

羧甲基- β -1,3-葡聚糖对 人 B 淋巴母细胞的辐射防护作用

马斌博^{1,2} 王转子² 魏巍² 党秉荣² 李文建^{1,2}

¹ (兰州大学药学院 兰州 730000)

² (中国科学院近代物理研究所 兰州 730000)

摘要 利用 X 射线辐照经羧甲基- β -1,3-葡聚糖预处理的人 B 淋巴母细胞(Human B lymphoblasts, HMy2.CIR), 探究羧甲基- β -1,3-葡聚糖对辐射损伤的防护作用。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 并筛选出最佳给药浓度和孵育时间(0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 72 h); 流式细胞仪检测羧甲基- β -1,3-葡聚糖对辐照后 HMy2.CIR 细胞凋亡的影响; 微核实验检测羧甲基- β -1,3-葡聚糖对辐照后 HMy2.CIR 细胞微核形成的影响; 彗星实验检测对 DNA 损伤程度和修复的影响。结果表明, 羧甲基- β -1,3-葡聚糖对 HMy2.CIR 无细胞毒性并具有增殖促进作用; 羧甲基- β -1,3-葡聚糖能够抑制辐射造成的凋亡率和微核率的增加, 降低 DNA 损伤程度, 加快损伤 DNA 的修复。羧甲基- β -1,3-葡聚糖对 HMy2.CIR 细胞辐射损伤有防护作用, 其机制可能与抑制辐射诱导的细胞凋亡和 DNA 损伤有关。

关键词 羧甲基- β -1,3-葡聚糖, 人 B 淋巴母细胞, X 射线辐射, 辐射防护效应

中图分类号 R979.6, TL71

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2016.rj.34.020205

Protection effects of carboxymethyl- β -1,3-glucan on human B lymphoblasts' injury induced by radiation

MA Binbo^{1,2} WANG Zhuanzi² WEI Wei² DANG Bingrong² LI Wenjian^{1,2}

¹ (School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

² (Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT The aim is to investigate radiation protection effect induced by carboxymethyl- β -1,3-glucan on Human B lymphoblasts(HMy2.CIR). The survival rate of carboxymethyl- β -1,3-glucan on HMy2.CIR was tested by CCK-8 assay at concentrations of 0, 0.01, 0.1, 1, 100, 200 and 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The flow cytometry was used to measure the apoptosis rate. Micronucleus rate was assessed by the *in vitro* micronucleus test. DNA strand breaks were assessed by the comet assay. The results showed that treatment with carboxymethyl- β -1,3-glucan was not cytotoxic. Pre-treatment with carboxymethyl- β -1,3-glucan at concentration of 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 72 h protected HMy2.CIR cells against radiation, as indicated by increased surviving fraction, reduced apoptosis, reduced micronucleus rate and fewer DNA strand breaks. The carboxymethyl- β -1,3-glucan has radiation protection effect on

基金资助: 国家自然科学基金项目(11575259)资助

第一作者: 马斌博, 男, 1987年10月出生, 2013年毕业于西南科技大学生命科学与工程学院, 现为兰州大学在读硕士研究生, 专业为辐射防护药物

通讯作者: 李文建, 博士, 研究员, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

收稿日期: 初稿 2015-10-12; 修回 2016-01-18

Supported by the National Natural Science Foundation of China (11575259)

First author: MA Binbo (male) was born in October 1987, and received his bachelor degree from Southwest University of Science and Technology in 2013. Now he is a master candidate at Lanzhou University, majoring in radioprotector

Corresponding author: Ph.D. LI Wenjian, professor, E-mail: wjli@impcas.ac.cn

Received 12 October 2015, accepted 18 January 2016

HMy2.CIR cells, which may be related to inhibition of apoptosis and DNA damage after radiation.

