



灵芝酸A对人肝癌细胞的辐射增敏效应的初步研究

邵长胜 张群霞 汪建业 黄青

Preliminary Research on the Radiation Sensitizing Effect of *Ganoderic acid A* on Human Hepatoma Cells

SHAO Changsheng, ZHANG Qunxia, WANG Jianye, HUANG Qing

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.37.2019055>

引用格式:

邵长胜, 张群霞, 汪建业, 黄青. 灵芝酸A对人肝癌细胞的辐射增敏效应的初步研究[J]. *原子核物理评论*, 2020, 37(1):97-103. doi: 10.11804/NuclPhysRev.37.2019055

SHAO Changsheng, ZHANG Qunxia, WANG Jianye, HUANG Qing. Preliminary Research on the Radiation Sensitizing Effect of *Ganoderic acid A* on Human Hepatoma Cells[J]. *Nuclear Physics Review*, 2020, 37(1):97-103. doi: 10.11804/NuclPhysRev.37.2019055

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

和厚朴酚对非小细胞肺癌细胞的辐射增敏效应

Radiosensitizing Effect of Honokiol on Non-small Cell Lung Carcinoma Cells

原子核物理评论. 2019, 36(1): 104-110 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.01.104>

氧化钆纳米粒子对A549肺癌细胞的辐射增敏效应研究

Radiosensitizing Effect of Gadolinium Oxide Nanoparticles on Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cells

原子核物理评论. 2019, 36(3): 373-378 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.03.373>

羧甲基- β -1,3-葡聚糖对人肝癌HepG2细胞的放射增敏作用

Effects of Carboxymethyl- β -1,3-glucan on Human Hepatoma HepG2 Cells Radiosensitivity

原子核物理评论. 2017, 34(4): 797-802 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.34.04.797>

金纳米粒子对黑色素瘤细胞的重离子辐射增敏效应研究

Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles on Melanoma Cells Under Heavy Ion Irradiation

原子核物理评论. 2019, 36(4): 492-498 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.36.04.492>

碳离子辐照对神经胶质瘤干细胞杀伤的研究

Study of Carbon-Ion Irradiation Killing Glioma Stem Cells

原子核物理评论. 2017, 34(2): 231-235 <https://doi.org/10.11804/NuclPhysRev.34.02.231>

文章编号: 1007-4627(2020)01-0097-07

灵芝酸 A 对人肝癌细胞的辐射增敏效应的初步研究

邵长胜^{1,2}, 张群霞^{1,2}, 汪建业³, 黄青^{1,2,†}

(1. 中国科学院合肥物质科学研究院技术生物与农业工程研究所, 合肥 230031;

2. 中国科学技术大学, 合肥 230027;

3. 中国科学院核能安全技术研究所, 合肥 230031)

摘要: 本研究旨在初步探讨灵芝酸 A(GAA) 对人肝癌细胞系 HepG2 在高 LET 中子和低 LET 的 γ 射线条件下的辐射敏感性的影响及差异。研究中, 我们用 CCK-8 方法检测不同浓度 GAA 对 HepG2 增殖抑制作用。选取低浓度 ($5\mu\text{mol/L}$) GAA 预处理细胞 24h, 分别给予不同剂量的中子辐照或 γ 射线辐照, 分别检测克隆存活率、细胞凋亡和 γH2AX 蛋白的 foci 的形成。结果表明: 在不加 GAA 的情况下, 高 LET 中子辐射比低 LET 的 γ 射线对细胞产生的凋亡比例高; 在添加了 GAA 后, 与未加 GAA 对照组相比, 诱导细胞凋亡的比例明显增加; 另外, 加 GAA 处理后, 细胞增殖抑制率也随着辐照剂量的增加而增高。即 GAA 能增加 HepG2 细胞的辐射敏感性, 而在同样 GAA 剂量下, HepG2 细胞对高 LET 中子辐射比低 LET 的 γ 射线更敏感。由此, 这项研究说明灵芝酸或可开发成为一种天然辐射增敏剂, 从而为癌症特别是肝癌的放疗提供新的辅助治疗方法。

关键词: 灵芝酸; 肝癌细胞; 中子; γ 射线; 辐射增敏; 线性能量传递(LET); 辐射

中图分类号: R730.55; R96

文献标志码: A

DOI: 10.11804/NuclPhysRev.37.2019055

1 引言

癌症被认为是细胞的不受控制的增殖, 并且细胞的增殖和凋亡活性之间的这种不平衡是一系列遗传变化的结果^[1]。肝细胞癌是全世界最常见的癌症之一, 在中国患病率特别高^[2]。手术切除和肝移植是肝癌传统治疗的主要手段^[3]。当前, 放射疗法被广泛用于肝癌患者的治疗^[4]。然而, 放射疗法的应用和功效是有限的, 因此需要辅助化学治疗剂来提高患者的存活率。由于其毒性和副作用, 大多数可用的天然或合成化合物在临床上均不成功^[5]。因此, 仍然迫切需要寻找有效且安全的肝癌预防和治疗的药物。

