

奈米金粒子對細胞之輻射增敏效應

劉威忠¹ 耿念慈¹ 李雨純² 龍嘉麒³ *林群智⁴

¹ 慈濟技術學院放射系,

² 南華大學自然醫學研究所

³ 中山醫學大學公共衛生學系

⁴ 南華大學通識教學中心/自然生物科技系/自然醫學研究所

摘要

本研究選用子宮頸癌細胞株(Hela cell line)與正常細胞,探討兩者對奈米金的攝取量及對輻射敏感度之差異。在實驗上,將奈米金粒子(15 ppm)分別加入正常之骨髓細胞、周邊血液單核球以及Hela cell中共同培養,隔天測量細胞對奈米金粒子的攝取量,再以 γ 射線(0或5 Gy)照射細胞,並觀察細胞形態,比較細胞的凋亡率以及BMP基因之表現,進而探討奈米金粒子對骨髓細胞的分化是否產生影響。結果顯示,骨髓細胞的奈米金粒子攝取量為Hela cell的50%,而周邊血液單核球則為Hela cell的59%。攝取奈米金的細胞,經輻射照射後,其凋亡率相較於未攝取者,各為:Hela cell(183%)、骨髓細胞(172%)、周邊血液單核球(154%)。僅攝取奈米金,但未照射輻射的細胞,則兩者凋亡率沒有統計學上的差異。此外,在骨髓細胞分化的實驗中,發現奈米金可增加含鹼性磷酸酶的細胞比率,且提高骨頭的生成量。在基因表現分析中,發現奈米金粒子可促進BMP基因的表現,若已攝取奈米金粒子的骨髓細胞經輻射照射,上述因子則會被抑制。由研究結果可知,奈米金粒子可提高Hela cell、骨髓細胞及週邊血液單核球細胞對輻射的敏感性,促進其凋亡。Hela cell對奈米金粒子的攝取量明顯較正常細胞多,經輻射照射後所引起的傷害也較正常細胞大。

關鍵詞: 骨髓, 奈米金, 放射治療, 輻射增敏劑, 腫瘤

前言

根據衛生署對於台灣地區之統計發現,惡性腫瘤業已連續數年(1995-2006)列居十大死因之首,去年依然蟬聯排序之第一位[1],除了消耗健康保險系統龐大之診療經費外,亦常導致病患個人身心痛苦及其家庭沉重之經濟負擔。目前,醫學界對於惡性腫瘤之處理多採用外科手術、化學治療(chemotherapy)、放射治療(radiotherapy)或結合上述各種治療程序。其中,由於骨髓對於游離輻射較敏感,因此,放射治療常導致大量之骨髓幹細胞死亡,並引發骨髓衰竭(bone marrow failure)[2-4],其他副作用尚包括:周邊血球

數目之衰減、造血作用(hematopoiesis)降低、身體免疫反應被抑制、毛囊幹細胞損傷所導致之掉髮及胃腸道症候群(gastrointestinal syndrome)[5-7]等,因此,如何降低輻射對正常細胞或組織的傷害成為放射治療上重要的課題。此外,游離輻射可造成腫瘤細胞DNA之單股或雙股的斷裂,當細胞察覺到此種DNA傷害時,便啟動DNA修補機制或促使細胞凋亡。為了提高輻射對於腫瘤細胞的損傷能力或生物效應,可使用輻射增敏劑(radiosensitizers),以促進DNA損傷或抑制DNA之修復系統,新一代的輻射增敏劑則是將作用機

制著重於抑制細胞增殖與促進細胞走向凋亡途徑；然而，目前所使用之輻射增敏劑幾乎均使用化學藥物 { 如 : misonidazole [1-(alpha-methoxymethyl ethanol)-2-Nitroimidazole]及 buthionine sulfoxine 等}，然而，某些藥物 (如：蔥醌-2-磺酸[8]) 具有副作用。

生物體之骨髓幹細胞可分化成血源性 (hematopoietic) 與基質性 (stromal) 等兩類幹細胞，血源性幹細胞可受細胞激素調控，而分化成血球細胞 [9]，以維持血液的正常功能，而基質幹細胞 [又稱為間葉幹細胞 (mesenchymal stem cells)] 則可分化成骨細胞與脂肪細胞等，以提供血球分化及生長的微環境 [10]；其中，骨細胞可分為骨先驅細胞 (osteoprogenitor cell)、造骨細胞 (osteoblast) 和破骨細胞 (osteoclast) 等三類，負責骨組織之生長平衡，並調整骨骼適當的礦物化比例，以維持骨骼負重的強度。Cbfa (Core binding factor alpha) 及骨形態發生蛋白 (Bone Morphogenic Protein; BMP) 等因子可誘發幹細胞分化成造骨原始細胞 (osteoprogenitor cell)，其中，前者為一轉錄因子，與基因表現密切相關 [11-13]，而後者則與造骨細胞分化或骨組織生成有關 [14-16]。與造骨細胞活化的相關指標因子包括：osteocalcin (骨鈣素)、osteopontin (造骨蛋白) 及 ALP (Alkaline Phosphatase: 鹼性磷酸酶) 等，其中以 ALP 可幫助骨組織生成，最常用為檢測指標 [17]。