KEYWORDS Carboxymethyl- β -1,3-glucan, Human B lymphoblasts, X-ray radiation, Radiation protection effect

CLC R979.6, TL71

放射治疗是一种有效的肿瘤治疗手段,但治疗时射线不能针对特定的肿瘤组织,对肿瘤组织周围的正常组织也会造成不必要的辐射损伤^[1-2]。不同种类的多糖,例如葡聚糖、甘露聚糖和葡甘露聚糖等具有抗遗传毒性、抗氧化、抗辐射、抗感染和抗肿瘤活性,一直被用于增强免疫能力和免疫调节^[3]。

β -葡聚糖具有预防癌症、保肝、降血脂和恢复造血等对人体有益的功能^[4-9]; β -葡聚糖根据溶解性分为可溶性和不溶性两类,酵母 β -葡聚糖是属于不溶性的,其在科学研究、医药、食品和化妆品等相关领域的应用受到了极大的制约。本研究选用的羧甲基- β -1,3-葡聚糖(Carboxymethyl- β -1,3-glucan, CMG)由酿酒酵母中的 β -葡聚糖通过羧甲基化制备得到。

本文旨在通过羧甲基化对不溶性 β -葡聚糖进行改性,从而达到增溶的目的。化学修饰不会破坏 β -葡聚糖的三股螺旋构象^[10],因此修饰后的葡聚糖仍具有免疫增强、抗氧化、抗辐射和抗肿瘤等活性,而且水溶性明显增加,便于使用,同时拓宽了酵母 β -葡聚糖的应用领域^[11-12]。不溶性酵母 β -葡聚糖的羧甲基化衍生物对细胞的辐射防护效应还未见报道。本研究采用人 B 淋巴母细胞(HMy2.CIR),研究了羧甲基- β -1,3-葡聚糖的细胞毒性效应及其对细胞辐射损伤的防护效应。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

正常人 B 淋巴母细胞购自中科院上海细胞库,由中科院近代物理研究所生物物理室培养和保藏。用含 10%胎牛血清的 IMDM(Iscove's modified Dulbecco medium)培养液(Gibco)(加青霉素和链霉素各 100 U/mL)培养,呈悬浮生长,在 CO₂ 恒温培养箱中培养,用对数生长期细胞进行实验。

1.2 药品和仪器

1.2.1 主要药品

IMDM 培养基(Gibco)、胎牛血清和磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)(HyClone)、细胞

增殖及细胞毒性检测试剂盒(Cell Counting Kit-8, CCK-8)(日本同仁化学),细胞凋亡检测试剂盒(AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit)(联科生物技术有限公司),DMSO 和 Triton X-100(上海生工生物工程有限公司),低熔点琼脂糖凝胶(LMPA)、正常熔点琼脂糖凝胶(NMPA)、溴化乙锭(EB)和吖啶橙(AO)(SIGMA)、羧甲基- β -1,3-葡聚糖均由本实验室制备。

1.2.2 仪器

RX-650 X 射线仪(FAXITRON, 美国),流式细胞仪(Becton Dickinson and), AR20ro 型酶标仪(ANSOSROSIS, 瑞典), BX53+DP72 光学荧光成像显微系统(OLYMPUS, 日本)。

1.3 实验分组及细胞照射

取对数生长期 HMy2.CIR, 实验分为以下 4 组: 对照组(Control)、加药组(CMG)、X 射线照射组(IR)以及联合组(IR+CMG)。IR 和 IR+CMG 进行 1.5 Gy 的 X 射线照射, 剂量率为 1 Gy/min。

1.4 细胞毒性及增殖实验

制备适宜浓度的 HMy2.CIR 单细胞悬液,向 96 孔板中每孔接种 3 000 个细胞。实验分为: 空白组(不含细胞和药物), 对照组(含细胞), 实验组(含细胞和药物)实验设置 6 个不同药物浓度, 各处理组 6 个复孔。向各处理组细胞分别给予不同浓度的 CMG(终浓度分别为 0、0.01、0.1、1、100、200、400 μ g/mL), 孵育 24、48、72 h 后向每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液。将加入 CCK-8 的 96 孔板在 37 $^{\circ}$ C 下继续反应 2 h, 然后测定各孔在 450 nm 的吸光值(A)以计算细胞存活率(R, %), 重复 3 次, 求平均值。

