

文章编号: 1007-4627(2017)04-0797-06

羧甲基- β -1,3-葡聚糖对人肝癌 HepG2 细胞的放射增敏作用

马斌博^{1,2}, 王转子¹, 魏巍¹, 党秉荣¹, 李文建^{1,2,†}

(1. 中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000;

2. 兰州大学, 兰州 730000)

摘要: 本研究旨在探讨羧甲基- β -1,3-葡聚糖 (CMG) 对人肝癌 HepG2 细胞 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐射敏感性的影响。首先用 CCK-8 法检测 CMG 对 HepG2 细胞的生长抑制情况, 得到半数抑制浓度 (IC₅₀) 为 120.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用浓度为 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 的 CMG 预处理 HepG2 细胞 24 h, 再给予 2 Gy X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照 (CMG+辐照组); CMG 未处理组直接接受 2 Gy X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照 (辐照组)。对比分析辐照组和 CMG+辐照组细胞的克隆存活、DNA 损伤、凋亡与周期分布、细胞内活性氧 (ROS) 水平。发现: 与 X 射线辐照组相比, 相同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照组克隆存活率更小, DNA 损伤和周期阻滞更加严重, 细胞凋亡率和细胞内 ROS 水平也更高。与单独 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照组相比, CMG+辐照组克隆存活率明显降低, 细胞凋亡率随辐照后 CMG 作用时间的延长而明显增加, CMG 使辐照后细胞内 ROS 维持在一个较高的水平, 同时 CMG 明显加重了单独辐照诱导的 DNA 损伤和周期阻滞。结果表明, 与 X 射线相比, HepG2 细胞对相同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐射更敏感; CMG 可增加 HepG2 细胞对 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐射的敏感性; CMG 可能通过增加受照 HepG2 细胞内的 ROS 水平, 加剧辐照诱导的 DNA 损伤, 促进辐射诱导细胞凋亡而起辐射增敏作用。

关键词: 羧甲基- β -1,3-葡聚糖; HepG2 细胞; X 射线辐照; $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐照; 辐射敏感性

中图分类号: R730.55; R96

文献标志码: A

DOI: 10.11804/NuclPhysRev.34.04.797

1 引言

肝癌是一种严重危害人类健康的恶性肿瘤, 发病率和死亡率极高, 是世卫组织公布的十大肿瘤之一^[1]。放射治疗是肝癌治疗的重要手段之一, 尤其对于晚期肝癌患者, 放疗更是发挥着不可或缺的作用, 但是肝癌细胞放疗敏感性低, 容易产生放射抗性, 单一的放射治疗疗效很难达到治疗的目的, 如果加大放射治疗的剂量, 又会面对肝脏放疗耐受量低的问题以及高剂量放疗给患者带来的并发症和副反应^[2]。因此寻找一种理想的放疗增敏剂, 既可以有效的抑制肿瘤细胞的生长, 又可以增加肿瘤细胞的放疗敏感性, 从而有效地提高肝癌放疗疗效, 这也是目前抗肿瘤治疗研究的热点问题。

葡聚糖是由葡萄糖单体聚合而成的一类天然高分子多聚糖化合物, 分子量从数千到数百万之间不等, 其广泛存在于微生物、植物和动物界, 葡聚糖分为 α 型和 β 型, β 型葡聚糖具有生物活性, 具有免疫调节、抗肿瘤、抗辐射、降血脂、保肝等多种作用^[3-5]。由于酵母 β -葡聚糖水溶性较差, 所以限制了其在相关领域的

应用, 因此通过化学改性等方法 (如羧甲基化、硫酸化和磷酸化等), 制备得到水溶性较好的 β 型酵母葡聚糖衍生物, 对于酵母葡聚糖的开发利用具有重要的意义。根据相关研究表明, β -葡聚糖及其化学改性的衍生羧甲基- β -1,3-葡聚糖在发挥抗肿瘤作用时除了与增强免疫活性有关外, 还与抑制肿瘤细胞增殖, 诱导肿瘤细胞凋亡有关。因此本文旨在探讨羧甲基- β -1,3-葡聚糖在联合 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射对人肝癌 HepG2 细胞的协同作用, 并探讨相关机制, 为临床肝癌放射联合药物治疗奠定一定的研究基础, 也为新型放疗增敏剂的筛选和开发提供理论基础。