灵芝是一种药用菌, 是一种名贵的传统中医药, 有“仙草”的美称, 在我国及一些东亚国家(如日本和韩国)使用了 2000 多年^[6]。灵芝具有抗炎、镇痛、镇静、抗衰老、抑制肿瘤细胞、抗缺氧等功效, 通常在临床上用作膳食补充剂或药剂治疗多种疾病, 而多糖和三萜类化合物是其两个主要的药理活性成分^[7]。灵芝多糖因其具有调节免疫的功效而被研究和报道。最近, 本课题组在灵芝多糖研究方面也开展了一些工作^[8-9]。而三萜类

化合物是灵芝中起到抗癌、产生细胞毒性等多重效能的天然有机化合物药用成分^[10-11]。迄今为止, 已从灵芝属菌株中分离并鉴定出 300 多种不同的三萜类化合物, 其中灵芝酸 A(GAA) 是最早鉴定出的三萜类化合物之一^[12]。最近的研究表明, GAA 通过抑制癌细胞生长、诱导凋亡等方式, 对人骨肉瘤^[13], 淋巴瘤^[14], 脑膜瘤^[15]和乳腺癌细胞^[16]表现出抗肿瘤活性。此外, 研究还发现 GAA 还可以增强 HepG2 细胞(一种典型的肝癌细胞)对顺铂的化学敏感性^[17]。

虽然目前关于灵芝三萜药理作用研究很多, 但是关于电离辐照条件下它对细胞的作用及效应还鲜有研究报道。已有一些报道可能涉及相关研究, 如: 雷公藤红素(三萜类物质)可以提高肺癌细胞的辐射敏感性^[18], 黄芪三萜对肝癌细胞有一定毒性作用^[19], 但是具体关于灵芝三萜对细胞辐射敏感性的影响及作用机理还不清楚。因此, 本文就灵芝酸对癌细胞辐射增敏性影响拟进行初步探讨和研究。在研究中, 我们主要考察 GAA 对人典型肝癌细胞 HepG2 在辐射下的影响, 并采用中子辐射和 γ 射线这两种电离辐照方式。其中, 中子是不带电的中性粒子, 它代表一种中性的、高 LET 粒子辐射方式,

收稿日期: 2019-10-23; 修改日期: 2019-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(11635013, 11775272)

作者简介: 邵长胜(1987-), 男, 安徽固镇县人, 博士研究生, 从事辐射生物学效应研究; E-mail: scs1987@mail.ustc.edu.cn

† 通信作者: 黄青, E-mail: huangq@ipp.ac.cn.

而 γ 射线代表一种典型的中性、低 LET 的电磁辐射方式,也是临床放疗的常见放疗手段。通过这项研究,我们期望发现或验证灵芝酸在辐射作用条件下的新功能,或可为癌症放疗辅助治疗提供新的材料、方法和依据。

2 实验材料和方法

2.1 细胞的培养和准备

人肝癌 HepG2 细胞购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 DMEM 高糖培养基中,在 37℃、体积分数为 5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。细胞呈贴壁生长,当细胞汇合度达到 80% 左右时,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取处在对数生长期的细胞进行实验。

2.2 辐照条件

辐照共分成两种方式,第一种是 HINEG 中子辐照。本实验利用中国科学院核能安全技术研究所/FDS 凤麟核能团队的强流氘氟中子源科学装置 HINEG 产生的 14 MeV 单能中子进行辐照^[20]。HINEG 中子源强达 6.4×10^{12} n/s。在辐照试验前,加速器关闭状态时将照射样品摆放完毕。所有接受辐照的样品竖直放置在塑料泡沫板上,与中子靶点呈 90° 垂直。样品摆放完毕,测量培养瓶细胞贴壁面距离靶点的距离,测量距离 3 次然后取平均值。根据法诺定理,处于均匀的不带电粒子辐射场中的均匀电离室的空腔可以扩大而仍保持空腔与室壁中的次级带电粒子注量相等^[21]。中子在照射过程中可与培养瓶发生作用,在带电粒子平衡条件下,则该处的物质的比释动能 K 就等于此处物质的吸收剂量。培养瓶的主要成分是聚苯乙烯,通过聚苯乙烯的分子式以及中子 (14 MeV) 能量,可得细胞照射点的中子注量-比释动能换算系数 $[(\mu k/\rho) \times E]$ 为 $5.65 \times 10^{-15} \text{ m}^2 \cdot \text{J}/\text{kg}$, $D = K = \Phi \times (\mu k/\rho) \times E$ 。式中, D 为吸收剂量; K 为比释动能; Φ 为中子注量; $\mu k/\rho$ 为比释动能换算系数; E 为中子能量。通过监测累计中子产额,可以计算出不同组细胞的吸收剂量。

第二种是 γ 射线辐照。采用 BIOBEAM GM2000 型 γ 射线辐照仪(Gamma-Service Medical, 德国),放射源是¹³⁷Cs 密封源,剂量率为 2.5 Gy/min。该源在辐照过程中使样品升降和旋转保证受照均匀,辐照时无需任何特殊处理。

2.3 实验分组

实验一共分成 8 组。空白对照组(Sham),不同辐

照剂量组(0.3, 0.6, 1.2 Gy),加药对照组(0 Gy+ 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GAA)及不同辐照剂量下加药组(0.3 Gy, 0.6 Gy, 1.2 Gy+ 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GAA)。根据两种辐照方式(中子和 γ 射线),分别进行实验。GAA 从 MCE (Med Chem Express) 公司购买所得。