$$R = \frac{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

1.5 细胞凋亡实验

实验分组按 1.3 节进行。接种适宜浓度的 HMy2.CIR 的单细胞悬液于 6 孔板中。CMG 和

IR+CMG 的细胞用 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 药物预处理 72 h, 预处理后进行 X 射线照射至吸收剂量为 1.5 Gy, 照射结束后各不同处理组细胞立即更换新鲜培养液, 继续培养 24 h 后收集细胞, PBS 洗涤细胞两次, 加入 500 μL Annexin V Binding Buffer 悬浮细胞, 再加入 10 μL 的 Annexin V-FITC 混匀后, 加 5 μL 的 PI, 混匀; 反应 15 min, 整个染色过程需避光在室温条件下进行, 最后流式上样检测早凋和晚凋率。

1.6 微核实验

实验分组与处理分别按 1.3 节和 1.5 节进行。IR 组和 IR+CMG 经 X 射线照射至吸收剂量为 1.5 Gy, 照射结束后给各不同处理组细胞更换新鲜培养液, 分别收集 24、48、72 h 后 3 个时间点的微核, 借鉴参照文献的微核实验方法^[13], 并略作改进, 到时间点后, 收集各不同处理组的细胞, 先用低渗液(浓度 0.075 mmol/L 的 KCl) 进行低渗, 然后用固定液(甲醇:冰醋酸=3:1) 进行固定, 最后滴片, 晾干, 用 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 吖啶橙(AO)染色后, 将染好的片子置于荧光显微镜拍照、观察, 统计微核。

当有多个微核出现在 1 个细胞中时, 只统计为 1 个微核细胞。各不同处理组均观察两张片子, 每张片子上统计细胞染色清晰并且结构完整的 1 000 个细胞, 统计出现微核的细胞数, 计算微核率。

1.7 彗星实验

实验分组与处理分别按 1.3 节和 1.5 节进行。IR 组和 IR+CMG 经 X 射线照射至吸收剂量为 1.5 Gy 后分别于 0、10 min 收集各不同处理组细胞进行彗星实验, 操作步骤借鉴文献^[14], 并略做改变。

1.7.1 制片

第一层凝胶制备: 加热溶解正常熔点琼脂糖(Normal melting agarose, 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 μL), 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 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 15 min 使其凝固。第二层凝胶的制备: 加热溶解低熔点琼脂糖(Low melting agarose, LMA)于 PBS 中, 使其浓度为 1%, 冷却到 37 $^{\circ}\text{C}$, 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、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一层胶上, 平整和凝固凝胶操作与上一步相同。第三层凝胶的制备: 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)于第二层已经凝固的凝胶上, 平整和凝固凝胶操作与上一步相同。

1.7.2 细胞裂解

将新鲜配制的并事先预冷的, pH 值为 10.0 的碱性裂解液缓慢地加到铺平放置好凝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。

1.7.3 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。

1.7.4 中和与染色

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, 浓度为 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。

1.7.5 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。

1.8 实验数据处理

所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各数据组间分析均采用单因素方差分析, 当 $p < 0.05$ 时认为有统计学意义。统计分析由 SPSS18 软件完成; 流式数据均采用 FlowJo7.6 软件处理; 彗星图像软件(Comet assay software project, CASP) 分析尾矩(Tail moment, TM); 统计图采用 Origin7.5 软件绘制。

2 结果

2.1 CMG 对细胞增殖的影响

图 1 为 HMy2.CIR 分别给予含 0、0.01、0.1、1、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMG 的完全培养基孵育 24、48、72 h 后的存活率。各药物浓度及作用时间下均未表现出细胞毒性, 但基本都表现出了对 HMy2.CIR 的增殖促进作用, 从而确定了 CMG 对细胞是无毒、安全的。在浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 孵育 72 h 时对 HMy2.CIR 的增殖的影响有显著性, 所以后续实验选择用 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 72 h 作为预处理条件,

