

●研究论文●

EGCG 辐射保护作用的研究

刘官树 姚思德

(中国科学院上海原子核研究所辐射化学开放实验室 上海 201800)

倪 谨 赵 芳 孟祥顺

(第二军医大学放射医学研究所 上海 200433)

摘要 采用 MTT 方法和脉冲场凝胶电泳方法,以人肝 L02 细胞株为研究对象,对没食子儿茶素没食子酸脂(epigallocatechin gallate, EGCG)的辐射保护作用进行了研究。MTT 结果表明,EGCG 在 $5-50\mu\text{mol/L}$ 的浓度下,对细胞有明显的保护作用,并对细胞的修复有促进作用;脉冲场凝胶电泳方法结果显示,EGCG 作用可减少辐射所致的 DNA 双链断裂水平。两者均显示 EGCG 可减少对辐射导致的细胞死亡。

关键词 没食子儿茶素没食子酸脂, L02 细胞, 辐射保护, MTT 方法, 脉冲场凝胶电泳方法
中图分类号 Q691

绿茶是一种传统的抗衰老、清除自由基和抗辐射损伤药物,其主要的有效成分是茶多酚。茶多酚是一种复合体,主要由儿茶素(catechins)组成,而儿茶素又是由没食子儿茶素没食子酸脂(epigallocatechin gallate, EGCG)、表没食子儿茶素(epicatechin gallate, ECG)、表儿茶素没食子酸脂(epigallocatechin, EGC)和表儿茶素(epicatechin, EC)等单体组成,其中 EGCG 是含量最高也是最为重要的一种组分^[1]。

茶多酚有着广泛的生物效应,主要有抗突变、抗肿瘤形成、抗炎抗病毒及清除自由基和抗氧化等作用^[1]。而 EGCG 作为一种无毒的抗氧化剂,对其抗突变、抗肿瘤形成的性质,国内外的许多学者已展开了大量的工作,如是抗热敏感枯草杆菌株的回复突变的几百种植物提取物中最有效的^[2]。并有研究显示,口服 EGCG 可以降低亚硝基胍衍生物诱发小鼠十二指肠癌的机率^[3];并对 UVB 导致的 AP-1 活性有明显的抑制作用^[4]。对于 EGCG 的抗突变、抗肿瘤形成的机制,一般归结为主要是清除活性氧自由基的结果^[5],而且能修复由羟基进攻所致的 DNA 损伤^[6,7]。

研究中,我们对 EGCG 的抗辐射致死效应的辐射保护作用进行了研究。通过考察辐照条件下外加 EGCG 对 L02 细胞存活的影响以及对细胞 DNA 双链断裂(DNA Double Strand Break, DSB)后稳态降解产物的分析,对 EGCG 的辐射保护效果进行了评价。

国家自然科学基金(39830090)资助

第一作者:刘官树,男,1975 年 2 月出生,1998 年毕业于中国科学技术大学应用化学系,现为中国科学院上海原子核研究所硕士生

收稿日期:初稿 2001-03-14, 修回 2001-05-16

1 材料和方法

1.1 实验细胞株

L02 人肝细胞株,复旦大学遗传所馈赠。

1.2 照射条件

采用 ^{60}Co γ 射线照射,上海第二军医大学放射医学教研室 ^{60}Co γ 射线照射源,剂量率为 $1.5\text{Gy}/\text{min}$ 。

1.3 主要试剂

IMDM 培养基(美国 GIBCO 公司出品),常规方法配制:含 10% 新生小牛血清(上海华美生物工程公司产品), $200\text{U}/\text{mL}$ 青霉素、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素。MTT (Sigma 产品,上海生工生物工程公司分装),用无血清培养基配制成 $5\text{mg}/\text{mL}$ 的溶液, $0.22\mu\text{m}$ 滤膜除菌, -20°C 避光储存备用。

用 EGCG (日本东京化成公司产品),用无血清培养基配制成 $0.1\text{--}10\text{mmol}/\text{L}$ 的溶液, $0.22\mu\text{m}$ 滤膜除菌, -20°C 避光储存备用。二甲亚砜(DMSO),分析纯。