2.4 细胞活性检测

将对数生长期的 HepG2 细胞制成单细胞悬液,取 100 μL 细胞悬液于 96 孔板的孔中 (3000 个细胞/孔),过夜培养,待细胞贴壁后,弃去原培养液,向各加药组细胞分别给予不同浓度的 GAA (终浓度分别为 0, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$),另外设置空白对照组和加药对照组,每组设置 3 个复孔,培养 24 h 后进行检测,向每孔中加入 10 μL CCK-8 (同仁化学,日本)溶液。将 96 孔板在 37℃ 培养箱内孵育 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值,重复实验 3 次,取平均值。

2.5 细胞克隆存活率测定

经 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 GAA 预处理 24 h 后细胞分别进行中子照射和 γ 射线辐照,吸收剂量为 0.3, 0.6, 1.2 Gy。电离辐射后,消化细胞并计数。取一定数目的细胞接种于 60 mm 的培养皿中,置于 37℃ 培养 2 周左右,弃掉培养基,后用 PBS 清洗两遍,甲醇固定 15 min,用 8% Giemsa 染色,计数大于 50 个细胞的集落数。细胞克隆存活曲线采用线性二次模型方程 $Y = \exp[-1 \times (\alpha \times X + \beta \times X^2)]$ 进行拟合。式中, X 为辐照剂量; Y 为存活分数; α, β 为细胞放射生物学参数,可由 Graphpad 8 统计软件求出。

2.6 细胞凋亡检测

细胞凋亡检测取对数生长期的 HepG2 细胞,制成单细胞悬液,接种细胞于 35 mm 培养皿中,过夜培养,贴壁后弃去原培养液,更换含有 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GAA 的 DMEM 培养基,置入培养箱继续孵育 24 h; 然后对细胞分别进行中子照射和 γ 射线辐照,吸收剂量都是 0.3, 0.6, 1.2 Gy; 辐照结束后继续培养 24 h 进行凋亡检测。按凋亡试剂盒 (BD, 美国) 说明书进行操作,收集细胞, PBS 洗涤细胞 2 次,加入 100 μL Annexin V Binding Buffer 使细胞悬浮,再加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μL 的碘化丙啶 (PI),混匀;避光、室温反应 30 min 后,通过流式细胞仪 (Beckman, 美国) 检测细胞凋亡率。用 CytExpert (Beckman, 美国) 软件进行分析。

2.7 γ H2AX 免疫荧光检测

将细胞接种于含有无菌细胞爬片的 12 孔板中 (2 \times

10^4 个细胞/孔), 每组重复 3 次。于 12h 后更换含有 $5 \mu\text{mol/L}$ GAA 的培养基, 放入培养箱继续孵育 24h; 然后对细胞分别进行中子照射和 γ 射线辐照, 剂量为 0.3 Gy , 于 6h 后采用 4% 多聚甲醛固定 10min, 2% BSA+0.3% Triton X100 封闭液室温封闭 2h, $\gamma \text{ H2AX}$ 一抗 (1:500) 4°C 过夜孵育, PBS 清洗 3 次, 每次 5min, 荧光二抗 (1:500) 室温孵育 2h, 用 PBS 清洗 5 次, 滴加含有 DAPI 的抗荧光淬灭剂后进行封片。激光共聚焦荧光显微镜下观察 $\gamma \text{ H2AX}$ 焦点形成, 并计数。

2.8 数据统计

每个辐照实验重复 3 次, 并且每次试验设置了 3 个平行组, 每组样品进行凋亡检测至少为 3 次, 试验结果统计后算得平均值, 3 次辐照实验的平均值以 Turkey 多重比较检验对照。实验数据资料的组间差异分析均采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为统计具有显著性差异。统计和绘图均通过 Graphpad 8 软件完成。

3 实验结果

3.1 GAA 对细胞活性的影响

GAA 对肝癌细胞 HepG2 增殖活力的影响使用 CCK-8 进行检测。结果发现, GAA 可以抑制细胞生长, 并表现为浓度依赖性, 随药物浓度 ($0 \sim 40 \mu\text{mol/L}$) 的增加呈活性抑制趋势。通过计算得到 IC_{10} 约为 $(5 \pm 0.2) \mu\text{mol/L}$, 以下实验我们统一使用 $5 \mu\text{mol/L}$ 浓度作为后续辐照实验的药物干预浓度, 见图 1。

3.2 GAA 对辐照后细胞克隆存活率的影响

非药物处理组细胞在两种辐照方式下, 克隆存活率有一定差异。中子辐照 1.2 Gy 剂量组细胞存活显著低于 γ 辐照 1.2 Gy 剂量组细胞存活。而使用 $5 \mu\text{mol/L}$ 浓度