奈米金 (表面電漿共振帶 (surface plasmon resonance band) 之吸收波長約為 520 nm [18])，此吸收峰被廣泛應用於生物醫學之檢測 [19-20] (例如：免疫分析 [21] 及基因探針 [22]) 及癌細胞的診斷 [23] 等。本研究基於奈米金具有顆粒小、高比表面積 (specific surface area) 及高原子序而易於與光子發生光電效應之特性，探討周邊血液幹細胞、骨髓幹細胞及子宮頸癌細胞對奈米金之攝入能力，此外，以反轉錄聚合酶鏈反應 (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction; RT-PCR) 之方法檢測 BMP 的基因表現量，評估奈米金顆粒是否對骨髓細胞分化造成影響，並比較其攝入後對輻射之增敏效應，進而探討其可能機轉。

材料與方法

細胞培養與處理

A. HeLa cell 培養：取 α MEM (Alpha Modification of Eagles Medium)，添加 10% 的胎牛血清，實驗組並給予奈米金 (~20 nm) 15 ppm 處理，用以培養 HeLa cell (細胞密度 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$)。

B. 骨髓細胞培養：取小鼠 (C57BL/6 mice) 股骨與脛骨，去除軟組織，置於 70% 乙醇中 5 min，剪去股骨與脛骨的前後兩端。使用 23 號針頭抽取 HPSS (HEPES-buffered Physiological Salt Solution; GIBCO Industries, Inc., USA) 將骨髓腔的骨髓沖出。將上述收集之骨髓細胞 (細胞密度 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$) 以 α MEM medium (GIBCO Industries, Inc., USA) 培養，並加入 10% 的胎牛血清與 10^{-8} M 的 Dex (dexamethasone) 溶液中，實驗組另加入奈米金 (15 ppm) 處理 (對照組則不加入奈米金)。

C. 周邊血液單核細胞培養：取人類周邊血液 (含抗凝血劑)，離心後，取 Buffy coat 至離心管中，加入 Ficoll-Paque 試劑 (Amersham Biosciences, USA) 離心，以分離單核細胞。將上述收集的單核細胞 (細胞密度 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$) 以 RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium 培養，內含 10% 的胎牛血清與 25 ng/mL 的 M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor)，實驗組另加入奈米金 (15 ppm) 處理 (對照組則不加入奈米金)。

奈米金攝入量之量測

將已知濃度之奈米金 (SD TECH, R.O.C.) 溶液作系列稀釋，以紫外線-可見光分光光譜儀 (Thermo Fisher Scientific Inc. USA) 測量 520 nm 處之吸光值，依此製作吸收度-濃度之檢量線。

加入奈米金 (15 ppm) 於上述細胞培養基中，1 天後，收集細胞，加入 Phosphate buffer solution (PBS)，以 3000 rpm 離心 5 min，重複此步驟 5 次，保留最後一次上清液，並收集經離心沉澱的細胞。將上述收集之上清液，以分光光譜儀測量在 520 nm 的吸光值。所收集的細胞加入 1000 μ L 去離子水，以均質機 (DIAX 900,

Heidolph, Inc., Germany) 均質後，相對於對照組之均質液(空白樣品)測量 520 nm 的吸光值。將所測得之值，經檢量線換算奈米金之相對量。

細胞凋亡染色

去除細胞培養液後，以 PBS 沖洗殘餘培養液，加入細胞凋亡染劑(Annexin V-FITV apoptosis detection kit; Strong Biotech Co., R.O.C.)，染 5 min，在螢光顯微鏡下觀察細胞凋亡的比率。

造骨細胞染色

將培養 10 天後之骨髓細胞以細胞固定劑固定 5 min，去除固定劑後，以鹼性磷酸酶染劑(alkaline phosphatase; SIGMA -Aldrich Co., USA) 染色 30 min (含鹼性磷酸酶的細胞，可被染成粉紅色)。接著以加入 Trypsin (0.1%) 至培養盤，經 3 min 後，將貼附於培養盤的細胞群落打散，使成單一懸浮細胞，於顯微鏡下計算 100 個細胞中含鹼性磷酸酶的細胞數目百分比。

骨生成染色

細胞經培養 20 天後，去除培養液，以茜素紅(Alizarin red) 染色 5 min。骨組織中的鈣，可被染色劑染成紅色，依紅色的深淺可比較骨組織的生成量。

基因表現分析

A. 細胞核醣核酸萃取：

上述細胞經培養 3 天後，以 PBS 沖洗 3 次，加入 RNA 萃取試劑萃取 RNA，將萃取之 RNA 冰存於-80°C 冰箱備用。

B. 反轉錄聚合酶連鎖反應(Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)：

加入反轉錄酶於萃取後之 RNA，進行反轉錄反應。利用聚合酶連鎖反應將反轉錄之 cDNA 放大。引子(primer)的序列為：

GADPH, Upper primer 5' ACT TTG TCA AGC TCA AGC TCA TTT CC3' 和 Lower primer 5' TGC AGC GAA CTT TAT TGA TG3' ；

BMP, Upper primer 5' ACA CCT GGG TTC TCC TCT AA3' 和 Lower primer 5' GGG AAA CAG TAG