2 材料和方法

2.1 细胞培养

人肝癌 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库, 由中国科学院近代物理研究所生物物理室冻存并传代培养。细胞置于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基中, 在 37 °C、

收稿日期: 2016-12-28; 修改日期: 2017-01-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (11575259)

作者简介: 马斌博 (1987-), 男, 甘肃白银人, 硕士研究生, 从事辐射增敏与防护药物研究; E-mail: mabb13@lzu.edu.cn.

† 通信作者: 李文建, E-mail: wjli@impcas.ac.cn.

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 85% 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 实验药品

羧甲基- β -1,3-葡聚糖 (CMG) 由本实验室制备。

2.3 辐照前药物 IC₅₀ 浓度检测

取对数生长期的 HepG2 细胞, 制成单细胞悬液, 接种 200 μ L 细胞悬液于 96 孔板的每孔中 (3000 个细胞/每孔), 培养 12 h, 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羧甲基- β -1,3-葡聚糖培养液 (终浓度分别为 12.5, 25, 50, 100, 200 和 400 μ g/mL), 另外设置空白对照组和不加药对照组, 每组设置 6 个复孔, 继续在培养箱孵育 24 h, 然后向每孔中加入 10 μ L CCK-8 (同仁化学, 日本) 溶液。将 96 孔板在 37 $^{\circ}$ C 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。制作抑制率曲线, 并计算出 IC₅₀ 值, 后续实验采用 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 为加药浓度。

抑制率 (%) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$ 。

2.4 照射条件和实验分组

X 射线由 RX-650 型 X 射线生物辐照仪 (FAXITRON, 美国) 提供, 其能量和剂量率分别为 100 kVp 和 0.5 Gy/min, ¹²C⁶⁺ 离子束照射由兰州重离子研究装置 (HIRFL) 提供, 其能量和剂量率分别为 100 MeV/u 和 0.5 Gy/min。吸收剂量均为 2 Gy。实验分组为: 对照组 (Control)、CMG 组 (A)、¹²C⁶⁺ 组 (B)、¹²C⁶⁺+CMG 组 (C)、X-rays 组 (D) 和 X-rays + CMG 组 (E)。

2.5 辐照后处理

2.5.1 不同处理组细胞克隆形成实验

取对数生长期的 HepG2 细胞, 制成适宜浓度 (5000 个细胞/mL) 的单细胞悬液, 将细胞接种于 60 mm 的培养皿里, 培养 12 h, 待细胞贴壁后, 弃去原培养液, 向 A, C 和 E 给予终浓度为 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 的羧甲基- β -1,3-葡聚糖培养液; Control、B 和 D 直接更换新鲜培养基。放入培养箱继续孵育 24 h 后, B 和 C 进行 ¹²C⁶⁺ 离子束照射, D 和 E 进行 X 射线照射, 吸收剂量都是 2 Gy; Control 不做处理, 辐照结束后继续培养 8 d, 先吸弃培养基, 用 PBS 轻轻清洗两遍, 再用甲醇固定 20 min, Giemsa 染色, 晾干。统计细胞数 > 50 个的克隆数。

2.5.2 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, 培养 12 h, 贴壁后弃去原培养液, 向 A, C 和 E 给予终浓度为 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 的羧甲基- β -1,3-葡聚糖培养液; Control、B 和 D 更换新鲜培养基, 放入培养箱继续孵育 24 h; 然后对 B 和 C 进行 ¹²C⁶⁺ 离子束照射, D 和 E 进行 X 射线照射, 吸收剂量都是 2 Gy; 辐照结束后分别继续培养 12 和 24 h 进行凋亡检测。按凋亡试剂盒 (联科生物技术有限公司) 说明书进行操作, 收集细胞, PBS 洗涤细胞两次, 加入 500 μ L (的 Annexin V Binding Buffer 悬浮细胞, 再加入 10 μ L 的 Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μ L 的碘化丙啶 (PI), 混匀; 避光、室温反应 15 min 后, 流式细胞仪 (BD Company) 上样检测细胞凋亡率。用 FlowJo7.6 软件进行凋亡数据分析。