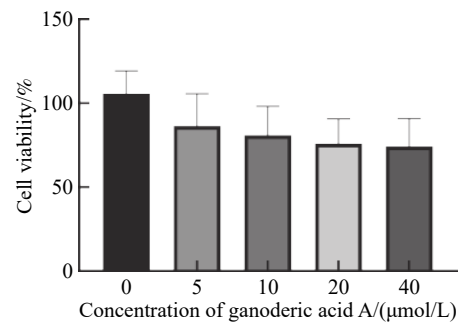


图 1 GAA 对 HepG2 细胞活性的抑制作用结果

GAA 预处理的细胞在中子辐照和 γ 辐照后, 细胞存活率均随辐照剂量的增加而减少, 表现出辐照剂量依赖性, 见图 2。经过 $5 \mu\text{mol/L}$ 浓度 GAA 处理通过两种方式辐照后, 其诱导的细胞克隆存活率均显著低于相应的对照组。通过统计各实验组的细胞存活分数 (SF 值), 将 γ 辐照组的 SF 的平均值比上中子辐照组的 SF 平均值, 得到其相对生物学效应 (RBE) 值。计算得到, 对照组的中子 RBE 值为 1.57, GAA 处理组中子 RBE 值为 1.65。结果表明, 通过添加 GAA 处理细胞, 均能显著降低两种辐照条件下的克隆存活率, 具有增加辐射敏感性的作用。

3.3 GAA 对辐照细胞凋亡的影响

通过使用流式细胞术检测经 γ 射线或中子辐照后 24h 时肝癌细胞的凋亡情况。在 GAA 未处理细胞的情况下, 高 LET 中子辐照对 HepG2 细胞的凋亡比例随着辐照剂量的增加而显著性增加; 同时, 在 γ 射线辐照细胞后, 凋亡比例有一定增加, 但差异性不显著, 见图 3。

在 GAA 预处理细胞的条件下, 分析辐照后 24h 时细胞凋亡的变化比例。结果显示, 高 LET 中子辐照对 HepG2 细胞的凋亡比例随着辐照剂量的增加而增加,

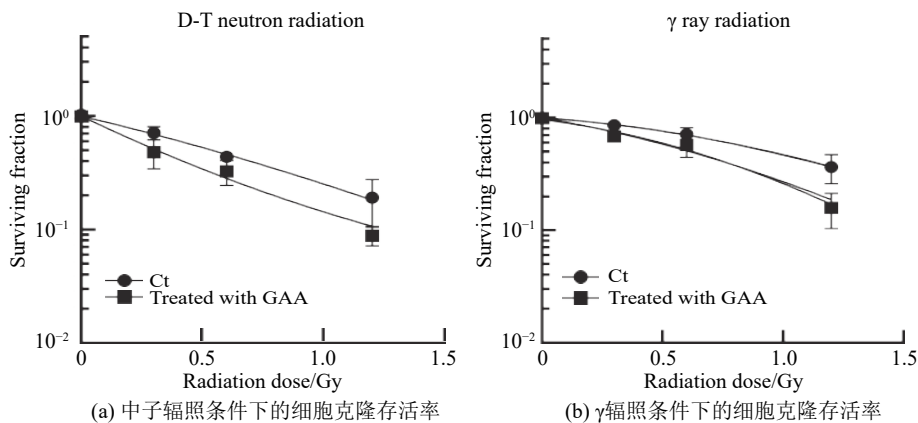


图 2 GAA 对辐照后细胞的增殖抑制影响

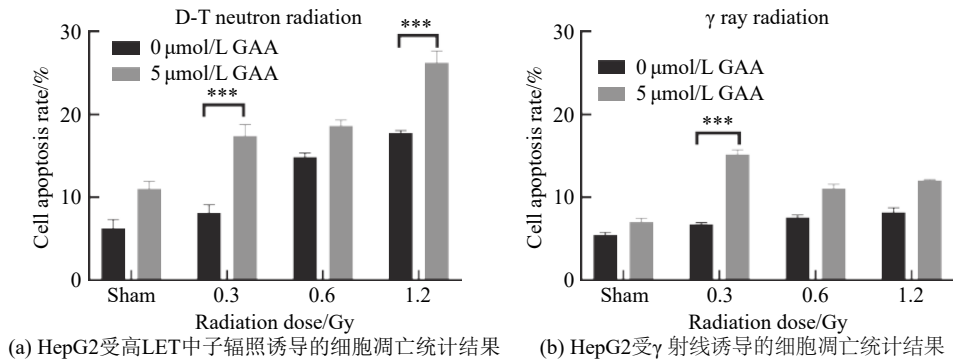


图 3 两种辐照方式下 GAA 对细胞凋亡的影响

并且发现在 0.3 Gy 时，加 GAA 组与未加药组相比，加药处理组凋亡比例显著性多于未加药组；而在 γ 射线辐照细胞后，也发现在 0.3 Gy 剂量下，GAA 组与未加药组相比，细胞凋亡比例有显著性增加。通过流式检测发现，高 LET 中子辐照组细胞的凋亡比例是显著高于 γ 射线辐照组，这也与中子具有高 LET 特性是相吻合的。

3.4 GAA 对辐射诱发细胞 DNA 双链断裂损伤的影响

荧光显微镜下观察 γH2AX 的 foci 形成，并计数。

在非辐射对照组中，也有少量的 γH2AX 蛋白的 foci 形成。在辐照组细胞中表达 γH2AX 的数量较非辐照组显著性增多。在中子辐照条件下，GAA 预处理细胞组与未加药处理组相比，γH2AX 的 foci 形成显著性增多 ($P < 0.05$)；在 γ 射线辐照条件下，GAA 预处理细胞组与未加药处理组相比，γH2AX 的 foci 形成增多但差异性不显著。通过比较两种辐照条件下的 γH2AX 的 foci 形成数量，发现中子辐照条件下的 γH2AX 的 foci 形成数量比 γ 射线辐照条件下的数量显著性增多，如图 4 所示。