TTT CCA GC3' 聚合酶連鎖反應步驟：94 °C 的溫度下 3 分鐘，1 cycle，接著 94 °C 的溫度下 30 秒，56 °C 30 秒，72 °C 40 秒，共 30 cycle，之後在 72 °C 的溫度下 5 分鐘，1 cycle。步驟完成後，溫度設定在 25 °C。將產物加入 ethidium bromide 的洋菜膠(2%) 進行電泳，之後在影系統中拍照分析。

統計方法

所求出參數的數據以平均值±標準誤表示，並以 Student's t test 進行統計分析。若機率值 p 小於 0.05 即被認為具有統計上的差異。

結果

細胞奈米金攝入量測量

含奈米金(15 ppm)之 PBS 清洗液，其離心前後的奈米金濃度比較如圖 1-A 所示。結果顯示，奈米金在 3000 rpm 之轉速下離心 5 min 後並無沉澱產生，因此，不會隨著細胞沉澱至底部，亦即利用離心法可將細胞內與溶液中之奈米金分離。此外，最後一次清洗細胞之上清液，其奈米金含量幾近為零(圖 1-B、C、D)，顯示細胞外的奈米金已被清洗掉，不致干擾細胞對奈米金攝入量之量測。圖 1-E 顯示，在相同的細胞數目(3×10⁵)下，血液單核球與骨髓細胞(正常細胞)對奈米金的攝取量分別為 25.8±1.8 及 30.6±4.3 μg，而 HeLa cells 則為 51.9±4.8 μg。由攝入奈米金的結果顯示，HeLa cell 對奈米金的攝取量大於正常細胞(P<0.05)。

細胞凋亡統計

HeLa cells 以 15 ppm 奈米金處理並培養 1 天後，以 γ 射線(0 或 5 Gy) 照射細胞。隔天，以細胞凋亡染劑染色，統計細胞凋亡數目。由螢光顯微鏡觀察細胞凋亡情形，其結果如圖 2-A、2-B 所示，顯示未經奈米金處理的細胞所發出的螢光較少。攝入奈米金之細胞有較多呈現螢光反應，且出現許多凋亡小體。另外由(圖 2-C)結果顯示，奈米金處理組之細胞凋亡數目(61.78±4.76/100 cells)明顯大於未經奈米金處理組(33.8±4.3/100 cells)(P<0.05)。以上結果顯示，HeLa cells

攝入奈米金後，將對輻射線更加敏感，且血液單核球與骨髓細胞亦有相似的結果(圖 3 與圖 4)。

骨髓細胞分化分析

骨髓細胞可分化成許多種細胞(例如常見的造骨細胞)，為了觀察奈米金被骨髓細胞攝入後是否會影響其分化成造骨細胞，故取骨髓細胞進行相關實驗。因造骨細胞會分泌 ALP，以利骨組織生成，所以此種細胞比例的增加，可以作為造骨細胞分化之參考指標。由實驗結果(圖 5)顯示，若細胞單獨攝入奈米金，將增加含鹼性磷酸酶(ALP)之細胞比率，然而此種效應，經輻射照射後，反而會轉為抑制($p < 0.05$)。由於造骨細胞的分化與骨組織生成有關，因此，另外觀察骨組織生成量是否受到影響；由實驗結果(圖 6)顯示，若細胞單獨攝入奈米金，可增加骨組織生成(Bone formation)，然而，使該細胞接受輻射照射後，此種效應反而會受到抑制。

骨髓細胞基因表現分析

有關奈米金對骨髓細胞基因表現的影響(圖 7)，結果顯示骨髓細胞攝入奈米金後，可促進 BMP 基因之表現，而此基因與造骨細胞分化及骨組織生成有關，顯示奈米金具有促進造骨細胞分化之能力。然而，攝入奈米金之骨髓細胞，若經輻射照射，則 BMP 之基因表現反而較無攝入奈米金組還低。

討論

本實驗發現 Hela cells 攝入奈米金的量大於正常組織(圖 1)，約為正常組織的 2 倍。先前之文獻研究指出，將奈米金(粒徑 1.9 nm)由靜脈打入小鼠體內，分析腫瘤組織與正常組織攝入奈米金的量，結果發現，腫瘤組織之奈米金攝入量與正常組織比較可高至 8:1，事實上，奈米金顆粒之粒徑亦影響組織之攝取量[24]。

早期細胞凋亡時，細胞膜的磷脂質會外露，容易與 Annexin V 結合，若將 Annexin V 標示上 fluorescein isothiocyanate (FITC) 螢光物質，則當細胞凋亡的磷脂質與 Annexin V-FITC 結合後，即可在顯微鏡下觀察到凋

亡細胞所釋出之螢光(圖2-A)，反之，非凋亡之細胞，則不會顯現螢光。若發生晚期細胞凋亡，則 Propidium Iodide (PI) 可進入細胞內與凋亡小體結合，在螢光顯微鏡下可見到發出螢光之凋亡小體，如圖2-B箭頭標示處。由結果可發現，攝入奈米金之 Hela cells 經輻射照射後，不僅會增加該細胞的凋亡率，且攝入奈米金組有許多細胞皆已出現凋亡小體。顯示細胞攝入奈米金後會增加對輻射的敏感度，而提早引發細胞凋亡。利用雙染色法統計細胞凋亡狀況發現，細胞單純攝入奈米金 (15 ppm) 並不會引發細胞凋亡 ($P > 0.05$)。研究奈米金顆粒對細胞的毒性效應之文獻[25]指出，粒徑 2-15 nm 之奈米金顆粒對細胞是安全的。本實驗採用之粒徑 ≤ 20 nm，由實驗結果(圖2)，顯示細胞單獨攝入奈米金是安全的，此與上述的相關研究結果類似。另外有研究發現，當奈米金注入體內除了少數被細胞吸收外，主要的排出路徑為腎臟，並不會聚集在體內[26]。由於奈米金對輻射劑量的吸收大於組織細胞，目前已有研究設法對奈米金作表面之化學修飾，以使癌細胞對奈米金之吸收遠高於正常組織，並利用此原理開發癌細胞輻射增敏劑，用於腫瘤治療[27]。