研究细胞在接受 X 射线照射后, CMG 是否会起到辐射防护的作用。

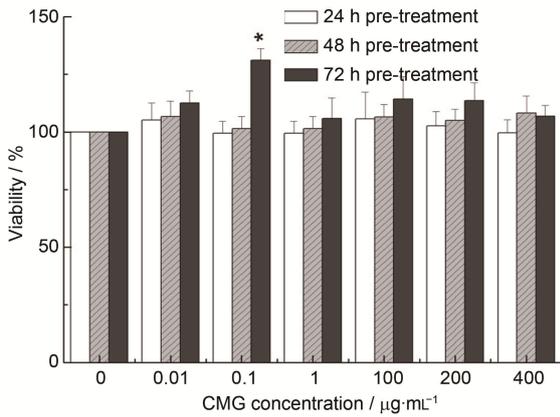


图 1 CMG 作用后的 HMy2.CIR 细胞存活率 (* $p<0.05$, 与对照组相比)

Fig.1 The survival rates of HMy2.CIR treated with different concentrations of CMG. $p<0.05$, vs. Control

2.2 CMG 对细胞凋亡的影响

正常的细胞磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)处于细胞膜内, 而 PS 在凋亡发生的早期会翻转到膜外, 此时细胞膜的结构仍具有完整性, 细胞只会被 FITC 标记的 Annexin-V 与外翻的 PS 结合, 而不会与 PI 结合; 到凋亡发生的晚期, 细胞膜结构被破坏, 两种染料可以同时与细胞结合。

对 FITC/PI 双染后各不同处理组细胞的早期凋亡和晚期凋亡率进行流式检测, 结果如图 2 所示。CMG 和 Control 相比, HMy2.CIR 的早调和晚调亡率没有表现出差异性($p>0.05$), 表明 CMG 不会诱导细胞凋亡的产生; IR 和 Control 相比, 早调和晚调比例均有所提高, 并且表现出差异性($p<0.05$); IR+CMG 与 IR 相比较, 早调和晚调的比例均有所减少, 并且表现出差异性($p<0.05$) (图 3)。

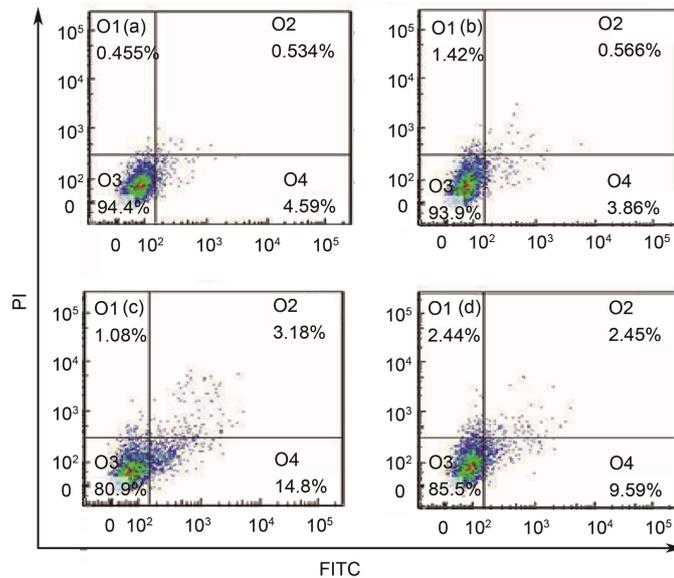


图 2 HMy2.CIR 凋亡流式检测图: (a) 对照组, (b) 加药组, (c) X 射线照射组, (d) 联合组

Fig.2 Flow cytometric diagrams of HMy2.CIR. (a) Control, (b) CMG, (c) IR, (d) IR+CMG

