

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00633

## 表没食子儿茶素没食子酸酯对 X 线照射大鼠肺损伤及 TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 表达和 SOD 活性的影响

衷敬华<sup>1</sup>, 王 勇<sup>2</sup>, 王祥财<sup>3</sup>, 许明君<sup>3</sup>, 施华球<sup>3</sup>, 王钺力<sup>3</sup>, 姜茂竹<sup>1</sup>, 张积仁<sup>1\*</sup>

1. 南方医科大学珠江医院肿瘤中心, 广州 510282
2. 南方医科大学珠江医院药剂科, 广州 510282
3. 赣南医学院第一附属医院肿瘤科, 赣州 341000

**[摘要]** **目的** 观察表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)对放射线所致大鼠肺损伤的干预作用, 并探讨其可能的作用机制。**方法** 通过 6 MV X 射线复制大鼠放射性肺损伤模型, 随机分为模型对照组及大剂量[200 mg/(kg·d) EGCG]、中剂量[100 mg/(kg·d) EGCG]、小剂量[50 mg/(kg·d) EGCG]干预组, 采用 H-E 及 VG 染色观察肺组织病理变化和胶原沉积情况, 并计算肺泡炎和肺纤维化积分, 免疫组织化学(IHC)染色测定肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF $\alpha$ )、转化生长因子  $\beta$ (TGF $\beta$ ) 的表达水平, 黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性。**结果** 40 d 时模型对照组大鼠出现明显的肺泡炎和肺纤维化, 中、大剂量 EGCG 干预组大鼠肺泡炎和纤维化积分均低于模型对照组( $P < 0.01$ ); EGCG 小剂量组肺泡炎及肺纤维化积分与模型对照组比较差异无统计学意义。10、20、40 d 时, EGCG 中、大剂量组肺组织 TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$  表达均低于模型对照组及 EGCG 小剂量组( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 而 SOD 活性均高于模型对照组及 EGCG 小剂量组( $P < 0.05$ )。**结论** 中、大剂量 EGCG 能减轻放射线所致的肺泡炎和肺纤维化程度, 其机制可能与抑制 TNF $\alpha$  和 TGF $\beta$  的表达、提高 SOD 活性有关。

**[关键词]** 表没食子儿茶素没食子酸酯; 放射性肺损伤; 肿瘤坏死因子  $\alpha$ ; 转化生长因子  $\beta$ ; 超氧化物歧化酶

**[中图分类号]** R 818.841 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2013)06-0633-06

### Effect of epigallocatechin gallate on TNF $\alpha$ and TGF $\beta$ expression, SOD activity and lung injury in rat radiation model

ZHONG Jing-hua<sup>1</sup>, WANG Yong<sup>2</sup>, WANG Xiang-cai<sup>3</sup>, XU Ming-jun<sup>3</sup>, SHI Hua-qiu<sup>3</sup>, WANG Yi-li<sup>3</sup>, JIANG Mao-zhu<sup>1</sup>, ZHANG Ji-ren<sup>1\*</sup>

1. Tumor Center, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China
2. Department of Pharmacy, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China
3. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Gannan Medical College, Ganzhou 341000, Jiangxi, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of epigallocatechin gallate on radiation-induced lung injury in rats and to discuss the related mechanism. **Methods** Rat models of radiation-induced lung injury were produced by 6 MV X ray radiation, and then the animals were divided into model control group and low-, medium- and high-dose (200, 100, 50 mg/[kg·d]) epigallocatechin gallate groups. The pulmonary histopathological changes and collagen disposition were observed by H-E staining and Van Gieson (VG) staining, and the scores of alveolitis and pulmonary fibrosis were calculated. The expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) and transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) in lung tissues was examined by immunohistochemical (IHC) staining. The activity of superoxide dismutase (SOD) was examined by xanthine oxidase method. **Results** Apparent alveolitis and pulmonary fibrosis were observed in model rats at 40 d after radiation, and the scores of the alveolitis and pulmonary fibrosis were significantly lower in medium- and high-dose epigallocatechin gallate groups than in the model control group ( $P < 0.01$ ), and there was no difference between the low-dose epigallocatechin gallate group and the model control group. Pulmonary TNF $\alpha$  and TGF $\beta$  expression was significantly lower in the medium- and high-dose epigallocatechin gallate groups than in the model control group and low-dose epigallocatechin gallate groups at 10 d, 20 d, and 40 d after radiation ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ), while SOD activity in the former two groups were significantly higher compared with those in the model control group and low-dose epigallocatechin gallate groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Medium- and high-dose