1.4 MTT 法检测 EGCG 对细胞存活的影响

收集对数生长期的 L02 细胞,用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养液配制成单细胞悬液(细胞浓度为 $10^3\text{--}10^4/\text{mL}$),接种于 96 孔细胞培养板中,每孔体积 $200\mu\text{L}$,对照组加入正常培养液,给药组加入不同体积的 EGCG 溶液,使得终浓度为 $250\text{--}2000\mu\text{mol}/\text{L}$ (检测 EGCG 的细胞毒性或 $5\text{--}400\mu\text{mol}/\text{L}$ (检测 EGCG 对辐射后细胞存活的影响)),按置在 5% CO_2 孵箱内, 37°C 培养 2h, ^{60}Co γ 源照射不同剂量。辐照后以不含药培养基洗 3 次,每孔加入正常培养基 $200\mu\text{L}$,培养 72–84h,加入 MTT,每孔 $200\mu\text{L}$,作用 3–4h,去上清,每孔加入二甲亚砜(DMSO) $150\mu\text{L}$,室温振荡 10min,于 ELX 800 型酶联仪(Universal Microplate Reader, Bio-TEK Instruments, Inc)上测定各孔的光吸收值(OD 值),波长选用 490–630nm 双波长系统^[8]。

为进一步研究 EGCG 对细胞存活的影响,设辐照后 EGCG 作用对照组:在辐照完毕的空白组中加入不同体积的 EGCG 溶液,使得终浓度为 $5\text{--}400\mu\text{mol}/\text{L}$,作用 2h,不含药培养基洗 3 次,每孔加正常培养基 $200\mu\text{L}$,同上述步骤进行 MTT 检测。

1.5 脉冲电泳检测 EGCG 对 DNA 断裂的影响

收集对数生长期的 L02 细胞($2\times 10^7/\text{mL}$)与 1% 的低熔点琼脂糖 1:3 混合,制成胶块,在含有 $50\mu\text{mol}/\text{L}$ EGCG 培养液中,用 37°C 温育 2h,接受 5Gy ^{60}Co γ 射线一次性照射,在 $0.25\text{mol}/\text{L}$ EDTA、 $0.01\text{mol}/\text{L}$ Tris、1% SDS、 $0.5\text{mg}/\text{mL}$ 蛋白酶 K, pH8.0 的裂解液中,用 56°C 水浴保温 24h,用 TE 溶液清洗后进行琼脂糖凝胶电泳分析。电泳采用电场反转凝胶电泳系统(field inversion gel electrophoresis, FIGE),电泳条件:电压为 $1\text{V}/\text{cm}$;主电场脉冲时间

600s,副电场脉冲时间 300s; 0.5×TBE 缓冲液(pH8.0);0.75%琼脂糖凝胶(内加入 0.5μg/mL EB);于 10—15℃的温度条件下电泳 30—48h,电泳凝胶图像摄取及 DNA 进胶光密度分析;将电泳胶块置紫外检测仪下,EB 荧光激发,选择合适的焦距及曝光时间进行照相;相片以 256 级灰度及 300 点像数扫描;扫描结果用 ONE—DSCAN 凝胶电泳图谱图像分析系统进行分析。检测进胶 DNA 光密度值(A 值)百分率,以此代表细胞 DNA 断裂程度。

1.6 统计学处理

Student's *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 EGCG 的细胞毒性

测定在无照射情况下,不同 EGCG 浓度作用下细胞转化 MTT 的光吸收值(OD),并从 EGCG 浓度与 L02 细胞存活率的关系得出药物剂量—存活率曲线(见图 1a)。

存活率(SF) = $\frac{\text{实验组光吸收值}(OD)}{\text{对照组光吸收值}(OD)}$

结果表明,EGCG 对 L02 细胞生长有一定程度的抑制作用,并显示出对浓度的依赖关系,线形拟合结果 IC₅₀为 3.35 mmol/L,在<0.5 mmol/L 时,无明显的细胞毒性。

2.2 射线作用时 EGCG 对细胞存活存的影响

测定在 5Gy 的照射剂量下,不同 EGCG 浓度作用下细胞转化 MTT 的光吸收值(OD),并依 EGCG 浓度与 L02 细胞存活率的关系得出照射下的药物剂量—存活率曲线(见图 1b),结果表现出明显的辐射保护效果(*p*<0.01)。照射前给予 EGCG 组的药物剂量—存活率曲线(见图 1b)基本近似照射后给药组。