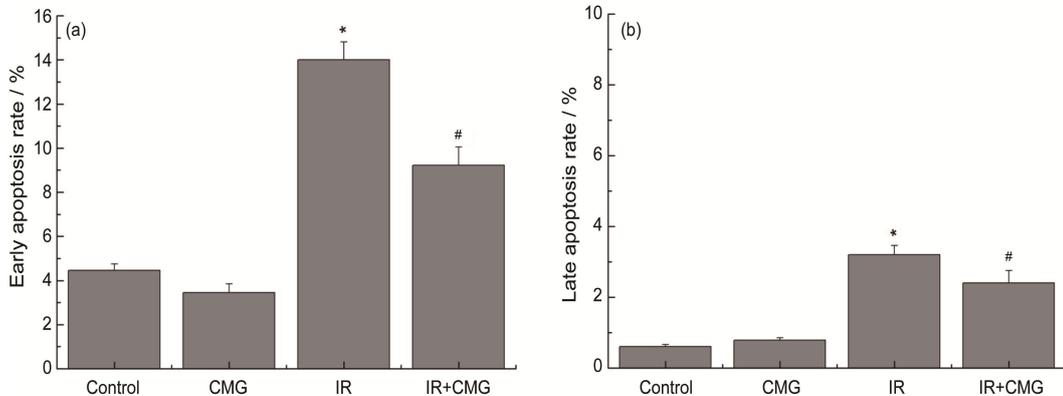


图 3 CMG 对 HMy2.CIR 早期(a)和晚期(b)凋亡率的影响 (* $p<0.05$, 与对照组相比; # $p<0.05$, 与 X 射线照射组相比)

Fig.3 Effects of CMG on the early (a) and late (b) apoptosis of HMy2.CIR. $p<0.05$, vs. Control; # $p<0.05$, vs. IR

2.3 CMG 对微核形成的影响

各不同处理组微核率随着收获时间的变化呈现先升高后降低的趋势，结果如图 4 所示。IR 和 Control 相比，各时间点微核率均有升高($p<0.01$)；IR+CMG 与 IR 相比，各时间点的微核率均有降低($p<0.01$)。由实验结果可知，CMG 对细胞的预处理能够降低微核的形成。

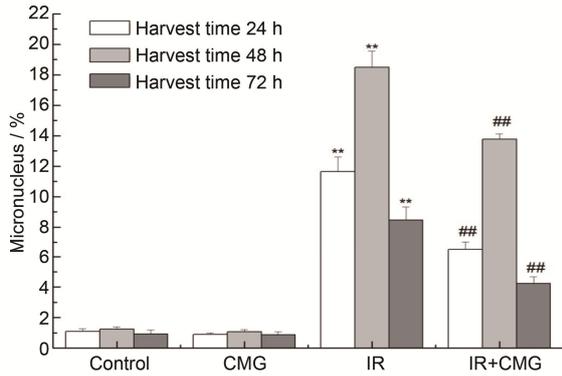


图 4 CMG 对 HMy2.CIR 微核的影响 (** $p<0.01$, X 射线照射组与对照组相比; ## $p<0.01$, 联合组与 X 射线照射组相比)
Fig.4 Effects of CMG on the micronucleus of HMy2.CIR.
** $p<0.01$, IR vs. Control; ## $p<0.01$, IR+CMG vs. IR