當基質細胞分化成造骨細胞時，該細胞會分泌 ALP，量的多寡可作為造骨細胞活性的指標[17]，百分比愈大者，表示基質細胞分化成造骨細胞比率愈大。由結果(圖5)發現，骨髓細胞單獨攝入奈米金後，會增加該細胞會分泌鹼性磷酸酶，顯示奈米金會促進骨髓分化成造骨細胞。上述結果與骨組織生成(圖6)可相互印證，皆顯示奈米金有促進骨髓細胞分化的功能。有學者研究發現，若奈米金帶正電荷時，將極容易嵌入雙螺旋DNA的骨架中，進而影響DNA相關運作與功能的表現[28]。本研究所使用之奈米金粒子雖然不帶電荷，但由 RT-PCR 的結果發現，奈米金粒子會促進與細胞分化有關的蛋白質(BMP)基因的表現，此結果是否與帶正電荷奈米金有相似的作用機轉則需進一步探討。雖然骨髓細胞單獨攝入奈米金粒子可促進 BMP 基因的表現並使該細胞分化成造骨細胞，然而骨髓細

胞攝入奈米金粒子後，若經輻射照射則此效應將受到抑制；此結果推論與奈米金可增加細胞核酸對輻射線

之敏感性而提高其輻射損傷[29]有關。

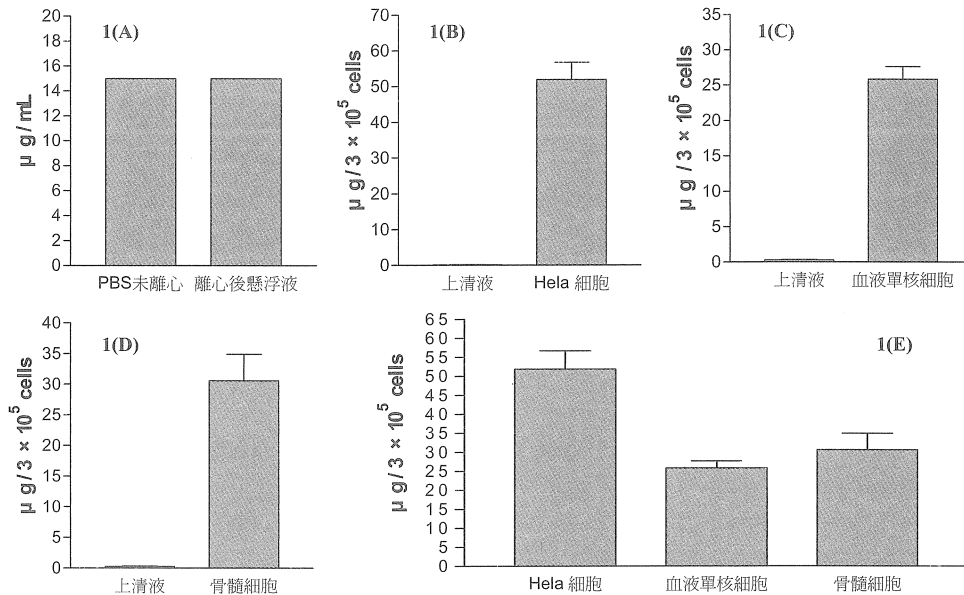


圖1 不同細胞對奈米金攝取量之比較。給予不同種類細胞($1 \times 10^4/\text{cm}^2$)相同濃度之奈米金(15 ppm)，經培養1天後，去掉培養液，以胰蛋白酶將細胞打下(取 3×10^5 個細胞)，加入PBS後，以3000 rpm離心5 min，除去上清液，重覆此步驟5次，保留最後一次之上清液，測量上清液及該沉澱細胞之奈米金攝取量。(A)：PBS(奈米金濃度15 ppm，未經離心)及該溶液經離心後，其上清液每毫升之奈米金含量。(B)：Hela cells及最後保留之上清液之奈米金含量之比較。(C)：周邊血液單核細胞及最後保留之上清液奈米金含量的比較。(D)：骨髓細胞及最後保留之上清液奈米金含量的比較。(E)：上述3種細胞的奈米金攝取量之比較