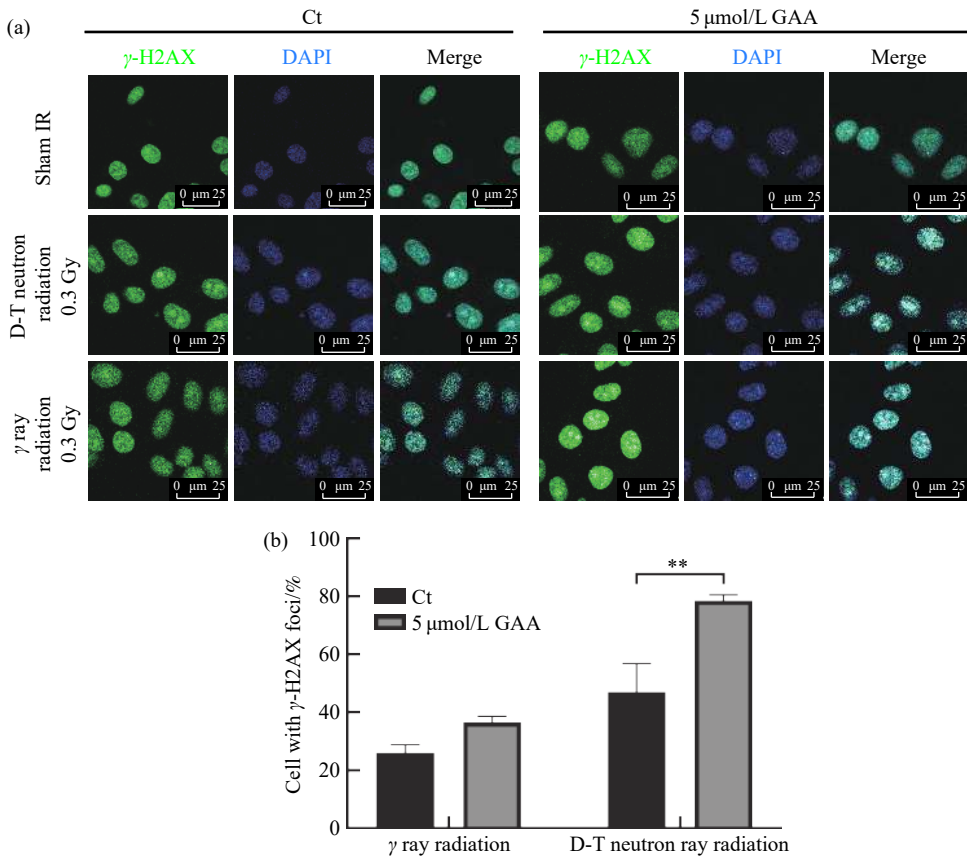


图 4 (在线彩图) 两种辐照方式下 GAA 对细胞 DNA 损伤修复的影响 (a) 荧光显微镜下观察 γH2AX 的 foci 形成；(b) γH2AX 的 foci 形成数量的统计图。

4 讨论

近年来,大量研究发现我国传统中药中有很多成分对肿瘤有很好的杀伤和辅助治疗作用。灵芝作为我国传统中医药的药用菌,包含的天然化合物的药用用途非常广泛,其中灵芝酸也有抗癌等功效,如:有研究显示灵芝在小鼠模型中具有抗癌活性,并且在体外研究中具有细胞毒性作用^[22],口服灵芝三萜提取物可显著降低暴露于致癌物的小鼠的结肠肿瘤形成和炎症^[23],灵芝提取物处理癌细胞可下调细胞周期相关蛋白,从而导致细胞周期停滞^[24],灵芝三萜使HCT-116 p53^{+/+}(野生型)细胞停滞在G1期,而HCT-116 p53^{-/-}缺失型细胞周期停滞在S/G1期,证明了三萜物质可能通过P53基因阻滞细胞周期从而抑制细胞增殖^[25]。但是因为灵芝酸种类多,研究过程中提纯和分析有一定的难度^[26-27],所以要准确阐明各种灵芝酸的功效及药理还有一定难度。此外,人们发现灵芝与放疗相结合,可以对肿瘤治疗有着很好的辅助作用^[28],但是有关机理尚待阐明,而灵芝酸是否在此过程起作用也不清楚。我们在调研中发现,有研究报道指出GAA可以增强HepG2细胞对顺铂的化学敏感性^[17]。受此启发,我们提出,灵芝酸对辐射敏感性是否也有类似增强效果呢?为此,我们对GAA对肝癌细胞辐射敏感性的影响开展了初步研究。