2.4 CMG 对 DNA 损伤修复的影响

图 5 为通过碱性单细胞凝胶电泳实验后拍摄的各处理组细胞的彗星图像。

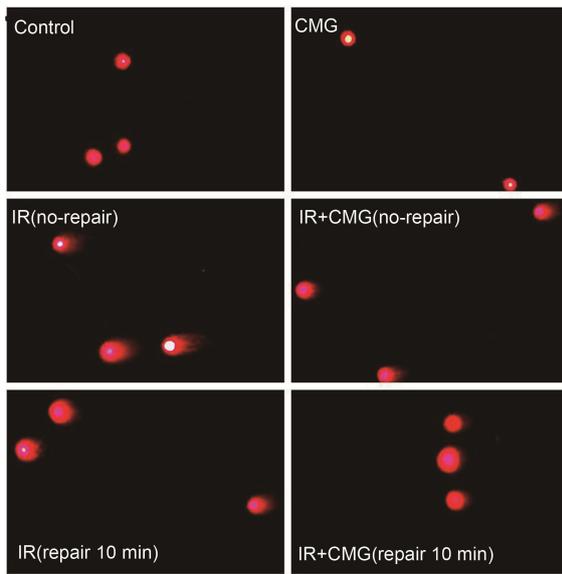


图 5 HMy2.CIR 彗星实验图像
Fig.5 HMy2.CIR images of comet assay

彗星尾距实验结果如图 6 所示，细胞在经 X 射线照射后会 DNA 损伤，未修复和修复中的 IR 和 Control 相比，尾距差异有显著性($p<0.01$)；照射后零点进行彗星实验的未修复组中 IR 和 IR+CMG 相比，尾距有差异性($p<0.05$)，表明由 X 射线照射造成的 DNA 损伤程度可由 CMG 预处理减轻；照射后给予 10 min 修复时间的 IR 和 IR+CMG 相比，尾距差异有显著性($p<0.01$)，表明 CMG 预处理对 DNA 损伤修复也产生了一定促进作用。

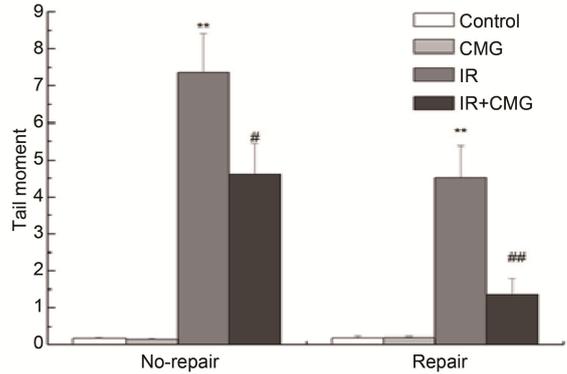


图 6 CMG 对 HMy2.CIR 尾距的影响 (** $p<0.01$, X 射线照射组与对照组相比; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, 联合组与 X 射线照射组相比)
Fig.6 Effects of CMG on the tail moment of HMy2.CIR.

** $p<0.01$, IR group vs Control group; # $p<0.05$, ## $p<0.01$, IR+CMG group vs. IR group

3 讨论

放射治疗是一种治疗癌症的有效手段，但是放疗时对正常细胞的损伤和肿瘤细胞的放射抵抗性限制了放射治疗在癌症治疗中的应用。因此，对于放疗时能选择性地增加肿瘤放疗敏感性，同时能减轻正常组织受到辐射损伤的药物的研究，已成为放射治疗学领域关注的热点。

β -葡聚糖可以作为抗癌药物，但是它对正常的组织和细胞不产生毒性作用。本研究选择 HMy2.CIR 探究 CMG 生物活性，探究 CMG 是否能够减轻细胞遭受的辐射损伤程度。由 CCK-8 的实验结果可以看出，随着 CMG 浓度(0.01~400 $\mu\text{g/mL}$)的增加和孵育时间(24~72 h)的增加都没有表现出对细胞的毒性作用和增殖抑制作用。

诸如电离辐射等外界刺激能够使细胞 DNA 受到不同类型的损伤，损伤的类型包括 DNA 单键(SSBs)、双键的断裂(DSBs)等，受到损伤的细胞自身有修复这些损伤以及阻止损伤所致的突变损伤遗

传进入下一代的能力^[15]。细胞受到的损伤需要有足够的时间来修复,这样就会出现周期阻滞现象^[16-17],使其停滞在细胞周期的某一个阶段(例如 G2/M 期),如果损伤的程度超过了细胞自身的修复能力,则细胞会启动凋亡的发生,清除无法进行修复的细胞。同时活性氧在电离辐射对细胞造成的氧化损伤中也发挥着至关重要的作用,通常情况下机体或细胞内的活性氧处于动态平衡^[18-19],由于电离辐射能够诱导活性氧增加,从而使细胞内活性氧生成和清除的平衡被打破,使细胞受到氧化损伤。从早调和晚调的实验结果可以看出,IR+CMG 与 IR 相比,早调和晚调率均有所降低,其原因可能是 CMG 能够促进细胞清除由于电离辐射产生的多余的自由基,减少活性氧诱导的凋亡发生。