**[收稿日期]** 2013-03-05 **[接受日期]** 2013-05-22

**[作者简介]** 衷敬华, 博士生, 主治医师. E-mail: zaijunhao2009@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 020-61643199, E-mail: zhangjiren@126.com

epigallocatechin gallate can ameliorate the alveolitis and pulmonary fibrosis in radiation-induced lung injury in rats, which might be associated with the inhibition of TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  expression and promotion of SOD activity.

[Key words] epigallocatechin gallate; radiation-induced lung injuries; tumor necrosis factor-alpha; transforming growth factor-beta; superoxide dismutase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(6): 633-638]

放射性肺损伤(radiation-induced lung injury)是胸部肿瘤放射治疗的常见并发症,临床上常有两种表现形式:早期急性放射性肺泡炎和后期放射性肺纤维化<sup>[1]</sup>。放射性肺损伤限制了肿瘤的放疗剂量,也使放疗效果大大降低,其发病机制尚不清楚,且缺乏有效的预测指标,已成为有效治疗胸部肿瘤的一大难题。一旦发生放射性肺损伤,目前临床上最常用的治疗方法是使用肾上腺皮质激素联合抗生素。虽然大剂量激素可暂时有效缓解症状,抑制肺纤维化的发展,但容易产生诸多并发症<sup>[2]</sup>。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是绿茶中最有效的抗氧化多酚,具有较强的抗氧化活性,能够保护细胞和DNA免受损害<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现,以EGCG灌服小鼠后,用X线一次性全身照射小鼠,小鼠30 d生存率提高,平均生存期延长,提示EGCG对经辐射的小鼠有保护作用<sup>[4]</sup>。本实验使用EGCG对放射线所致的大鼠放射性肺损伤进行干预,探讨其对放射性肺损伤的保护作用及其机制,为临床应用EGCG防治放射性肺损伤提供实验基础。

## 1 材料和方法

1.1 药物及仪器 EGCG(纯度98%~99%)购自广东省中药研究所,临用前用生理盐水溶解成混悬液。醋酸泼尼松(5 mg/片)由河北恒利集团邢台市制药厂提供(批号H13020502)。FA1004电子分析天平(上海分析天平厂);BX60荧光多功能显微镜(日本Olympus公司);CMIAS 98A图像分析仪(北京航空航天大学)。紫外分光光度计(上海仪器三厂)。

1.2 动物分组及处理 6周龄清洁级雄性Wistar大鼠90只,由南方医科大学实验动物中心提供,体质量(200±20)g。供试前在清洁动物房常规饲养5 d,大鼠饲养环境温度23℃,湿度30%~60%,自然光照。观察无异常纳入实验。称大鼠质量、编号,随机分为6组,即空白对照组、模型对照组、EGCG大剂量[200 mg/(kg·d)]组、EGCG中剂量[100 mg/(kg·d)]组、EGCG小剂量[50 mg/(kg·d)]组和醋酸泼尼松[6.72 mg/(kg·d)]组(阳性对照)。除

空白对照组外,各组均给予X射线全胸单次照射20 Gy。照射方式及条件:大鼠经10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉,平躺于照射台上,下垫10 cm厚等效物,上覆2 cm厚等效膜。用美国瓦里安2300c型直线加速器产生的6 MV X射线等距离照射大鼠全肺,调整照射野上至大鼠前肢两腋窝中点连线,下至剑突水平,照射面积4.5 cm×4 cm,源靶距100 cm,照射剂量为20 Gy(300 cGy/min)。

