞的辐射防护作用,并初步探讨了其防护机制,但仍缺乏 EGCG 对抑制人皮肤 HaCat 细胞辐射损伤的分子机制的深入研究。本研究将在进一步的实验中用免疫印迹等方法测定细胞蛋白质的表达水平,观察 EGCG 能引起哪些细胞凋亡、周期及氧化应激因子的变化。

综上,茶多酚对于临床肿瘤放射治疗和急性核事故的放射性皮肤损伤的预防与治疗颇具意义。

参考文献

- 1 Gottlob P, Bezold G, Weber L, *et al*. The radiation accident in Georgia: clinical appearance and diagnosis of cutaneous radiation syndrome [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2000, **42**(3): 453-458
- 2 Hoashi T, Okochi H, Kadono T, *et al*. A case of acute radiation syndrome from the dermatological aspect [J]. *Br J Dermatol*, 2008, **158**(3): 597-602
- 3 Yang C S, Wang Z Y. Tea and cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1993, **85**(13): 1038-1049
- 4 Huang C C, Wu W B, Fang J Y, *et al*. (-)- Epicatechin-3-gallate, a green tea polyphenol is a potent agent against UVB-induced damage in HaCaT keratinocytes[J]. *Molecules*, 2007, **12**(8): 1845-1858
- 5 Yang C S, Chung J Y, Yang G, *et al*. Tea and tea polyphenols in cancer prevention [J]. *J Nutr*, 2000, **130**(2S Suppl): 472S-478S
- 6 Steele V E, Bagheri D, Balentine D A, *et al*. Preclinical efficacy studies of green and black tea extracts [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, **220**(4): 210-212
- 7 Yamane T, Takahashi T, Kuwata K, *et al*. Inhibition of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced carcinogenesis by (-)-epigallocatechin gallate in the rat glandular stomach [J]. *Cancer Res*, 1995, **55**(10): 2081-2084
- 8 Bushman J L. Green tea and cancer in humans: a review of the literature [J]. *Nutr Cancer*, 1998, **31**(3): 151-159
- 9 Hsu S, Bollag W B, Lewis J, *et al*. Green tea polyphenols

- induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, **306**(1): 29-34
- 10 Kwon O S, Han J H, Yoo H G, *et al*. Human hair growth enhancement in vitro by green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) [J]. *Phytomedicine*, 2007, **14**(7-8): 551-555
- 11 Zhang G, Wang Y, Zhang Y, *et al*. Anti-Cancer Activities of Tea Epigallocatechin-3-Gallate in Breast Cancer Patients under Radiotherapy [J]. *Curr Mol Med*, 2012, **12**(2): 163-176
- 12 Kondo H, Park S H, Watanabe K, *et al*. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate inhibits apoptosis induced by irradiation in human HaCaT keratinocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **316** (1): 59-64
- 13 Balcer-Kubiczek E K. Apoptosis in radiation therapy: a double-edged sword [J]. *Exp Oncol*, 2012, **34**(3): 277-285
- 14 Deckbar D, Jeggo P A, Lobrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2011, **46**(4): 271-283
- 15 Hseu Y C, Chou C W, Senthil Kumar K J, *et al*. Ellagic acid protects human keratinocyte (HaCaT) cells against UVA-induced oxidative stress and apoptosis through the upregulation of the HO-1 and Nrf-2 antioxidant genes [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, **50**(5): 1245-1255

Radiation protection effects of EGCG on HaCat cells of human skin

GE Yangyang GU Qing LIU Jing GE Xin TANG Yiting
LUO Judong CHEN Guanglie ZHANG Shuyu CAO Jianping

(School of Radiation Medicine and Protection, Medical College of Soochow University,
Jiangsu Provincial Key Laboratory of Radiation Medicine and Protection, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT The radioprotecting effects of EGCG on Human HaCat cells of epidermal keratinocytes irradiated by X rays were investigated. MTT assays were used to evaluate the impact of different concentrations of EGCG on HaCat cells for 24, 48 and 72 h to find the optimal concentration. HaCat cells were divided into four groups: control, EGCG treatment, X-ray exposure, and EGCG combined with X-ray. Cell survival rates were analyzed by clonogenic assays. The changes in ROS were measured by the DCFH-DA method, and cell apoptosis was detected with the Annexin V-FITC cell apoptosis kit and the apoptotic fragments were analyzed with DNA fragment analysis. Flow cytometry was employed to analyze cell-cycle progression. An increase of HaCat cell numbers was observed after the HaCat cells were treated with EGCG at 0—50 $\mu\text{mol/L}$, showing a time-dependent manner, while a high concentration of EGCG inhibiting HaCat cell growth. EGCG (50 $\mu\text{mol/L}$) increased the cloning efficiency of HaCat cells after radiation. EGCG reduced the apoptosis of HaCat cells by X-ray irradiation, compared with single radiation group, the apoptosis rates of the medicine and radiation group decreased from 9.25% to 7.82%; EGCG reduced the apoptosis fragments of HaCat cells by X-ray irradiation compared with the single radiation group. The G₂/M phase arrest population of HaCat cells decreased after X-ray radiation, which was induced by the EGCG pretreatment. EGCG can protect HaCat cells during radiation. Radioprotection of EGCG for the cells from apoptosis is associated with its inhibition of ROS induced by radiation, meanwhile, the decrease of radiation-induced G₂/M phase arrest may be involved.

KEYWORDS EGCG, Human HaCat cell, Reactive oxygen species, Radioprotecting effect, Apoptosis, Cell cycle

CLC TL71, R811.5