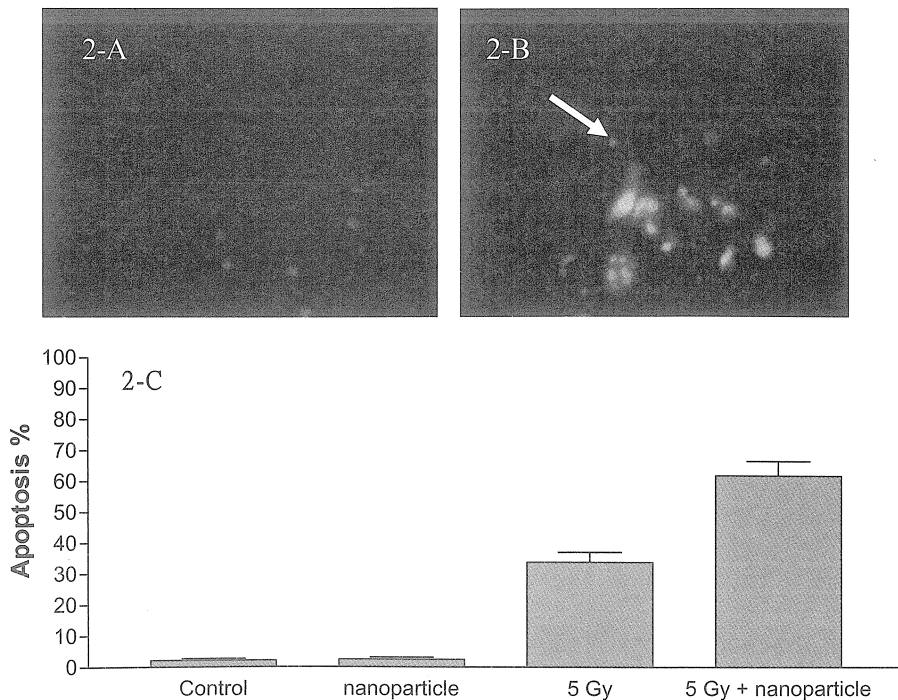


圖2 攝取奈米金之 HeLa cells 經輻射照射後之細胞凋亡情形。HeLa cells 給予 15 ppm 奈米金處理 1 天後，以 γ

射線(0 或 5 Gy)照射細胞,隔天以 Annexin V-FITC 染劑染色,在螢光顯微鏡下統計細胞凋亡率。圖 2-A: 不加奈米金處理之 Hela cells 經 γ 射線照射後之細胞凋亡情形,可見初期凋亡的細胞。圖 2-B: 加奈米金處理之 Hela cells 經 γ 射線照射後之細胞凋亡情形,可見許多晚期凋亡的細胞及凋亡小體(箭頭指示處)。圖 2-C: Hela cells 經不同條件處理後的細胞凋亡率統計圖,由結果可發現奈米金可增加 Hela cells 經輻射照射後的細胞凋亡率,但若不經輻射照射,則是否加奈米金則沒有影響

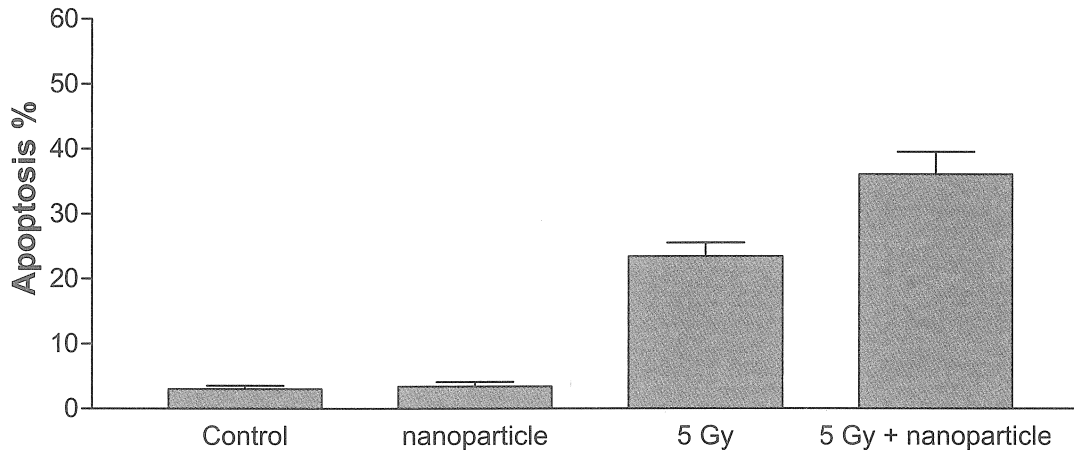


圖 3 周邊血液單核細胞攝取奈米金後經輻射照射所造成之細胞凋亡的情形。取人類周邊血液,以 Ficoll-Paque 試劑分離單核細胞,將上述收集之單核細胞(細胞密度 $1 \times 10^4 / \text{cm}^3$)以 RPMI-1640 medium 培養,給予或無 15 ppm 之奈米金處理。1 天後,以 γ 射線(0 或 5 Gy)照射細胞。隔天以 Annexin V-FITC 染劑染色,在螢光顯微鏡下統計細胞凋亡率。由結果可發現,奈米金可增加周邊血液單核細胞經輻射照射後的細胞凋亡率,但若不經輻射照射,則是否加奈米金則沒有影響