空白对照组及模型对照组每日腹腔注射生理盐水20 mL/kg,其余各组给予相应的药物,连续40 d。在实施照射后的第10、第20和第40天,每组各随机取5只大鼠,24 h后处死,迅速切取肺标本置于冰盐水中充分洗涤,然后取部分新鲜肺组织,剩余肺组织在10%中性甲醛缓冲液中固定,制作病理蜡块。

1.3 大鼠肺组织病理学观察 采用H-E及VG染色,参照Szapiel等<sup>[5]</sup>的方法确定肺泡炎和肺纤维化的程度,并按照张东伟等<sup>[6]</sup>提供的标准计算肺泡炎和肺纤维化积分。

1.4 免疫组织化学(IHC)染色检测大鼠肺组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )、转化生长因子 $\beta$ (TGF $\beta$ )表达水平 采用链霉亲和素-生物素-酶复合物法(SABC)。一抗为Abcam生物技术公司兔抗鼠多克隆抗体,抗体工作浓度为1:2 000;二抗为福州迈新生物技术开发有限公司通用试剂盒。主要步骤如下:石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>灭活内源性酶,蒸馏水洗3次。热修复抗原,冷却后滴加5% BSA封闭液,室温20 min,甩去多余液体。滴加兔抗TGF $\beta$ 抗体,37℃ 2 h。0.1 mol/L PBS(pH 7.2~7.6)洗2 min×3次。滴加生物素化山羊抗兔IgG,25℃ 20 min。0.1 mol/L PBS洗2 min×3次。滴加SABC试剂,25℃ 20 min。0.1 mol/L PBS(pH 7.2~7.6)洗5 min×4次。DAB显色,苏木精轻度复染。乙醇脱水,二甲苯透明,封片,显微镜观察。以细胞胞质中出现黄色或棕黄色颗粒为阳性反应。用0.1 mol/L PBS代替一抗作阴性对照,已知阳性切片作阳性对照。在图像分析系统上,40倍物镜下,每张切片分别从四周和中间随机选取5个视野,测定肺组织内TNF $\alpha$ 、

TGF $\beta$ 表达颗粒的面积及积分光密度,取其平均值作为该只大鼠肺组织TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 的表达量。

1.5 黄嘌呤氧化酶法测定大鼠肺组织超氧化物歧化酶(SOD)活性 按试剂盒(上海博升生物科技发展有限公司,产品货号:CSOD100-2)说明操作。

1.6 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用析因设计资料的方差分析,多重比较采用LSD检验,等级资料多重比较采用Kruskal-Wallis秩和检验,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

### 2.1 EGCG对放射损伤肺组织病理学的影响

2.1.1 40 d时H-E染色结果 空白对照组:肺组织结构正常(图1A)。模型对照组:肺泡间隔明显增厚,大量炎性细胞浸润,重度纤维组织增生,可见大量成纤维细胞聚集,病变区肺泡结构破坏紊乱,

肺泡间隔变薄或断裂(图1B)。泼尼松组:肺泡间隔略增厚,少量纤维组织增生及炎性细胞浸润,肺泡结构基本正常(图1C)。EGCG小剂量组:肺泡间隔明显增厚,纤维组织增生明显,可见较多炎性细胞浸润及成纤维细胞聚集,部分肺泡结构破坏,肺泡间隔变薄或断裂(图1D)。EGCG中剂量组:肺泡间隔轻-中度增厚,轻度纤维组织增生,可见少量炎性细胞浸润,肺泡结构尚完整(图1E)。EGCG大剂量组:肺泡间隔轻微增厚,少量纤维组织增生及炎性细胞浸润,肺组织形态接近正常(图1F)。定量分析显示,模型对照组、EGCG小剂量组肺泡炎积分均高于空白对照组( $P < 0.01$ ),EGCG小剂量组与模型对照组比较差异无统计学意义;泼尼松组及EGCG中、大剂量组三者之间肺泡炎积分未见明显差异( $P > 0.05$ ),但均低于模型对照组及EGCG小剂量组( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ ),而与空白对照组比较差异无统计学意义(表1)。