根据抵抗诱变作用机理的不同,可以把抗诱变剂进行以下两种分类:灭致突变物(Desmutagen)和生物抗致突变物(Bio-antimutagens)。灭致突变物通过直接作用于诱变剂,阻断其对机体或者细胞的作用;生物抗致突变物是在损伤发生以后,主要通过调节 DNA 的复制减轻致突变物对机体或者细胞的作用^[20],从而降低致突变物的遗传毒性。CMG 属于生物抗致突变物,其 DNA 抗辐射损伤作用可能通过与细胞上受体结合,从而激活一些信号通路有关,例如 C 型凝集素受体(Dectin-1)和 Toll 样受体(TLR)等;也可能与 CMG 的自由基清除作用有关。彗星实验结果可知,对于 X 射线造成的 HMy2.CIR SSBs 损伤,CMG 的预处理能够降低这种损伤的程度,这跟早调和晚调率变化的结果也是一致的。

如彗星实验结果所示,CMG 明显减轻了辐射所造成的 DNA 损伤,并提升了受损伤 DNA 的修复能力。CMG 产生辐射防护作用的机理或许跟药物和 HMy2.CIR 细胞膜表面的某种特定受体的结合有关,从而介导了特定的细胞修复的信号通路的激活。研究证明, β -葡聚糖的受体有 Dectin-1、选择性清道夫受体和补体受体 3(CR3, CD11b/CD8)等^[21],其中的 Dectin-1 作为具有 C 型凝集素样结构域的受体, β -葡聚糖结构中的一些特定糖基可以被其识别。同时研究证明,在人的大多数组织中该受体的 mRNA 均有表达。巨噬细胞上的 Dectin-1 和 TLR 受体能够同时识别酵母 β -葡聚糖,两种受体共同介导酵母多糖的炎症反应,并且在炎症反应发生的过程中呈现协同作用,Dectin-1 能够增强 TLR 介导 NF- κ B 信号通路激活所产生的炎性细胞因子^[22]。因

此,CMG 的辐射防护作用可能与 Dectin-1 和 TLR 受体结合,并激活 NF- κ B 的信号转导有关。

本研究证明 CMG 成为辐射防护药物的潜在可能性,同时对不溶性 β -葡聚糖的开发利用有重要意义。但对与 CMG 所结合的细胞受体或激活的细胞信号通路的研究结果尚未见相关报道。因此,对于 CMG 确切的作用机理还需进行深入探究。

参考文献

- 1 Collis S J, Schwaninger M, Ntambi A J, *et al.* Evasion of early cellular response mechanisms following low level radiation-induced DNA damage[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, **279**(48): 49624-49632. DOI: 10.1074/jbc.M409600200.
- 2 Turesson I, Carlsson J, Brahme A, *et al.* Biological response to radiation therapy[J]. *Acta Oncologica*, 2003, **42**(2): 92-106. DOI: 10.1080/02841860310004959.
- 3 Kogan G, Pajtinka M, Babincova M, *et al.* Yeast cell wall polysaccharides as antioxidants and antimutagens: can they fight cancer[J]. *Neoplasma*, 2008, **55**(5): 387-393.
- 4 Keenan J M, Goulson M, Shamliyan T, *et al.* The effect of concentrated β -glucan on blood lipids in a population of hyperchole-strolaemic men and women[J]. *British Journal of Nutrition*, 2007, **97**(6): 1162-1168. DOI: 10.1017/S0007114507682968.
- 5 Smith K N, Queenan K M, Thomas W, *et al.* Physiological effects of concentrated barley β -glucan in mildly hypercholesterolemic adult[J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2008, **27**(3): 434-440. DOI: 10.1080/07315724.2008.10719722.
- 6 Talati R, Baker W L, Pabilonia M S, *et al.* The effects of barley-derived soluble fiber on serum lipids[J]. *Family Medicine*, 2009, **7**(2): 157-163. DOI: 10.1370/afm.917.
- 7 Netea M G, Munro C A, Bates S, *et al.* Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, **116**(6): 1642-1650. DOI: 10.1172/JCI27114.
- 8 Ferwerda G, Netea M G, Joosten L A, *et al.* The role of Toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*[J]. *Vaccine*, 2010, **28**(3): 614-622. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.10.082.
- 9 Chen J, Gu W, Zhao K. The role of PI3K/Akt pathway in β -glucan-induced dendritic cell maturation[J]. *International Immunopharmacology*, 2011, **11**(4): 529.