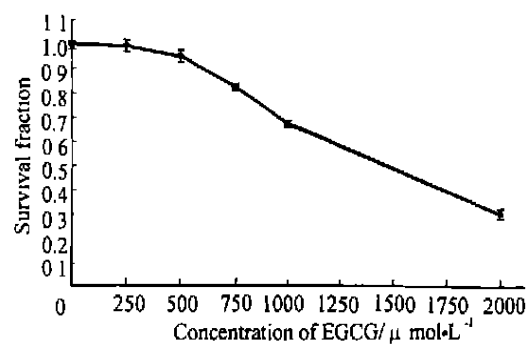


Fig-1a Survival—EGCG concentration correlation curves of L02 cells detected by MTT assays, cells were treated with EGCG for 2 h at the concentration of 250μmol/L—2000μmol/L, each data point is mean±SD of 3 independent experiments

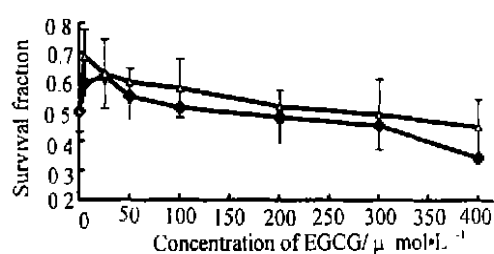


Fig-1b Survival—EGCG concentration correlation curves of L02 cells detected by MTT assays, cells were irradiated by 5Gy γ ray and treated with EGCG at the concentration of 5μmol/L—400μmol/L for 2h, each data point is mean±SD of 3 independent experiments
○. EGCG treatment was carried out before irradiation, ◆. EGCG treatment was carried out after irradiation

(OD),并依照射剂量与 L02 细胞存活率的关系得出照射下的照射剂量—存活率曲线(见图 2),结果表现出明显的辐射保护效果($p<0.01$)。

2.3 射线作用时 EGCG 对细胞 DNA 双键断裂的影响

应用脉冲场凝胶电泳检测,受 5Gy γ 射线照射后 L02 细胞 DNA 双链断裂。随着受照射条件的改变,由加样孔进入凝胶的 DNA 降解小片断逐渐增多,在所观察的几个点,受 50 μ mol/L EGCG 作用的细胞染色体 DNA 经电泳后进入凝胶的量均低于对照(见图 3),对其扫描图象的定量分析结果见表 1。

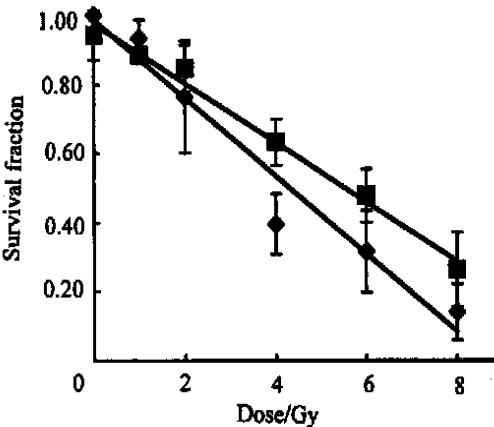


Fig.2 Survival—Dose correlation curves of L02 cells detected by MTT assays, cells were irradiated by 2—8Gy γ ray at a dose rate of 1.5 Gy/min,each data point is mean $\pm$ SD of 3 independent experiments
◆. Blank control group, ■. Treatment with 50 μ mol/L EGCG for 2h before irradiation

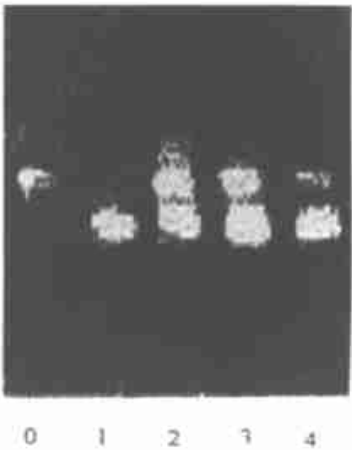


Fig.3 PFGE photograph of L02 cells after 5Gy γ ray irradiation
O. Maker, 1. Non— irradiated control group, 2. Blank control group, 3. Treated by 25 μ mol/L EGCG, 4. Treated by 50 μ mol/L EGCG