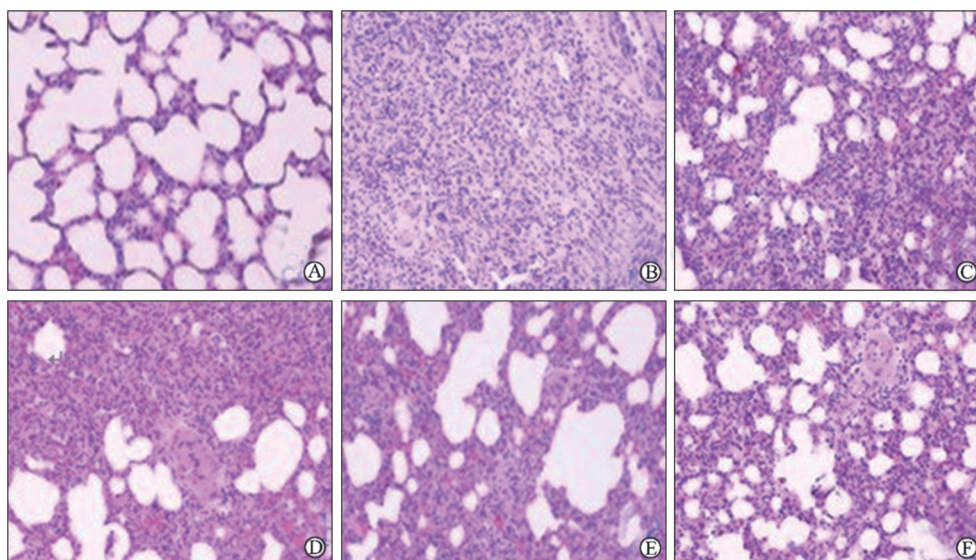


图1 40 d时各组大鼠肺组织病理改变(H-E染色)

Fig 1 Pulmonary pathological changes of rats in each group 40 days after radiation (H-E staining)

EGCG: Epigallocatechin gallate. A: Blank control group; B: Model control group; C: Prednisone group; D:  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  EGCG group; E:  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  EGCG group; F:  $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  EGCG group. Original magnification:  $\times 200$

2.1.2 40 d时VG染色结果 空白对照组:除支气管及血管壁偶有胶原沉积外,肺泡间隔无明显胶原纤维增生。模型对照组:肺泡间隔中可见大量胶原纤维增生。泼尼松组:肺泡间隔中可见少量胶原纤维增生。EGCG小剂量组:肺泡间隔中可见中等量-大量胶原纤维增生。EGCG中剂量组:肺泡间隔中可见少量-中等量胶原纤维增生。EGCG大剂量组:肺泡间隔中可见少量胶原纤维增生。定量分

析显示,模型对照组、泼尼松组及EGCG小、中、大剂量组肺纤维化积分均高于空白对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ );泼尼松组及EGCG中、大剂量组三者之间肺纤维化积分差异无统计学意义,但均低于模型对照组及EGCG小剂量组( $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ );EGCG小剂量组与模型对照组肺纤维化积分差异无统计学意义(表1)。

2.2 EGCG对放射损伤肺组织TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 表达

的影响 由表2和表3可见,在不同时间点,模型对  
照组肺组织 TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$  表达均高于空白对照组,  
差异有统计学意义( $P < 0.01$ );泼尼松组及 EGCG  
中、大剂量组三者之间肺组织 TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$  表达差

异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但均低于模型组和  
EGCG 小剂量组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );  
EGCG 小剂量组与模型对照组 TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$  表达差  
异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 40 d 各组大鼠肺组织肺炎及肺纤维化积分

Tab 1 Alveolitis and pulmonary fibrosis scores of rats in each group 40 days after radiation

$N = 5, \bar{x} \pm s$

Group	Pulmonary fibrosis					Alveolitis				
	-	+	++	+++	Score	-	+	++	+++	Score
Blank control	5	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00	5	0	0	0	0.00 $\pm$ 0.00
Model control	0	0	1	4	5.77 $\pm$ 1.56	0	2	2	1	5.22 $\pm$ 1.53
Prednisone	4	1	0	0	1.45 $\pm$ 1.34** $\Delta$	1	3	1	0	1.30 $\pm$ 1.76** $\Delta\Delta$
High-dose EGCG	3	2	0	0	1.43 $\pm$ 1.34** $\Delta\Delta$	2	3	0	0	1.20 $\pm$ 1.64** $\Delta\Delta$
Medium-dose EGCG	2	2	1	0	2.95 $\pm$ 1.75** $\Delta$	2	2	1	0	2.42 $\pm$ 1.55** $\Delta$
Low-dose EGCG	1	1	3	0	4.64 $\pm$ 1.53	1	1	2	1	4.20 $\pm$ 1.27