2.5.3 细胞周期检测

细胞处理及实验分组与 2.5.2 步骤相同。将收集好的细胞用 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 75% 乙醇固定, 放入冰箱 4 $^{\circ}$ C 过夜。将固定好的细胞离心弃去乙醇, PBS 洗涤两遍, 加 500 μ L 的 PBS 重悬细胞, 按周期试剂盒 (联科生物技术有限公司) 说明书操作加入 20 μ L 的 PI 染液, 室温染色 15 min 后, 流式仪上样检测细胞周期分布情况。用 Modfit 软件进行周期数据分析。

2.5.4 流式细胞仪检测细胞活性氧 (ROS)

细胞处理及实验分组与 2.5.2 步骤相同, X 射线和 ¹²C⁶⁺ 离子束照射结束后继续在培养箱内孵育 0.5 h, 然后收集细胞进行流式检测。将收集好的细胞用 500 μ L 的 PBS 重悬, 再加入 1 μ L 的 DCFH-DA 染液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤细胞一次, 以除去未进入细胞的 DCFH-DA, 然后加 500 μ L 的 PBS 重悬细胞后流式细胞仪上样检测。用 FlowJo7.6 软件进行活性氧 (ROS) 数据分析。

2.5.5 碱性单细胞凝胶电泳检测 DNA 损伤

细胞处理及实验分组与 2.5.4 步骤相同。X 射线和 ¹²C⁶⁺ 离子束照射后 0.5 h 收集细胞进行单细胞凝胶电泳实验, 参照 Singh 等^[7] 的实验操作方法。制片: 第 1 层凝胶制备: 加热溶解正常熔点琼脂糖 (NMA) 于 PBS 中, 使其浓度为 1%, 冷却后在磨砂载玻片上滴加 NMA (100~200 μ L), 将干净的盖玻片立即盖在滴好的 NMA 上, 使凝胶铺平整, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下放置 15 min 使其凝固。第 2 层凝胶的制备: 加热溶解低熔点琼脂糖 (LMA) 于 PBS 中, 使其浓度为 1%, 冷却到 37 $^{\circ}$ C, 移去第一层胶上的盖玻片, 取制备好的适宜浓度的单细

胞悬液 80 和 420 μL 的 LMA 混匀, 迅速将 100 μL 该含细胞的混合液滴加到已经凝固的第1层胶上, 平整和凝固凝胶操作与上一步相同。第3层凝胶的制备: 取下第二层胶上的盖玻片, 滴加 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温 LMA 适量 (50~100 μL) 于第2层已经凝固的凝胶上, 平整和凝固凝胶操作与上一步相同。细胞裂解: 将新鲜配制并且事先预冷的 pH 值为 10.0 的碱性裂解液, 缓慢加到放置铺好胶的磨砂载玻片的平皿中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解 2 h。取出载玻片, 双蒸水漂洗 2 次。

DNA 碱解旋: 将载玻片放进已经加入现配置电泳缓冲液的电泳槽中, 使液体高过胶面 0.25 cm 左右, 在室温避光条件下静置 20 min。细胞电泳: 稳压 20 V, 电流 295~300 mA, 遮光电泳 20 min。中和、染色: 将电泳完的载玻片轻轻从电泳槽中取出, 转移到平皿中, 先用双蒸水漂洗 2 次, 再用 pH 为 7.5 的 0.4 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液漂洗 3 次, 漂洗结束后用 PBS 缓慢冲洗胶面, 然后用滤纸吸干胶面的水分, 自然晾干。向各不同处理组的载玻片上滴加 2~3 滴 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 EB 进行染色, 避光反应 5 min。