Tab.1 The effect of EGCG to the DSB of L02 cells when irradiation

EGCG Concentration/ μ mol $\cdot$ L ⁻¹	DNA dsb ($\pm$ s)/%
0	64.2 $\pm$ 0.21
25	54.7 $\pm$ 1.8
50	15.7 $\pm$ 0.78

3 讨论

在对 EGCG 溶液性质的研究中,EGCG 与羟自由基 OH $\cdot$ 的反应速率为 1.5 $\times 10^{10}$ dm³·mol⁻¹·s⁻¹[7],而细胞靶与 OH $\cdot$ 的反应速率为 10⁷—10⁹dm³·mol⁻¹·s⁻¹[9],这表明 EGCG 可以有效地清除 OH $\cdot$,减少 OH $\cdot$ 对细胞中生物靶的损伤。OH $\cdot$ 是水辐解所产生的自由基中致伤能力最强的一种。据估计,这种自由基至少造成 60%的有氧细胞失活^[10],是辐射损伤时造成 DNA 链断裂和脂类过氧化作用的主要因素。在水溶液中 EGCG 对 OH $\cdot$ 的清除,为在生物体系中 EGCG 的辐射保护作用提供了证据。同时,其他有关 EGCG 的电子脉冲辐解结果表明,

EGCG 也可有效清除 $O_2^{\cdot-}$ 、 $CO_2^{\cdot-}$ 、 $NO_2^{\cdot-}$ 以及 $ROO^{\cdot-}$, 而这些自由基都可以造成细胞染色体、酶和细胞膜的损伤。

非照射情况下, EGCG 药物剂量—L02 细胞存活率曲线的结果表明, EGCG 有一定的细胞毒性。但是, 对比对癌细胞株的影响, EGCG 对正常肝细胞株 L02 细胞的影响要小的多, EGCG 对 HeLa、KB、BALB/3T3 以及 SMMC7721 细胞株均表现为明显的抑制作用^[12,13], 在 Uchida^[11]的实验中, 由于采用 HeLaS₃ 细胞株, 因为当高于 $10\mu\text{mol/L}$ 时, EGCG 即产生明显的毒性, 故只能选取 $10\mu\text{mol/L}$ 以下的浓度, 因此 EGCG 对 HeLaS₃ 细胞本身就有抑制作用, 因而未能检测到明显的对细胞活存的保护作用^[11]。本实验采用正常肝细胞株 L02 细胞, 克服了这一点, 从而获得了较为理想的结果。

在 5Gy 的照射剂量下, 低浓度的 EGCG 作用点的细胞存活率明显高于对照组, $<50\mu\text{mol/L}$ 的 3 个浓度点的存活率均在 60% 以上(对照组存活率为 50%), 说明 EGCG 对细胞的确起到了保护作用。综合图 1 和图 2 的结果, $50\mu\text{mol/L}$ 浓度点, EGCG 无论是照射前或照射后给药都表现出明显的保护效应。而 $5-400\mu\text{mol/L}$ 各个浓度点, EGCG 的照射前或照射后给药保护效应未表现出明显差别。EGCG 对 X 射线诱导的小鼠肝细胞的脂类过氧化作用有明显的抑制作用^[11], 亦可使沙土鼠脑缺血再灌注氧化损伤的脂类过氧化作用水平下降^[14], 说明 EGCG 对细胞的辐射保护作用的机制之一是 EGCG 有效地清除了活性氧自由基, 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。EGCG 后加药组的药物剂量—存活率曲线与先加药组基本接近, 这表明 EGCG 对细胞辐照后的致死性损伤的修复也有促进作用, 这与文献[15]的结果是一致的。

双链断裂(DSB)是辐射所致细胞死亡的最重要的 DNA 损伤形式, 与细胞存活、染色体畸变、突变、基因组不稳定性以及细胞凋亡均密切相关^[16]。而脉冲电场凝胶电泳是近年来发展成熟的一种灵敏可靠的 DNA 双链断裂的检测方法^[17]。本实验中, 脉冲场凝胶电泳的结果表明, 在 EGCG 的作用下, 受 5Gy γ 射线照射后 L02 细胞 DNA 双链断裂的量明显减少, 从 DNA 损伤的角度验证了 EGCG 的辐射保护作用。