EGCG; Epigallocatechin gallate. High-dose: 200 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ ; Medium-dose: 100 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ ; Low-dose: 50 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ . \*\*  $P < 0.01$  vs model control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs 50 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$  EGCG group

表 2 不同时间点各组大鼠肺组织 TNF $\alpha$  表达

Tab 2 Pulmonary TNF $\alpha$  expression at different time points in rats of each group

$n = 15, \bar{x} \pm s$

Group	10 d after radiation		20 d after radiation		40 d after radiation	
	IOD	Area	IOD	Area	IOD	Area
Blank control	3.53 $\pm$ 6.22	14.53 $\pm$ 5.64	6.22 $\pm$ 4.45	32.64 $\pm$ 5.66	8.42 $\pm$ 4.53	54.00 $\pm$ 14.24
Model control	43.32 $\pm$ 6.45	242.73 $\pm$ 47.53	74.53 $\pm$ 23.44	241.00 $\pm$ 66.32	124.52 $\pm$ 73.64	325.52 $\pm$ 134.55
Prednisone	23.25 $\pm$ 5.42**	135.20 $\pm$ 47.53**	34.53 $\pm$ 15.52**	163.42 $\pm$ 64.63**	47.53 $\pm$ 68.54**	215.43 $\pm$ 124.54**
High dose EGCG	25.53 $\pm$ 7.84**	142.53 $\pm$ 54.52**	35.53 $\pm$ 36.53**	174.43 $\pm$ 65.53**	48.55 $\pm$ 64.41**	242.62 $\pm$ 134.55**
Medium dose EGCG	27.12 $\pm$ 2.46**	153.74 $\pm$ 56.65**	38.62 $\pm$ 36.76**	196.55 $\pm$ 63.75**	49.56 $\pm$ 65.43**	263.63 $\pm$ 155.64**
Low-dose EGCG	42.58 $\pm$ 6.42	231.52 $\pm$ 43.75	32.24 $\pm$ 18.34	232.35 $\pm$ 74.65	112.66 $\pm$ 79.52	295.63 $\pm$ 157.45

IOD; Integrated optical density; EGCG; Epigallocatechin gallate; High-dose: 200 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ ; Medium-dose: 100 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ ; Low-dose: 50 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ . \*\*  $P < 0.01$  vs model control group or low-dose EGCG group

表 3 不同时间点各组大鼠肺组织 TGF $\beta$  表达

Tab 3 Pulmonary TGF- $\beta$  expression at different time points in rats of each group

$n = 15, \bar{x} \pm s$

Group	10 d after radiation		20 d after radiation		40 d after radiation	
	IOD	Area	IOD	Area	IOD	Area
Blank control	2.33 $\pm$ 7.23	13.53 $\pm$ 4.63	4.52 $\pm$ 4.52	16.54 $\pm$ 4.64	8.42 $\pm$ 24.53	34.85 $\pm$ 42.23
Model control	19.32 $\pm$ 4.45	223.54 $\pm$ 64.53	34.22 $\pm$ 12.44	421.56 $\pm$ 134.32	55.42 $\pm$ 25.64	742.75 $\pm$ 235.56
Prednisone	10.34 $\pm$ 7.92**	123.46 $\pm$ 47.53**	26.26 $\pm$ 14.53**	242.78 $\pm$ 142.44**	43.43 $\pm$ 25.34**	532.73 $\pm$ 264.63**
High-dose EGCG	12.46 $\pm$ 8.86**	142.62 $\pm$ 64.32**	25.25 $\pm$ 16.53**	263.78 $\pm$ 165.43**	46.52 $\pm$ 24.78**	563.74 $\pm$ 264.52**
Medium-dose EGCG	13.42 $\pm$ 5.53**	163.48 $\pm$ 67.25**	27.82 $\pm$ 16.62**	323.86 $\pm$ 163.45**	47.36 $\pm$ 25.53**	573.32 $\pm$ 285.44**
Low-dose EGCG	19.98 $\pm$ 7.42	211.26 $\pm$ 63.55	32.24 $\pm$ 18.34	412.74 $\pm$ 195.64	52.42 $\pm$ 29.63	683.64 $\pm$ 295.55