观察、拍照和分析。各不同处理组计数两张玻片, 每张计数 50 个细胞, 共 100 个。图片拍照保存, 用 CASP 软件进行分析。

2.6 统计学处理

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验数据资料的组间分析均采用单因素方差分析。统计分析由 SPSS19 软件完成; 绘图采用 Origin7.5 软件。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为统计具有显著性差异。

3 结果

3.1 羧甲基- β -1,3-葡聚糖对 HepG2 细胞的 IC50 浓度

CCK-8 结果如图 1 所示, 羧甲基- β -1,3-葡聚糖对人肝癌 HepG2 细胞有增殖抑制的作用, 并且随浓度 (0~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的变化呈剂量依赖性。通过拟合的羧甲基- β -1,3-葡聚糖的抑制率曲线可求得其 IC50 为 120.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 后续实验选择 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 为给药浓度。

3.2 不同处理组对 HepG2 细胞的克隆形成情况

通过克隆实验检测各处理组 HepG2 细胞克隆形成情况, 研究羧甲基- β -1,3-葡聚糖的放射增敏效应, 浓度为 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 的羧甲基- β -1,3-葡聚糖处理细胞后抑制率在 10% 左右, 增殖抑制作用较弱。克隆存活率的结果如图 2 所示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束比 X 射线对细胞存活率的抑

制作用更加明显; B 和 D 的细胞克隆存活率和 Control 相比具有显著性差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 而且 C 和 B 相比, E 和 D 相比均具有显著性差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 克隆存活率表现出更强的抑制作用。结果表明, 羧甲基- β -1,3-葡聚糖联合 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束的处理对 HepG2 细胞的增殖抑制有着显著的协同作用, 即羧甲基- β -1,3-葡聚糖对 HepG2 细胞有着良好的放射增敏作用。

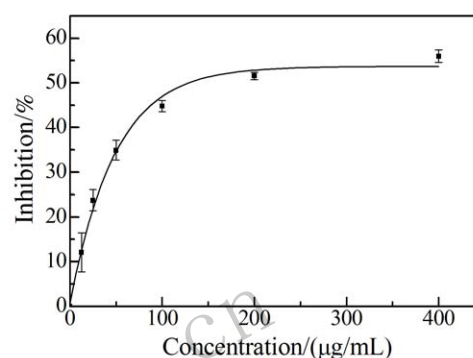


图 1 羧甲基- β -1,3-葡聚糖对 HepG2 细胞的生长抑制率曲线

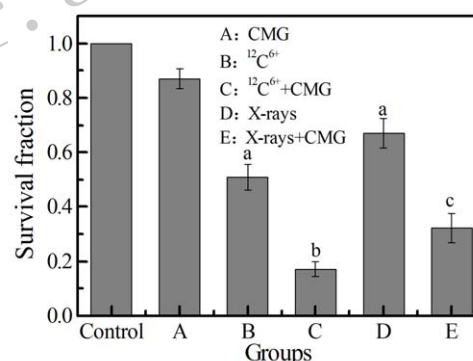


图 2 羧甲基- β -1,3-葡聚糖联合 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对 HepG2 细胞克隆形成的影响

注: 照射剂量为 2 Gy, 图中 a 表示 B、D 与 Control 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); b 表示 C 和 B 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); c 表示 E 和 D 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$)。

3.3 不同处理组对 HepG2 细胞凋亡的影响

用流式细胞仪检测各处理组细胞经 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射后 12 和 24 h 的凋亡率, 结果如图 3 所示, $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束比 X 射线有更强的诱导凋亡发生的作用; C 和 B 相比, E 和 D 相比凋亡率都明显增加, 并且均有统计学意义 ($P < 0.01$); C (24 h) 和 C (12 h) 相比, E (24 h) 和 E (12 h) 相比凋亡率的变化具有显著性差异, 有统计学意义 ($P < 0.01$); 结果表明, 羧甲基- β -1,3-葡聚糖能促进 X 射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束放疗诱导的细胞凋亡的发生, 并且随着放疗后药物作用时间的增加会加剧诱导凋亡的发生。