我们对 EGCG 的辐射保护作用同时从微观动态和细胞水平上进行了深入的研究, 证明了其在辐射条件下对细胞的活存有着明显的保护作用, 改变了以往对于 EGCG 辐射保护作用只是抗突变、抗肿瘤形成作用的片面认识。这对于 EGCG 及绿茶饮品的保健应用方向提供了新的启示。

参 考 文 献

- 1 YANG C S, WANG Z Y. J Natl Cancer Inst, 1993, **85**: 1038—1049
- 2 Kada T, Kaneko K, Matsuzaki S *et al*. Mutation Res, 1985, **150**: 127—132
- 3 Fujita Y, Yamane T, Tanaka M. Jpn J Cancer Res, 1989, **80**: 503—505
- 4 Barthelman M, Bair W B, Stickland K *et al*. Carcinogenesis, 1998, **19**: 2201—2204
- 5 Uchida S, Edamatsu R, Hiramatsu M *et al*. Med Sci Res, 1987, **15**: 813—832
- 6 Hartman P E, Shankel D M. Environ Mol Mutagen, 1990, **15**: 145—182
- 7 JIANG Y, YAO S D, LIN W Z *et al*. Sci China(series B), (China) 1998, **41**: 295—300
- 8 Eble M J, Hensley F W, Flentje M. Int J Radiat Biol, 1994, **65**: 193—201
- 9 Anbar M, Neta P. Int Appl Rad And Isotopes, 1967, **18**: 493—523
- 10 Locker A and Flemming K. Radiation protection, chemical compounds and biological means. birkhauser, verlag, basel, 1977, 9—18
- 11 Uchida S, Ozaki M, Suzuki K *et al*. Life Sci, 1992, **50**: 147—152
- 12 郭建霞, 黄少珍, 张丽生 等. 癌症, 1995, **14**: 425—428

- GUO J X, HUANG S Z, ZHANG L S *et al.* *Cancer*, 1995, **14**: 425—428
- 13 范贤骏, 王云霞, 冯索瑜. *中华肿瘤杂志*, 1992, **114**: 190—192
- FAN X J, WANG Y X, FENG S Y. *Chinese J Tumor*, 1992, **114**: 190—192
- 14 方若莹, 俞越汉, 沈公羽 等. *生物物理学报*. 1997, **13**(2): 376—379
- FANG R Y, YU Y H, SHEN G Y *et al.* *Acta Biophys Sini*, 1997, **13**(2): 376—379
- 15 Yoshioka H, Kurosaki H, Yoshinaga K *et al.* *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1997, **61**: 1560—1563
- 16 夏寿萱主编. *分子放射生物学*. 北京: 原子能出版社, 1992, 356—358
- XIA S X. *Molecular radiobiology*, Beijing: Atomic Energy Press, 1992, 356—358
- 17 Ager D D, Dewy W C. *Int J Radiat Biol*, 1990, **19**: 75—81

RESEARCH OF RADIOPROTECTION OF EGCG

LIU Guanshu YAO Side

(*Laboratory of Radiation Chemistry, Shanghai Institute of Nuclear research,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800*)

NI Jin ZHAO Fang MENG Xiangshun

(*The second Military Medicine University, Laboratory of Radiation Medicine Shanghai 200433*)

ABSTRACT The radioprotective effects of a major component of green tea polyphenone, (—) epigallocatechin gallate (EGCG) was examined by using the radiation—induced cell death model in Human—derived liver L⁰2 cells, with the methods of MTT and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). EGCG substantially suppressed the radiation—induced mortality under treatment concentration of 5—50 μ mol/L, where the cytotoxicity was mild. Significant suppression of DNA double strand break (DSB) was also observed with treatment of cells with 50 μ mol/L of EGCG. Both treatment prior to and behind irradiation was effective. It could be suggested that EGCG could either scavenge OH• or repair the damage of DNA of L⁰2 cells effectively.

KEYWORDS Epigallocatechin gallate (EGCG), Human—derived liver L⁰2 cell, Radio—protection, MTT, Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

CLC Q691