IOD; Integrated optical density; EGCG; Epigallocatechin gallate; High-dose: 200 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ ; Medium-dose: 100 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ ; Low-dose: 50 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$ . \*\*  $P < 0.01$  vs model control group or low-dose EGCG group

2.3 EGCG 对放射损伤肺组织 SOD 活性的影响 由表4可见,各时间点模型对照组大鼠肺组织中 SOD 活性与空白对照组比较均下降( $P < 0.05$ ); EGCG 中、大剂量组及泼尼松组大鼠肺组织中 SOD 活性与模型对照组相比均有升高( $P < 0.05$ ),且

EGCG 中、大剂量组高于泼尼松组( $P < 0.05$ ), EGCG 大剂量组高于 EGCG 中剂量组( $P < 0.05$ ), EGCG 中剂量组高于 EGCG 小剂量组( $P < 0.05$ ), 而 EGCG 小剂量组与模型组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表4 不同时间点各组大鼠肺组织SOD活性

Tab 4 Superoxide dismutase (SOD) activity at different time points in rats of each group

 $n=15, \bar{x} \pm s, z_B / (U \cdot \text{mg}^{-1})$ 

Group	Time after radiation $t/d$		
	10	20	40
Blank control	95.82 $\pm$ 3.87	99.13 $\pm$ 5.47	103.50 $\pm$ 6.26
Model control	44.27 $\pm$ 2.62	48.42 $\pm$ 2.13	53.69 $\pm$ 4.01
Prednisone	56.06 $\pm$ 2.06*	66.15 $\pm$ 2.48*	67.75 $\pm$ 2.13*
200 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$ EGCG	86.71 $\pm$ 2.25* $\Delta$	88.74 $\pm$ 2.49* $\Delta$	91.42 $\pm$ 2.69* $\Delta$
100 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$ EGCG	72.03 $\pm$ 3.32* $\Delta$ $\blacktriangle$	76.89 $\pm$ 2.96* $\Delta$ $\blacktriangle$	81.49 $\pm$ 2.96* $\Delta$ $\blacktriangle$
50 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ $\cdot$ d $^{-1}$ EGCG	54.53 $\pm$ 3.52	63.43 $\pm$ 4.53	68.43 $\pm$ 3.63

EGCG: Epigallocatechin gallate. \*  $P < 0.05$  vs model control group;  $\Delta P < 0.05$  vs prednisone group;  $\blacktriangle P < 0.05$  vs 200 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$  or 50 mg  $\cdot$  kg $^{-1}$   $\cdot$  d $^{-1}$  EGCG group

### 3 讨论

EGCG是茶叶的提取物,其主要的药理作用为抗氧化作用,通过清除氧自由基<sup>[7]</sup>,抑制脂质过氧化,改善微循环,减轻氧化应激对细胞的损害<sup>[8]</sup>,起到抗衰老、抗炎<sup>[9]</sup>、抗肿瘤<sup>[10]</sup>的作用。Yoshioka等<sup>[11]</sup>报道,茶叶中的EGCG可以清除 $\gamma$ 射线照射产生OH自由基。他们在另外一项研究中发现,在有和无绿茶提取物(TP)或EGCG的情况下,比较含*E. coli* DNA的pUC18质粒接受 $\beta$ 射线照射后,闭环DNA和DNA交连产生的开环DNA的比率,发现TP和EGCG对照射后DNA交连反应有保护作用,并且呈剂量依赖性,这种对DNA的挽救效应(scavenging effect)是源于对OH自由基的挽救效应<sup>[12]</sup>。这提示EGCG能够帮助清除照射后局部产生的自由基,并且因此减轻了受照射组织DNA的致死性损伤。本实验经放射线照射致大鼠肺纤维化,通过病理H-E染色,模型对照组可见空肺泡间隔明显增厚,重度纤维组织增生,病变区肺泡结构破坏紊乱,肺泡间隔变薄或断裂,而中、大剂量EGCG用药组可见肺泡间隔轻微增厚,少量纤维组织增生及炎性细胞浸润,肺组织形态接近正常,提示中、大剂量EGCG能有效减轻肺纤维化的病变程度。而EGCG小剂量组对肺纤维化大鼠作用不明显,提示临床应用EGCG预防及治疗放疗所致肺纤维化时可能需要较大剂量。