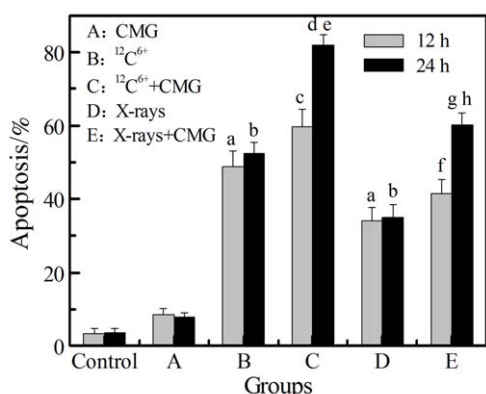


图 3 羧甲基-β-1,3-葡聚糖联合X射线或¹²C⁶⁺离子束对HepG2细胞凋亡率的影响

注: 照射剂量为 2 Gy, 图中 a 表示 B(12 h), D(12 h) 和 Control(12 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); b 表示 B(24 h), D(24 h) 和 Control(24 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); c 表示 C(12 h) 和 B(12 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); d 表示 C(24 h) 和 B(24 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); e 表示 C(24 h) 和 C(12 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); f 表示 E(12 h) 和 D(12 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.05$); g 表示 E(24 h) 和 D(24 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); h 表示 E(24 h) 和 E(12 h) 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$).

3.4 不同处理组对 HepG2 细胞周期的影响

用流式细胞仪检测不同处理组细胞周期分布情况, 结果表明两种射线辐射均引起 HepG2 细胞发生不同程度的 G2/M 期阻滞, 且 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照诱导的周期阻滞比 X 射线诱导的周期阻滞更严重; 羧甲基 β-1,3-葡聚糖减轻了 X 射线或 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照诱导的 G2/M 期阻滞(表 1)。随辐照后时间的延长(从 12 h 到 24 h), 各组 G2/M 期阻滞均有所缓解, B 组 G2/M 期细胞的比例由 (38.2±1.24)% 减少到 (15.4±0.73)%, C 组 G2/M 期细胞的比例由 (32.4±0.98)% 减少到 (14.2±0.82)%, D 中 G2/M 期细胞的比例由 (29.6±0.77)% 减少到 (10.7±0.55)%, E 组 G2/M 期细胞的比例由 (20.4±0.61)% 降低到 (5.71±0.41) (表 1)。

3.5 不同处理组对 HepG2 细胞 DNA 损伤的影响

用碱性单细胞凝胶电泳实验检测不同处理组细胞 DNA 损伤情况, 用彗星图像的尾距 (Tail moment)

表 1 羧甲基-β-1,3-葡聚糖对 X 射线或 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照后 HepG2 细胞周期分布的影响 ($n = 3, x \pm s$)

组别	G2/M		G1		S	
	辐照 12 h	辐照 24 h	辐照 12 h	辐照 24 h	辐照 12 h	辐照 24 h
Control	10.57±1.07	11.14±0.56	77.94±1.41	77.96±1.00	11.49±1.15	10.90±0.72
B	38.29±1.24	15.46±0.73	46.78±1.44	68.23±1.11	14.93±0.90	16.31±0.89
C	32.49±0.98	14.25±0.82	53.29±0.97	66.38±0.95	14.22±1.06	19.37±0.96
D	29.68±0.77	10.74±0.55	55.44±1.23	72.66±0.55	14.88±0.48	16.60±1.09
E	20.49±0.61	5.71±0.41	63.96±0.70	76.16±0.88	15.55±1.12	18.13±1.08

注: 照射剂量为 2 Gy, 表中 Control 为对照组, B 为 ¹²C⁶⁺ 组, C 为 ¹²C⁶⁺+CMG 组, D 为 X-rays 组, E 为 X-rays+CMG 组。