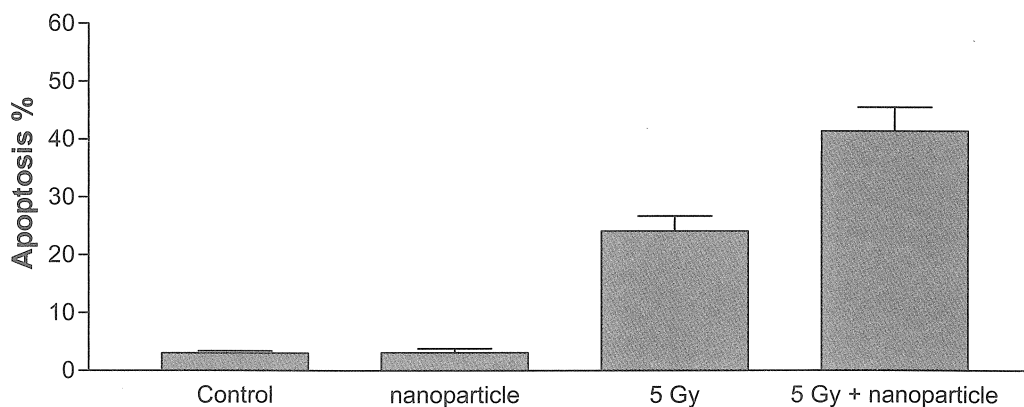


圖 4 骨髓細胞攝取奈米金後經輻射照射後所造成之細胞凋亡的情形。取小鼠股骨與脛骨,除去骨頭之前後兩端。以 23 號針頭抽取 HPSS 沖出骨髓腔內的骨髓。將上述收集之骨髓(細胞密度 $1 \times 10^4 / \text{cm}^3$)以 α MEM medium 培養,內含 10% 的胎牛血清與 10^{-8} M 之 Dex 溶液,給予或無 15 ppm 之奈米金處理。1 天後,以 γ 射線(0 或 5 Gy)照射細胞。隔天以 Annexin V-FITC 染劑染色,在螢光顯微鏡下統計細胞凋亡率。由結果可發現奈米金會增加骨髓細胞經輻射照射後的細胞凋亡率,但若不經輻射照射,有無加奈米金則沒有影響

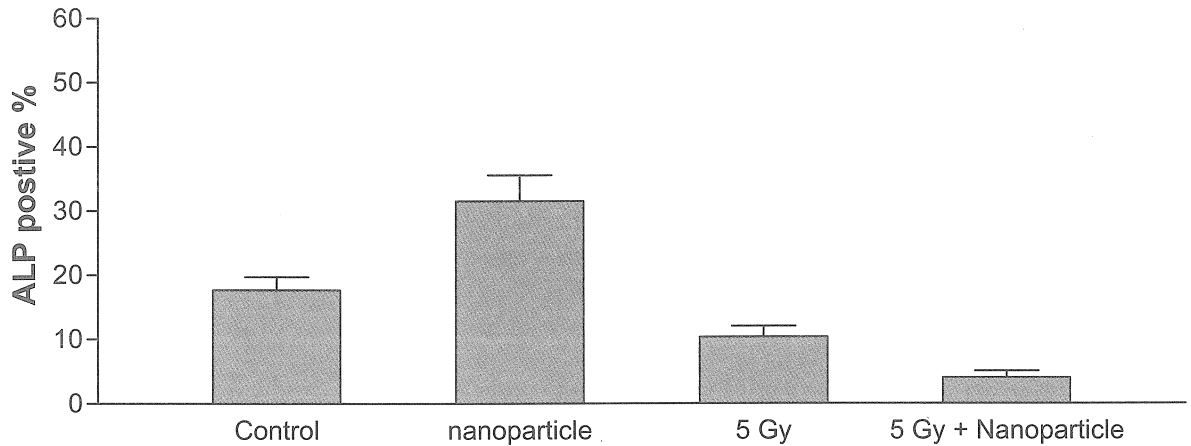
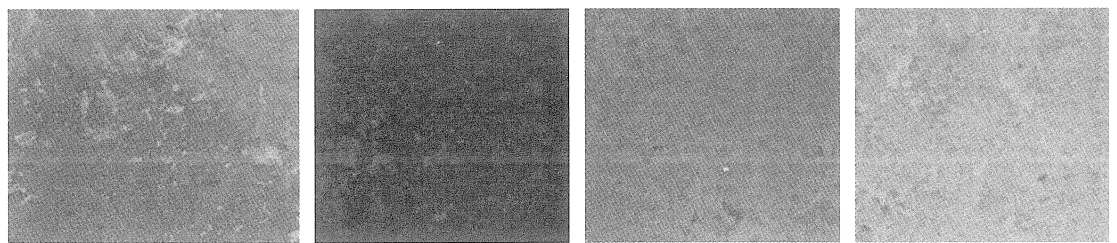


圖 5 攝取奈米金對骨髓細胞分化成造骨細胞的影響。取小鼠股骨與脛骨，除去骨頭之前後兩端。使用 23 號針頭，以 23 號針頭抽取 HPSS 沖出骨髓腔內的骨髓。將上述收集之骨髓（細胞密度 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ）以 α MEM medium 培養，內含 10% 的胎牛血清與 10^{-8} M 的 Dex 溶液，給予或無 15 ppm 之奈米金處理。1 天後，以 γ 射線（0 或 5 Gy）照射細胞。10 天後，以鹼性磷酸酶染劑染色，再以胰蛋白酶將細胞打散，在顯微鏡下統計每 100 個細胞含鹼性磷酸酶的細胞比率（含鹼性磷酸酶之細胞會被染成粉紅色）。結果發現，奈米金可增加含鹼性磷酸酶的細胞比率，然而此效應經輻射照射後，反而會轉為抑制