分子生物学研究的不断进展使人们对放射性肺损伤的发生机制深入到细胞因子及其介导的多细胞系统相互作用上。研究表明,电离辐射所致的肺组织损伤的早晚期变化均与“细胞因子瀑布”(cascade of cytokines)学说有关<sup>[13]</sup>。肺受到照射后,肺泡细

胞、纤维细胞、肺泡巨噬细胞会分泌介导放射性肺炎发生的细胞因子,概括分为两类,一类参与急性损伤的因子,主要有IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-4、MCP-1、TNF $\alpha$ 等;另一类参与晚期损伤的因子,主要有PDGF、IGF-1、bFGF、TGF $\beta$ 等。基础和临床研究证实,TNF $\alpha$ 是重要的肺辐射损伤炎症启动因子,在TNF $\alpha$ 的作用下,血管内皮细胞的反应性改变,前列腺素的合成增加,诱导中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞的渗出,启动肺组织炎性反应,此外TNF $\alpha$ 引发IL的合成释放,产生细胞因子的瀑布效应<sup>[14-15]</sup>。TGF $\beta$ 是一种多功能细胞因子,具有调节细胞生长、抑制免疫活性、调节细胞外基质的功能,是组织细胞应答放射性刺激的主要因子,TGF $\beta$ 在趋化炎性细胞维持肺部炎症过程及肺纤维化形成的过程中起重要作用,其水平升高已被视为放射性肺损伤的标志之一<sup>[16]</sup>。本实验结果显示:照射后10、20、40 d,模型对照组肺组织TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 表达均高于空白对照组( $P < 0.01$ );泼尼松组及EGCG中、大剂量组三者之间肺组织TNF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 表达差异无统计学意义,但均低于模型对照组和EGCG小剂量组( $P < 0.01$ )。说明放射线作用可刺激肺组织中TNF $\alpha$ 和TGF $\beta$ 的产生,而泼尼松及中、大剂量EGCG均能抑制TNF $\alpha$ 和TGF $\beta$ 的异常高表达。

放射线所致肺纤维化的机制可能涉及自由基损伤、免疫机制等<sup>[17]</sup>。当发生放射性肺损伤时,电离辐射作用于生物机体,最初的事件就是通过直接作用和间接作用产生自由基,自由基作用于细胞成分,细胞成分损伤的信号启动了细胞信号转导系统,从而导致一系列细胞因子的表达并最终导致细胞死亡、增殖或细胞外基质蛋白产生等事件,并产生临床辐射损伤<sup>[18]</sup>。SOD是一种重要抗氧化酶,能清除超

氧阴离子自由基(O<sup>2-</sup>)而起保护细胞和基质免受氧自由基的损伤,是机体抗氧化损伤防御体系中的第一道防线,其活力的高低可以反映体内自由基的变化情况<sup>[19]</sup>。因此,可以通过SOD活性的检测来评估组织细胞内自由基代谢情况及损伤程度。本实验发现,各时间点模型对照组大鼠肺组织中SOD活性与空白对照组比较均下降(P<0.05);EGCG中、大剂量组及泼尼松组大鼠肺组织中SOD活性与模型对照组相比均有升高,且EGCG中、大剂量组高于泼尼松组,EGCG大剂量组高于EGCG中剂量组,EGCG中剂量组高于EGCG小剂量组,P均<0.05。提示EGCG可提高抗氧化酶SOD活性,进而增强抗氧化作用。

综上所述,EGCG能够减轻大鼠放射性肺损伤,其机制可能与EGCG抑制TNF $\alpha$ 与TGF $\beta$ 表达、提高SOD活性有关。但EGCG的抗氧化特性是一种综合效应,其抗肺纤维化的具体机制还有待进一步实验研究。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] Ghafoori P, Marks L B, Vujaskovic Z, Kelsey C R. Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention [J]. *Oncology (Williston Park)*, 2008, 22:37-47.