通过研究,我们揭示了GAA的辐射增敏作用。实验结果表明:(1)在不加GAA的情况下,不同辐射方式的生物效应不同。在小辐照剂量范围内,中子辐照相对于 γ 射线辐照对肝癌细胞引发的细胞损伤更强,诱导的细胞凋亡比例较多。(2)在添加了GAA后,与未加GAA对照组相比,诱导细胞凋亡的比例明显增加;特别是在中子辐照条件下,发现在0.3Gy剂量下调亡比例显著增加了40%,并随着剂量的增加凋亡比例进一步增加(如:在1.2Gy条件下凋亡比例与对照相比,显著增加了50%);同样,在 γ 射线辐照下,添加GAA后对细胞的辐射损伤增大,尤其在0.3Gy辐照剂量下,加药处理细胞后细胞凋亡比例显著性上升。同样,通过检测细胞克隆存活率,我们也发现在辐射Sham对照组中,细胞克隆存活率随着辐照剂量的增加而显著降低;加GAA预处理细胞后进行辐射,发现细胞的克隆存活率也随着辐照的剂量的增加而降低。这与我们检测到的细胞凋亡的实验结果一致。

研究中,我们使用了粒子辐射和电磁辐射两种不同形式的辐照方式,并对此加以比较。其中,中子辐照是粒子辐照方式,中子是不带电荷的中性粒子,它的穿透力非常强。硼中子俘获疗法(BNCT)也是中子临床治疗

肿瘤的较好的方法^[29]。也有报道使用高能DT融合中子发生器,研究了暴露于融合辐射下的正常人成纤维细胞中的DNA损伤及其调控^[30]。而 γ 射线是一种高能电磁波,可以通过多种放射性核素释放,也具有较强的穿透力,是临床上常用的放疗手段^[31]。有关 γ 射线辐射生物学研究报道较多,如 γ 射线缩短小鼠的寿命等^[32]。对于原核生物, γ 射线也会对细菌细胞的DNA造成损伤和产生毒性^[33]。显然,对于不同的辐射方式,辐射生物效应也是不同的。为了定量比较,一般可以用辐射的高线性能量转移值,即LET值加以区别。相比 γ 射线,中子属于高LET辐射方式,其LET数值为20keV/ μm ,而 γ 射线是低LET辐射,LET数值为0.4keV/ μm 。在相同辐照剂量下,高能中子的LET是 γ 射线的50倍。高LET辐射在能量沉积上有Bragg峰的特点^[34-35]。因此,中子辐照和 γ 射线在GAA作用下的辐射生物学效应差异是可以理解的。

通常人们用DNA损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及相关信号通路转导等考察和分析细胞辐射敏感性^[36]。本工作还初步探讨了GAA对辐射敏感性的影响及相应的早期过程和效应,特别是对凋亡的影响,而凋亡检测是研究辐射生物学效应的重要方法之一,也可以作为生物学效应的早期过程的一个评判标准^[37-38]。关于早期过程,它可以从原初的物理化学过程一直到包括细胞特征性的辐射生物学效应(包括凋亡)出现。而早期效应甚至是指受到照射后数周之内发生的效应^[39]。凋亡过程包括一系列的特定的细胞形态学变化。这些形态学变化中常伴随着生物化学反应的发生,如:起始Caspase酶和效应Caspase酶的激活、线粒体细胞色素C的释放、质膜磷脂酰丝氨酸的外化、多聚(ADP-核糖)聚合酶PARP的降解和核DNA的断裂等^[40]。以辐照后的细胞存活率作为生物学终点,研究GAA对辐照后细胞的辐射敏感性。通过分析实验结果,发现在中子辐照和 γ 射线辐照条件下,通过添加GAA后能够增加细胞的辐射敏感性。另外,我们也初步分析了加药后对辐射条件下肿瘤细胞的DNA损伤修复的影响,通过添加5 $\mu\text{mol/L}$ 的GAA预处理细胞后,在两种辐照条件下均照射0.3Gy的剂量,发现肿瘤细胞的 γH2AX 蛋白的foci形成均有显著性的增加现象,说明在0.3Gy剂量下添加GAA对肿瘤细胞有一定的增加辐射敏感性作用,这个现象也与凋亡检测的结果较一致,推测可能灵芝酸能通过介导细胞凋亡信号通过促进细胞凋亡,在低剂量辐射条件下出现超敏现象^[41]。

在本研究中还发现,每组HepG2细胞在两种辐照方式下吸收相同剂量的辐照,但是出现了不同的凋亡比

例的变化。对于不同辐射方式, 相对生物效应来说, 更合适的一种比较方式是采用相对生物效应 (RBE) 进行比较, 因为 RBE 值更能反映出实验中辐射引起生物效应的实质变化。我们参考郭传玲等^[42]提供的 RBE 值计算方法, 通过计算各自的存活分数 (SF 值) 后, 将 γ 辐照组的 SF 平均值比上中子辐照组的 SF 平均值, 可以得到中子的 RBE 值。其中对照 Ct 组中子的 RBE 值是 1.57, 而 GAA 处理组的中子 RBE 值是 1.65。通过查阅文献进行比较, 发现 Kim 等^[43]的实验结果里中子辐照与 γ 射线进行对比后计算 RBE 值, 其中 U2OS 细胞的中子 RBE 值为 1.8, KHOS/NP 细胞的中子 RBE 值是 1.55。Vandersickel 等^[44]的研究结果中, 与 X 射线相比 Ku70i 细胞的中子 RBE 值是 1.95。徐照等^[45]研究发现中子辐照与 γ 射线相比, 通过计算得到高能中子的 RBE 平均值是 1.25。本实验所得的对照组的 RBE 值是 1.57, 加药处理细胞组的 RBE 值是 1.65。通过与前人的文献进行对比后, 我们所得的 RBE 结果是比较接近的。RBE 值并不是固定的, 它与细胞种类、参照辐照的选择等都有关系^[42]。另外, 在灵芝酸药物浓度的选择上, 我们考虑到体外实验测定药物放射增敏作用时, 通常采用不敏感、低细胞毒性的药物浓度即 (IC₁₀ 值) 进行放射增敏实验。这种浓度选择方法, 在放射增敏剂对多种肿瘤细胞系放射增敏研究中得到采用^[46]。所以我们采用 IC₁₀ 值 (5 μ mol/L) 的药物浓度进行两种辐射条件下 GAA 对肝癌细胞放射敏感性的研究。