奈米金	—	+	—	+
γ 射線	—	—	+	+

圖 6 攝取奈米金對骨髓細胞分化成造骨細胞的情形。以 α MEM medium 培養小鼠骨髓細胞（細胞密度 $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ），medium 內含 10% 的胎牛血清與 10^{-8} M Dex 的溶液，給予或無 15 ppm 之奈米金處理，1 天後，以 γ 射線（0 或 5 Gy）照射細胞。上述細胞培養 20 天後，以茜素紅（Alizarin red）染劑染色；此種染劑可與骨組織中的鈣結合，使骨組織被染成紅色（顏色愈深表示骨組織愈多）。結果發現，奈米金可增加骨組織生成，然而此種效應，經輻射照射後，反而會轉為抑制

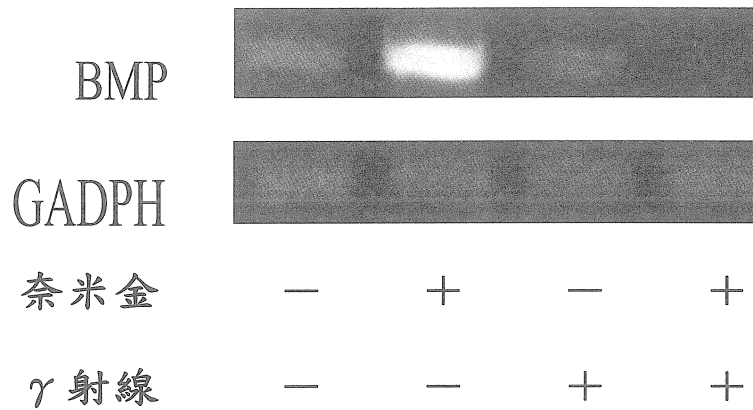


圖 7 骨髓細胞攝取奈米金後對其 BMP 基因表現的影響。以 α MEM medium 培養小鼠骨髓細胞 (細胞密度 1×10^4 / cm^2)，medium 內含 10% 的胎牛血清與 10^{-8} M 的 Dex 溶液，給予或無 15 ppm 之奈米金處理，1 天後，以 γ 射線 (0 或 5 Gy) 照射細胞。細胞培養 3 天後抽取其 RNA，經 RT-PCR 所表現 BMP 的 mRNA 相對量之比較如上圖所示，其中 GAPDH 作為定量參考用，BMP 之電泳結果作為骨髓細胞 BMP 基因表現量的參考。結果發現，骨髓細胞攝取奈米金後可增加其 BMP 基因之表現，然而，此骨髓細胞經輻射照射後，此種效應反而會轉為抑制。

結論

Hela cells對奈米金顆粒之攝入量高於正常組織細胞，當細胞攝入奈米金後，可增加細胞對輻射的敏感性，使細胞之凋亡率增加。

參考文獻

1. 衛生署網頁 <http://www.doh.gov.tw/statistic/data/> 衛生統計重要指標/95/8.xls
2. Dainiak N, Sorba S. Early identification of radiation accident victims for therapy of bone marrow failure. *Stem Cells* 1997;15:275–285.
3. Mundt AJ, Sibley GS, Williams S, Rubin S, Heimann R, Halpern H, Weichselbaum R.. Patterns of failure of complete responders following high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for metastatic breast cancer: implications for the use of adjuvant radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1994;30:151–160.
4. Rose MS. Successful repeated platelet-transfusion in radiation-induced bone-marrow failure. *Lancet* 1967;1:309.
5. Lackner JM, Lou CM, Mertz HR, Wack DS, Katz LA, Krasner SS, Firth R, Mahl TC, Lockwood AH. Cognitive therapy for irritable bowel syndrome is associated with reduced limbic activity, GI symptoms, and anxiety. *Behav Res Ther* 1996;44:621–638.
6. Mann NS. Upper GI symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2004;99:1191.
7. Okumura T. Tests to detect GI motility disorders and GI sensation in irritable bowel syndrome. *Nippon Rinsho* 2006;64:1457–1460.
8. 戴昌世、王秉俊。抗輻射藥物研究，軍事醫學科學出版社，2003:167.
9. Chae HJ, Park RK, Kang JS, Shin HS, Kim SC, Chung HT, Son DW, Ko KI, Kim JB, Park YC, Kim