[2] 吴开良,李艳如,蒋国梁.放射性肺损伤[J].实用癌症杂志,2001,16:110-112.

[3] Lin Y S, Wu S S, Lin J K. Determination of tea polyphenols and caffeine in tea flowers (*Camellia sinensis*) and their hydroxyl radical scavenging and nitric oxide suppressing effects[J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51: 975-980.

[4] 石卫民,赵新萍,芦 婷.茶儿茶素对小鼠的辐射防护作用[J].南方医科大学学报,2006,26:1621-1622.

[5] Szapiel S V, Elson N A, Fulmer J D, Hunninghake G W, Crystal R G. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse[J]. *Am Rev Respir Dis*, 1979, 120:893-899.

[6] 张东伟,王继峰,牛建昭,金 焕,高宝华,李贡宇.复方鳖甲方对肺纤维化大鼠高分辨率CT影响的实验研究[J].北京中医药大学学报,2003,26:26-30.

[7] 刘 超,陈若芸.儿茶素及其类似物的化学和生物活性研究进展[J].中国中药杂志,2004,29:1017-1020.

[8] 崔 英,黎丹戎,叶司源,梁新强,岳惠芬,唐 凯,等.长期服用茶多酚对人免疫功能和抗氧化作用的初步研究[J].*肿瘤*,2004,24:427-432.

[9] 龚裕强,李雷清,施小燕.茶多酚抗炎作用研究进展[J].*中国急救医学*,2006,26:540-541.

[10] 罗真兰,苏俭生.儿茶素对恶性肿瘤细胞的生物效应[J].*中华临床医师杂志*,2009,3:621-625.

[11] Yoshioka H, Ohashi Y, Akaboshi M, Senba Y, Yoshioka H. A novel method of measuring hydroxyl radical-scavenging activity of antioxidants using gamma-irradiation[J]. *Free Radic Res*, 2001, 35:265-271.

[12] Yoshioka H, Kurosaki H, Yoshinaga K, Saito K, Yoshioka H. Beta ray-induced scission of DNA in tritiated water and protection by a green tea percolate and (-)-epigallocatechin gallate[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1997, 61:1560-1563.

[13] 陈 浩,陶晓南,马万里.放射性肺纤维化中细胞因子的调控机制研究现状[J].*国际呼吸杂志*, 2009, 29: 1115-1119.

[14] Jang S S, Kim H G, Lee J S, Han J M, Park H J, Huh G J, et al. Melatonin reduces X-ray radiation-induced lung injury in mice by modulating oxidative stress and cytokine expression[J]. *Int J Radiat Biol*, 2013, 89:97-105.

[15] Wang J, Xu H W, Li B S, Zhang J, Cheng J. Preliminary study of protective effects of flavonoids against radiation-induced lung injury in mice[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13:6441-6446.

[16] 戴晓芳,伍 钢,刘 莉,喻 杰,丁 乾,赵艳霞,等.血浆TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 及IL-10水平在预测放射性肺炎中的价值研究 [J].*中华放射医学与防护杂志*, 2009, 29:77-79.

[17] Rube C E, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, et al. The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation[J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, 61:1482-1492.

[18] 刘纯杰,王德文,高征兵,龙建银,彭瑞云,谷庆阳,等.细胞因子及其受体在放射性肺纤维化发生中的分子病理机理研究[J].*中华放射医学与防护杂志*, 2000, 20: 391-394.

[19] Fu X L, Huang H, Bentel G, Clough R, Jirtle R L, Kong F M, et al. Predicting the risk of symptomatic radiation-induced lung injury using both the physical and biologic parameters V<sub>30</sub> and transforming growth factor beta [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2001, 50:899-908.

[本文编辑] 孙 岩