作为定量细胞 DNA 损伤程度的参数, 结果如图 4 所示。两种射线均诱导细胞 DNA 严重损伤, 且损伤程度与射

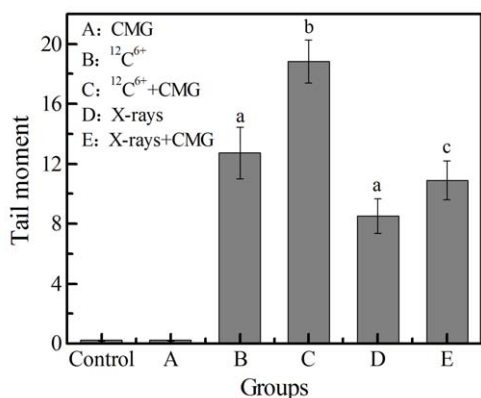


图 4 羧甲基-β-1,3-葡聚糖联合 X 射线或 ¹²C⁶⁺ 离子束对 HepG2 细胞 DNA 损伤的影响

注: 照射剂量为 2 Gy, 图中 a 表示 B,D 与 Control 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); b 表示 C 和 B 相比具有显著性差异 ($P < 0.01$); c 表示 E 和 D 相比具有显著性差异 ($P < 0.05$).

线种类有关, ¹²C⁶⁺ 离子束辐照诱导更严重的 DAN 损伤。C 和 E 尾距值明显高于 B 和 D, 表明羧甲基-β-1,3-葡聚糖明显加重了 X 射线或 ¹²C⁶⁺ 离子束辐照诱导的 DNA 损伤。

3.6 不同处理组对 HepG2 细胞活性氧 (ROS) 的影响

在 X 射线或 ¹²C⁶⁺ 离子束照射后 0.5 h 时, 用流式细胞仪检测各处理组细胞内 ROS 水平, 结果如图 5。发现两种射线辐射均使 HepG2 细胞内 ROS 水平增加, 且 ¹²C⁶⁺ 离子辐照诱导更高水平的 ROS; 羧甲基-β-1,3-葡聚糖能显著增加 X 射线或 ¹²C⁶⁺ 离子束诱导的活性氧的产生。该结果也与放疗后凋亡和 DNA 损伤的变化相对应。羧甲基-β-1,3-葡聚糖能够使放疗后的细胞内 ROS 维持在一个高水平状态, 从而提高了细胞凋亡率和 DNA 损伤的程度, 这也可能正是其辐射增敏作用的机制所在。

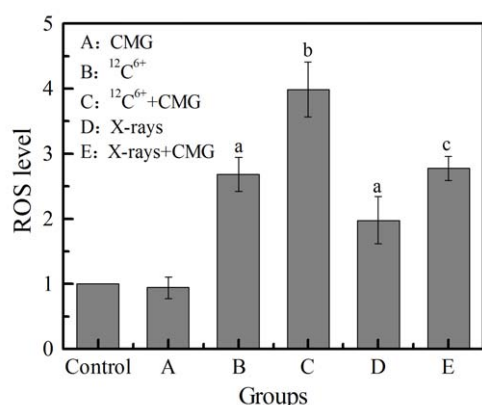


图5 羧甲基- β -1,3-葡聚糖联合X射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束对HepG2细胞活性氧(ROS)相对水平的影响
注: 照射剂量为2 Gy, 图中a表示B、D与Control相比具有显著性差异($P < 0.01$); b表示C和B相比具有显著性差异($P < 0.01$); c表示E和D相比具有显著性差异($P < 0.01$)。

4 讨论

目前在临床上应用的肿瘤治疗药物、肿瘤放疗防护药物或肿瘤放疗增敏药物都存在毒性大、不良反应和副作用多等缺点, 而且这些药物都存在肝毒性, 缺乏保肝的作用, 对于肝癌患者来说服药后会带来严重的生活质量降低。所以研发一种低毒高效的放疗增敏剂具有重要的意义, 可以提升放疗的疗效, 降低患者放疗的照射剂量, 提高患者的生活质量。