- DOI: 10.1016/j.intimp.2011.01.027.
- 10 Bohn J A, Jame H B. (1-3) - β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships[J]. Carbohydrate Polymer, 1995, **28**(1): 3-14. DOI: 10.1016/0144-8617(95)00076-3.
 - 11 Sandula J, Machová E, Hiibalová V. Mitogenic activity of particulate yeast β -(1-3)-D-glucan and its water-soluble derivatives[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 1995, **17**(6): 323-326. DOI: 10.1016/0141-8130(96)81839-3.
 - 12 Patchen M L, D'Alesandro M M, Blakely W F, *et al.* Glucan: mechanisms involved in its "radioprotective" effect[J]. Journal of Leukocyte Biology, 1987, **42**(2): 92-105.
 - 13 Matsuoka A, Yamazaki N, Suzuki T, *et al.* Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional *in vitro* chromosomal aberration test[J]. Mutation Research, 1992, **272**(3): 223-236. DOI: 10.1016/0165-1161(92)91535-Y.
 - 14 Singh N P, Mccoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell[J]. Experimental Cell Research, 1988, **175**(1): 184-191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
 - 15 Maity A, Mckenna W G, Muschel R J. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review[J]. Radiotherapy Oncology, 1994, **31**(1): 1-13. DOI: 10.1016/0167-8140(94)90408-1.
 - 16 Fokas E, Kraft G, An H, *et al.* Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2009, **1796**(2): 216-229. DOI: 10.1016/j.bbcan.2009.07.005.
 - 17 Wang B F, Dai Z J, Wang X J, *et al.* Saikosaponin-d increases the radiosensitivity of smmc-7721 hepatocellular carcinoma cells by adjusting the G0/G1 and G2/M checkpoints of the cell cycle[J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013, **13**(1): 263. DOI: 10.1186/1472-6882-13-263.
 - 18 Ogura A, Oowada S, Kon Y, *et al.* Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells[J]. Cancer Letter. 2009, **277**(1): 64-71. DOI: 10.1016/j.canlet.2008.11.021.
 - 19 Jeggo P, Löbrich M. Radiation-induced DNA damage responses[J]. Radiation Protection Dosimetry, 2006, **122**(1-4): 124-127. DOI: 10.1093/rpd/ncl495.
 - 20 Kofuji K, Aoki K, Tsubaki K, *et al.* Antioxidant activity of β -glucan[J]. ISRN Pharmaceutics, 2012, **1258**: 64. DOI: 10.5402/2012/125864.
 - 21 Willment J A, Gordon S, Brown G D. Characterization of the human β -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2001, **267**(47): 43818-43823. DOI: 10.1074/jbc.M107715200.
 - 22 杨小舟, 曾富华, 饶力群. 模式识别受体 Dectin-1 与 β -葡聚糖的免疫识别作用[J]. 生命的化学, 2008, **28**(5): 556-559.
YANG Xiaozhou, ZENG Fuhua, RAO Liqun. The relationship between PRR (Dectin-1) and the immune recognition induced by β -glucan[J]. Chemistry of Life, 2008, **28**(5): 556-559.