- HR, Effect of stem cell factor, interleukin-6, nitric oxide and transforming growth factor-beta on the osteoclast differentiation induced by 1 alpha,25-(OH)2D3 in primary murine bone marrow cultures. *Pharmacol Toxicol* 1998;82(5): 223-229.
10. Balduino A, Hurtado SP, Frazao P, Takiya CM, Alves LM, Nasciutti LE, El-Cheikh MC, and Borojevic R, Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. *Cell Tissue Res* 2005;319(2): 255-266.
11. Furman R., Nicholas JJ, Jivoff L. Elevation of the serum alkaline phosphatase coincident with ectopic-bone formation in paraplegic patients. *J Bone Joint Surg Am* 1970;52(6): 1131-1137.
12. Kim S, Jung JM, Choi DG, Jung HT, Yang SM, Patterned arrays of au rings for localized surface plasmon resonance. *Langmuir* 2006;22(17): 7109-7112.
13. Lian JB, Javed A, Zaidi SK, Lengner C, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein G.S, Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2004;14(1-2): 1-41.
14. Ohba S, Chung UI, Tei Y. Osteoblast differentiation induced by BMP signaling and Runx2 through Cbfb regulation. *Nippon Rinsho* 2007; 65(9): 71-74.
15. Coss D, Yang L, Kuo CB, Xu X, Luben RA, Walker AM. Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the developing rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(6): E1216- E1225.
16. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol* 1994; 161(1): 218-228.
17. van Straalen JP, Sanders E, Prummel MF, Sanders GT. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. *Clin Chim Acta* 1991; 201(1-2): 27-33.
18. Takae SY, Akiyama Y., Yamasaki Y., Nagasaki, Kataoka K. Colloidal Au replacement assay for highly sensitive quantification of low molecular weight analytes by surface plasmon resonance. *Bioconjug Chem* 2007; 18(4):1241-1245.
19. Nezhad MR, Alimohammadi M, Tashkhourian J, Razavian SM, Optical detection of phenolic compounds based on the surface plasmon resonance band of Au nanoparticles. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2007 (doi:10.1016/j.saa.2007.12.003).
20. Lyon LA. Musick MD, and Natan MJ. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance immunosensing. *Anal Chem* 1998; 70(24): 5177-5183.
21. Lytton-Jean AK, Mirkin CA. A thermodynamic investigation into the binding properties of DNA functionalized gold nanoparticle probes and molecular fluorophore probes. *J Am Chem Soc* 2005; 127(37): 12754-12755.
22. Csaki A, Moller R, Straube W, Kohler JM, Fritzsche W. DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy. *Nucleic Acids Res* 2001;29(16): E81.
23. Paciotti GF, Myer L, Weinreich D, Goia D, Pavel N, McLaughlin RE, Tamarkin L. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv* 2004;11(3): 169-183.
24. Hainfeld JF, Slatkin DN, and Smilowitz HM. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys Med Biol* 2004; 49(18): N309- N315.
25. Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, Schmid G, Brandau W, and Jahnke-Dechent W. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles. *Small* 2007;3(11): 1941-1949.
26. Cho SH. Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study. *Phys Med Biol* 2005;50(15): N163- N173.
27. Caruso F, Rossi M, Tanski J, Pettinari C, Marchetti

- F. Antitumor activity of the mixed phosphine gold species chlorotriphenylphosphine-1,3-bis(diphenylphosphino)propanegold(I). *J Med Chem* 2003; 46(9): 1737-1742.
28. Harris SE, Bonewald LF, Harris MA, Sabatini M, Dallas S, Feng JQ, Ghosh-Choudhury N, Wozney J, Mundy GR. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1994;9(6): 855-863.
29. Zheng Y, Hunting DJ, Ayotte P, Sanche L. Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons. *Radiat Res* 2008; 169(1): 19-27.

Effect of Nano Gold Particles on Potentiating Radiation Sensitivity of Cells

Wei-Chung Liu¹ Nien-Tzu Keng¹ Yu-Chun Lee² Chia-Chi Lung³ *Chun-Chih Lin⁴

¹*Department of Radiological Technology, Tzu-Chi College of Technology*

²*Institute of Natural Healing Sciences, Nanhua University*

³*Department of Public Health, Chung Shan Medical University*

⁴*General Education Center/Department of Natural Biotechnology/Institute of Natural Healing Sciences, Nanhua University*

Abstract

Nano gold particles (≤ 20 nm in diameter) were cocultured with HeLa cells and normal cells to investigate the difference between both cells in the intaken quantity toward nano gold particles and the sensitivity toward radiation. Experimentally, the nano gold particles (15 ppm) were respectively added into the culture media of bone marrow cells, peripheral blood monocytes and HeLa cells. On the next day, the intaken quantity was measured. After irradiated with γ -ray (0 or 5 Gy), cell morphology observation as well as the comparison about cell apoptosis and BMP gene expression were carried out to investigate if nano gold particles have effect on the differentiation of bone marrow cells.

The results indicated that the intaken quantity toward nano gold particles for bone marrow cells and peripheral blood monocytes was 50% and 59% respectively than that for HeLa cells. When compared with cells without nano gold particle intake, the apoptosis rate for the irradiated cells intaking nano gold particles were 183%, 172% and 154% for HeLa cells, bone marrow cells and peripheral blood monocytes respectively. No statistical difference in apoptosis rate was observed among the three kinds of cells. Besides, the nano gold particles were discovered able to increase the ratio of cells excreting alkaline phosphatase and to promote bone formation in the experiment of bone marrow cell differentiation. The nano gold particles were also observed able to enhance BMP gene expression in the analysis of gene expression. Provided that the bone marrow cells intaking nano gold particles were irradiated, the above factor was suppressed.

According to the results, the nano gold particles were capable of potentiating radiation sensitivity of HeLa cells, bone marrow cells and peripheral blood monocytes as well as to enhancing their apoptosis. The intaken quantity toward nano gold particles for HeLa cells was apparently higher than normal cells, for which the radiation damage was less severe than that of HeLa cell after intaking the particles.

Keywords: bone marrow, nano gold, radiotherapy, radiosensitizer, tumor