总之, 通过本研究, 我们发现灵芝酸预处理肿瘤细胞后, 在高 LET (高能中子辐照) 和低 LET (γ 射线辐照) 的条件下均有促进肿瘤细胞凋亡的现象, GAA 在低剂量辐照条件下有较好的放射增敏作用。由于乏氧癌细胞对射线较为敏感, 具有较高传能线密度的中子射线也可以用于放射治疗中具有一定的优势。肝癌细胞放疗敏感性低, 易产生放射抗性, 而加大放射治疗的剂量不仅会使肝癌细胞产生耐受, 而且会加重患者的并发症和副作用。虽然我们这项研究工作刚刚起步, 其中还有许多机理方面的问题待进一步研究, 但是就目前观察到的现象已经显示灵芝作为一种天然药物或可为癌症放疗辅助使用, 即灵芝酸有潜力成为一种低毒有效的放射增敏剂辅助用于临床; 同时, 这项工作也为下一步开展机理研究提供了一定的依据和线索。

参考文献:

- [1] QU Yanbo, LIAO Zhixin, LIU Chao, et al. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2018, 100: 407.
- [2] BOSCHF X, RIBES J, DÍAZ M, et al. *Gastroenterology*, 2004, 127(5): S5.
- [3] XU Zhengong, CHEN Lingli, GU Wangwen, et al. *Biomaterials*, 2009, 30(2): 226.
- [4] GALLICCHIO R, NARDELLI A, MAINENTI P, et al. *Bio-Med Research International*, 2016, 2016: 1.
- [5] IKEDA K. *Hepatology Research*, 2019, 49(1): 14.
- [6] BISHOP K, KAO C, XU Y, et al. *Phytochemistry*, 2015, 114: 56.
- [7] CHENG P, PHAN C, SABARATNAM V, et al. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, 2013: 1.
- [8] MA Yuhan, ZHANG Qianqian, ZHANG Qifu, et al. *PLoS One*, 2018, 13(9): e204266.
- [9] MA Yuhan, HE Huaqi, WU Jingzhu, et al. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 10.
- [10] KAO C, JESUTHASAN A, BISHOP K, et al. *Functional Foods in Health and Disease*, 2013, 3(2): 48.
- [11] THYAGARAJAN A, JEDINAK A, NGUYEN H, et al. *Nutrition and Cancer*, 2010, 62(5): 630.
- [12] CHANG T, KO H, WANG T, et al. *Fermentation*, 2018, 4(4): 101.
- [13] SHAO Jianli, LI Zhizhong, JIAO Genlong, et al. *Journal of Southern Medical University*, 2015(5): 619. (in Chinese) (邵建立, 李志忠, 焦根龙, 等. *南方医科大学学报*, 2015(5): 619.)
- [14] RADWAN F, HOSSAIN A, GOD J, et al. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, 116(1): 102.
- [15] DAS A, MILLER R, LEE P, et al. *Tumor Biology*, 2015, 36(9): 7027.
- [16] JIANG Jiahua, GRIEB B, THYAGARAJAN A, et al. *International Journal of Molecular Medicine*, 2008, 21(5): 5774.
- [17] YAO Xiangyang, LI Guilin, XU Hui, et al. *Planta Medica*, 2012, 78(16): 1740.
- [18] LEE J, CHOI K, SEO W, et al. *International journal of molecular medicine*, 2011, 27(3): 441.
- [19] NANDI S, CHANDRA S, SIKDER R, et al. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(27): 7660-7673.
- [20] WU Yican. *International Journal of Energy Research*, 2018, 42(1): 68.
- [21] TIAN Zhiheng. *Radiation Dosimetry*[M]. Beijing: Atomic Energy Press, 1992: 126. (in Chinese) (田志恒. *辐射剂量学*[M]. 北京: 原子能出版社, 1992: 126.)
- [22] WACHTEL-GALOR S, BENZIE I. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*[M]. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2011.
- [23] SILVA D, DILANI D, RAPIOR S, et al. *Fungal Diversity*, 2012, 55(1): 1.
- [24] JEDINAK A, THYAGARAJAN-SAHU A, JIANG J, et al. *International journal of oncology*, 2011, 38(3): 761.
- [25] CHEN Nianhong, ZHONG Jianjiang. *Process Biochemistry*, 2009, 44(8): 928.
- [26] ZHANG Qianqian, HUANG Qing. *Journal of Fungal Sciences*, 2018, 37(12): 1792. (in Chinese) (张倩倩, 黄青. *菌物学报*, 2018, 37(12): 1792.)
- [27] YAO Guohua, MA Yuhan, MUHAMMAD M, et al. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 210: 372.
- [28] PILLAI T, MAURYA D, SALVI V, et al. *Annals of Transla-*