本研究发现, 羧甲基- β -1,3-葡聚糖在实验的浓度范围内对HepG2细胞有增殖抑制作用, 并且存在剂量依赖性。羧甲基- β -1,3-葡聚糖的浓度为 $0.1 \times \text{IC}_{50}$ 时, 克隆存活抑制率在10%左右(图2), 而且该浓度下单独给药组的细胞周期分布和凋亡率的变化没有显著影响(表1, 图3)。由实验结果发现, 联合组的细胞克隆形成率减少(图2), 凋亡率增加(图3), 表现出了较高的辐射敏感性。

当细胞受到损伤, 可能会被阻滞在细胞周期的某个时期, 从而为损伤的细胞提供时间进行修复, 细胞受到的损伤如果被修复, 则继续进入周期循环, 如果不能修复则走向凋亡, 细胞周期阻滞是细胞在受到外界刺激时进行的一种自我保护和拯救措施^[8]。流式凋亡检测结果显示药物和放疗联合处理的细胞凋亡率明显增加(图3), 说明羧甲基- β -1,3-葡聚糖增强了X射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束照射诱导的细胞凋亡, 能够起到放疗增敏的作用。

当DNA受到内源性(ROS和DNA在复制传递过程出现的错误等)和外源性(电离辐射、高温高压和重金属等)的刺激时, 这些刺激都将导致DNA的损伤^[9]。通常机体内的ROS在较低水平, 并且它的产生和清除

处在动态平衡的状态, 细胞受到外界刺激时, 它会改变相关基因的表达, 以减弱所受到的刺激, 从而达到拯救细胞的目的。但是当ROS的产生超过细胞所能自救的范围, 这时平衡就会被打破, 过量的ROS会使线粒体外膜的通透性增加, 让线粒体内膜上的双磷脂酰甘油过氧化, 从而使结合在其上的细胞色素C脱落并进入细胞质, 进而激活Caspase, 诱导细胞凋亡的发生^[10-12]。而且大量的研究表明, ROS引起的氧化应激和DNA损伤存在着一定的联系, 由ROS引起的氧化应激反应会导致DNA键断裂(如: DNA单键或者双键的断裂)等形式的DNA损伤; DNA损伤也会诱导细胞中ROS的产生^[13, 14]。抗凋亡基因Bcl-2的过度表达能够减少氧自由基的产生, 羧甲基- β -1,3-葡聚糖可能参与了下调Bcl-2、上调Bax的表达, 引起Bax/Bcl-2比例增加, 促进ROS的产生, 进而参与线粒体途径的细胞凋亡, 从而起到增加HepG2细胞放射敏感性的作用。研究发现, C和E在辐照后0.5 h, 细胞内ROS水平和DNA损伤程度均比B和D要高(图4, 图5), 表明羧甲基- β -1,3-葡聚糖有抑制辐照后细胞内活性氧分子清除的作用, 并且对DNA的损伤有加剧的作用。这种作用可能与ROS引起的氧化应激和DNA损伤的双向作用有关。

通过对羧甲基- β -1,3-葡聚糖预处理的肝癌HepG2细胞进行X射线和 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照的放疗敏感性研究可知, 羧甲基- β -1,3-葡聚糖对高LET和低LET的电离辐射都能起到放疗增敏的作用, 有着较广的临床应用前景。

5 结论与展望

通过本研究发现, 与X射线相比, HepG2细胞对相同剂量的 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子辐射更敏感; 与单独的X射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束辐照效应相比, 联合羧甲基- β -1,3-葡聚糖辐照后的细胞存活抑制、凋亡率、活性氧水平和DNA损伤程度均显著增加, 明显提高了HepG2细胞对X射线或 $^{12}\text{C}^{6+}$ 离子束的辐射敏感性。此研究为肿瘤的放疗与药物联合治疗提供了一定的基础数据, 并且也对多糖类药物在肿瘤治疗中的应用途径提供了一定的参考价值。

参考文献:

- [1] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, *et al.* CA Cancer J Clin, 2011, **61**(2): 69.
- [2] ZHOU X, ZHANG X, XIE Y, *et al.* Plos One, 2013, **8**(8): e72641.