- tional Medicine, 2014, 2(2): 13.
- [29] MIRZAEI H, SAHEBKAR A, SALEHI R, et al. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2016, 12(2): 520.
- [30] YANG Xiaoyao, LIU Hui, JIANG Xu, et al. *International Journal of Molecular Medicine*, 2018, 42(4): 1945.
- [31] JOHNSON R. *Reports on Progress in Physics*, 2018, 81(1): 16701.
- [32] UPTON A, RANDOLPH M, CONKLIN J. *Radiation Research*, 1967, 32(3): 49.
- [33] MIN J, LEE C, GU M. *Radiation and Environmental Biophysics*, 2003, 42(3): 189.
- [34] JIN Xiaodong, LI Qiang, WU Qingfeng, et al. *Nuclear Physics Review*, 2010, 26(02): 202. (in Chinese)
(金晓东, 李强, 吴庆丰, 等. *原子核物理评论*, 2010, 26(02): 202.)
- [35] KANEMOTO A, HIRAYAMA R, MORITAKE T, et al. *Journal of Radiation Research*, 2014, 55(5): 1028.
- [36] ZHIVOTOVSKY B, JOSEPH B, ORRENIUS S, et al. *Experimental Cell Research*, 1999, 248(1): 10.
- [37] VERHEJ M, BARTELINK H. *Cell and Tissue Research*, 2000, 301(1): 133.
- [38] WONG R. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2011, 30(1): 87.
- [39] XIA Shouxuan. *Radiobiology*[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 1998. (in Chinese)
(夏寿萱. *放射生物学*[M]. 北京: 军事医学出版社, 1998)
- [40] HALL E J, KEREIAKES J. *Cell Physiology Source Book*[M]. 3 ed. *Manhattan: Academic Press*, 2001: 1185.
- [41] KRUEGER S, JONINER M, WEINFELD M, et al. *Radiation Research*, 2007, 167(3): 260.
- [42] GUO Chuanling, WANG Jufang, JIN Xiaodong, et al. *Journal of Radiation Research and Radiation Processing*, 2007, 25(01): 55. (in Chinese)
(郭传玲, 王菊芳, 金晓东, 等. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2007, 25(01): 55.)
- [43] KIM E, KIM M, LEE K, et al. *International Journal of Oncology*, 2017, 51(4): 1124.
- [44] VANDERSICKEL V, MANCINI M, SLABBERT J, et al. *Radiation Oncology*, 2010, 5(1): 1.
- [45] XU Zhao, CHEN Ni, WANG Zhigang, et al. *Radiation Protection*, 2019, 39(02): 150. (in Chinese)
(徐照, 陈妮, 王志刚, 等. *辐射防护*, 2019, 39(02): 150.)
- [46] WANG Li, XIAO Yaoxiong, CHEN Ting, et al. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 618.

Preliminary Research on the Radiation Sensitizing Effect of *Ganoderic acid A* on Human Hepatoma Cells

SHAO Changsheng^{1,2}, ZHANG Qunxia^{1,2}, WANG Jianye³, HUANG Qing^{1,2,†}

(1. Institute of Technical Biology and Agricultural Engineering Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2. University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

3. Institute of Nuclear Energy Safety Technology, Chinese Academy of Sciences, Hefei 23003, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of *ganoderic acid A* (GAA) on the radiosensitivity of human hepatoma cell line HepG2 for high-LET neutron and low-LET gamma-ray radiations. In this research, the CCK-8 method was used to detect the inhibition of proliferation of HepG2 cells treated by GAA. It was found that 5 $\mu\text{mol/L}$ GAA treatment had weak proliferation inhibition effect on HepG2 cells, and so this concentration of GAA was applied to the cells for 24 h in the subsequent experiments. CCK8 assay, clone formation assay, apoptosis assay, and the foci formation of γH2AX were detected after irradiated by different doses of either neutron or γ -ray. The experiments showed that the high-LET neutron irradiation had a higher proportion of apoptosis than the low-LET γ ray irradiation for the cells without GAA treatment, while for the cells with GAA treatment, the proportion of apoptosis also decreased significantly for the cells under γ -ray irradiation. After treated with GAA, the proportion of induced apoptosis was significantly increased compared to the control group without GAA treatment. Besides, after GAA treatment, the cell proliferation inhibition rate also increased with the increase of irradiation dose. Therefore, these results suggest that GAA can increase the radiosensitivity of HepG2 cells, and HepG2 cells are more sensitive to the high-LET neutron irradiation than low-LET γ -ray irradiation. As such, this study suggests that GAA not only may serve as a natural radiosensitizer, but also may provide a new radio-therapy method which may be suitable for cancers, or particularly, liver cancers.

Key words: ganoderic acid; liver cancer cells; neutron; γ -ray; radio-sensitivity; linear-energy-transfer (LET); radiation

Received date: 23 Oct. 2019; Revised date: 12 Nov. 2019

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (11635013, 11775272)

† Corresponding author: HUANG Qing, E-mail: huangq@ipp.ac.cn.