- [3] KOGAN G, PAJTINKA M, BABINCOVA M, *et al.* Neoplasma, 2008, **55**(5): 387.
- [4] KEENAN J M, GOULSON M, SHAMLIYAN T, *et al.* British Journal of Nutrition, 2007, **97**(6): 1162.
- [5] SMITH K N, QUEENAN K M, THOMAS W, *et al.* Journal of the American College of Nutrition, 2008, **27**(3): 434.
- [6] ZHANG M, CHEUNG P C K, CHIU L C M, *et al.* Carbohydrate Polymers, 2006, **66**: 455.
- [7] SINGH N P, MCCOY M T, TICE R R, *et al.* Experimental Cell Research, 1988, **175**(1): 184.
- [8] LUO X J, QIN Q P, LIANG H, *et al.* Inorganic Chemistry Communications, 2014, **46**: 176.
- [9] NAGARIA P, ROBERT C, RASSOOL F V. Biochimica et Biophysica Acta(BBA): General Subjects, 2013, **1830**(2): 2345.
- [10] LEE H C, WEI Y H. Journal of Biomedical Science, 2000, **7**(1): 2.
- [11] GUIDO K. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, **304**(3): 433.
- [12] PETROSILLO G, RUGGIERO F M, PISTOLESE M. FEBS Letters, 2002, **509**(7): 435.
- [13] SHOKOLENKO I, VENEDIKTOVA N, BOCHKAREVA A, *et al.* Nucleic Acids Research, 2009, **37**(8): 2539.
- [14] EVERT B A, SALMON T B, SONG B W, *et al.* Journal of Biological Chemistry, 2004, **279**: 22585.

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

MA Binbo^{1,2}, WANG Zhuanzi¹, WEI Wei¹, DANG Bingrong¹, LI Wenjian^{1,2,†}

(1. Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract: This study aims to investigate the effect of carboxymethyl- β -1, 3-glucan (CMG) on the sensitivity of human hepatoma HepG2 cells to X-rays or $^{12}\text{C}^{6+}$ ions irradiation. First, the inhibitory effect of CMG on the growth of HepG2 cells was detected by CCK-8 assay, and the half maximal inhibitory concentration (IC50) was 120.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. HepG2 cells were pretreated with CMG at a concentration of $0.1 \times \text{IC}_{50}$ for 24 h and then irradiated with 2 Gy X-ray or $^{12}\text{C}^{6+}$ ion beams (CMG + irradiation group). CMG untreated group was directly irradiated by 2 Gy X-rays or $^{12}\text{C}^{6+}$ ions beam (irradiation group). The clone survival, DNA damage, cell apoptosis, cell cycle distribution, and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in irradiation group and CMG + irradiation group were comparatively analyzed. The results showed that the clone survival rate was lower, DNA damage and cycle arrest were more serious, and the rate of apoptosis and intracellular ROS levels were higher in $^{12}\text{C}^{6+}$ ions irradiation group than those in the same dose of X-rays irradiation group. Compared with X-rays or $^{12}\text{C}^{6+}$ ions irradiation group, the clone survival rate of CMG + irradiation group was significantly decreased, and the apoptosis rate significantly increased with the prolongation of CMG treatment post-irradiation; CMG maintained intracellular ROS at a higher level after irradiation, CMG also significantly aggravated radiation-induced DNA damage and cycle arrest. These results indicated that HepG2 cells were more sensitive to $^{12}\text{C}^{6+}$ ions radiation than those at the same dose of X-rays. CMG increased the sensitivity of HepG2 cells to X-rays or $^{12}\text{C}^{6+}$ ions irradiation by increasing intracellular ROS level, exacerbating radiation-induced DNA damage and promoting radiation-induced apoptosis in irradiated HepG2 cells.

Key words: carboxymethyl- β -1,3-glucan; HepG2 cells; X-rays irradiation; $^{12}\text{C}^{6+}$ ions irradiation; radiosensitivity

Received date: 28 Dec. 2016; Revised date: 10 Jan. 2017

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(11575259)

† Corresponding author: LI Wenjian, E-mail: wjli@impcas.ac.cn.