

二氧化矽可抑制因輻射照射所降低之紅血球生成效應

林群智¹ 耿念慈² 洪茂欽² 李承龍³ 丁健益^{4,5} *劉威忠²

¹南華大學 自然生物科技系 自然醫學研究所

²慈濟技術學院 醫學影像暨放射科學系 農業生醫研究中心

³臺灣警察專科學校 刑事警察科

⁴陽明大學 生物醫學影像暨放射科學系

⁵樹人醫護管理專科學校 醫學影像暨放射技術系

摘要

含二氧化矽材質常應用於骨組織工程，骨髓常因而與之接觸。臨床上，輻射治療會抑制紅血球分化，而先前的研究發現二氧化矽顆粒可以刺激紅血球分化，但輻射照射時二氧化矽的生物效應則尚不清楚。本研究選取單核球與紅白血球細胞株(HEL-92 cell line)的共同培養系統，探討二氧化矽對紅血球生成之效應；實驗上，利用 MTT 法分析二氧化矽顆粒對單核球的細胞毒性，取安全劑量的二氧化矽顆粒探討紅血球生成的生物效應。實驗分成四組，包括對照組、輻射處理組、二氧化矽處理組或輻射合併二氧化矽處理組，再以流式細胞儀分析血型糖蛋白 A 的表現與細胞活性氧化物的生成。

在細胞培養的實驗中發現，輻射會抑制紅血球分化，在無毒性的濃度下，二氧化矽會增加紅血球分化。以流式細胞儀分析顯示輻射會抑制血型糖蛋白 A 的表現，而此生物效應會被二氧化矽顆粒所抑制。本研究結果顯示，二氧化矽顆粒可能是藉由增加細胞中血型糖蛋白 A 的表現提升輻射防護之作用。

關鍵字: 二氧化矽，血型糖蛋白 A，紅血球分化，輻射治療

前言

血源性幹細胞可分化成血液中的血球細胞，而基質幹細胞為貼附性幹細胞，外觀類似間葉細胞，故又稱為間葉幹細胞，該細胞常被應用於生醫再造工程，誘導分化成造骨細胞[1,2]，並提供血球分化及生長的微環境，此微環境的組成細胞主要是由基質細胞構成。基質細胞會分泌相關生長因子，以調節幹細胞的分化和生長。紅血球的分化受紅血球生成素(erythropoietin, EPO)[3,4] 等因子所調控，已分化之紅血球表面含有血型糖蛋白(glycophorin)抗原，故可以使用接上螢光分子之抗體加以辨識，常被應用於紅血球之生物醫學檢測[5]。

矽是構成生物體必須的礦物質之一，可維持與生成高等生物之結締組織，近來，各種含矽材料(如：Si 與 SiO₂)被廣泛應用於生物醫學上[7]，而多孔矽(porous silicon)具有生物穩定性(biostability)及無毒性等優點，被認為是絕佳之替代性生醫材料[8]，常被應用作為新生骨細胞及血管之成長材料，也被應用於重建缺損之骨骼或關節組織[9,10]。先前研究發現二氧化矽會促進紅血球分化[11]，然而，輻射會抑制幹細胞分化成紅血球，故放射治療過程可引起血球細胞損傷[6]，導致紅血球或白血球之數目減少，本實驗之目的即在探討輻射與二氧化矽對紅血球生成的相關生物效應並探討其可能的作用機制。

材料與方法

二氧化矽前處理

將二氧化矽顆粒(SiO_2 , Sigma)以磷酸鹽緩衝液(PBS)清洗 3 遍,再以 500 mL 去離子水清洗並過濾後,烘乾滅菌備用。

二氧化矽粒徑測量與螢光標示處理

將二氧化矽顆粒加入二次去離子水,利用超音波震盪打散顆粒,再以粒徑測量分析儀(Nano-ZS90, DKSH)測量粒徑二氧化矽顆粒粒徑分佈。

以矽烷偶合劑 3-胺丙基三乙氧基矽烷(3-Aminopropyltrimethoxysilane, APS)修飾二氧化矽顆粒,使 APS 接合於二氧化矽顆粒的表面,再加入 FITC (APS/FITC: 200:1),此時 APS 之 $-\text{NH}_2$ 會與螢光物質 FITC 接合,使二氧化矽顆粒連接螢光物質。將上述顆粒離心(3000 rpm, 10 mins),去除上清液,再加入去離子水,重複上述離心步驟 3 次,以去除未與二氧化矽顆粒接合之螢光物質。

細胞培養

將 THP-1 細胞(Human premonocyte)與 HEL-92 細胞(Human erythroleukaemic cell),培養於含 2 mM L-Glutamine 及 4.5 g/L D-Glucose 之 RPMI-1640 培養液中,置於 37°C 、5% CO_2 及 95%溼度的培養箱,每隔兩天更換一次培養液。

二氧化矽之細胞毒性測試

將 THP-1 細胞(1×10^4 cell/ cm^2),分別加入不同濃度之二氧化矽顆粒(0, 100, 300, 500, 700 或 1000 ppm),24 小時後,利用 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) assay 法,由 570 nm 處之吸光值,推測存活細胞的數目,藉以分析二氧化矽對單核球或基質細胞的細胞毒性。

單核球吞噬二氧化矽顆粒測試

將已標示 FITC 的二氧化矽顆粒(1 ppm)加入單核球,經 24 小時之培養後,收集細胞,以 PBS 清洗兩次,利用流式細胞儀(BD FACS calibur™, BD Biosciences,

CA, USA)偵測細胞吞噬標示 FITC 之二氧化矽顆粒的螢光強度。

細胞輻射照射處理

以 X 光機(Rad Source Technologies, RS2000, Rad Source Technologies, Inc., GA, USA; 150 kV, 25 mA)照射 THP-1 細胞,總輻射劑量為 5 Gy。

條件培養液之收集

將 THP-1 單核球細胞(細胞密度 1×10^4 cell/ cm^2),以輻射(5 Gy)照射處理、二氧化矽顆粒(200 ppm)處理或輻射(5 Gy)照射合併二氧化矽顆粒(200 ppm)處理。經 72 小時之培養後,收集條件培養液(condition medium, CM),經離心後,取上清液分裝於 1 mL 之微量離心管中,於 -80°C 下冷凍備用。

條件培養液之細胞毒性測試

將紅血球先驅細胞 HEL-92 (1×10^4 cell/ cm^2),分別加入上述收集之 CM (25% v/v),隔天,利用 MTT assay 法,量測 570 nm 處之吸光值,推測存活細胞的數目,藉以分析條件培養液對 HEL-92 細胞的細胞毒性。

條件培養液之細胞增生測試

將 HEL-92 細胞(1×10^4 cell/ cm^2),分別加入上述收集之 CM (25% v/v),第 3 天後,利用 MTT assay 法,量測 570 nm 處之吸光值,推測存活細胞的數目,藉以分析條件培養液對 HEL-92 細胞的細胞增生作用。

條件培養液對細胞內活性氧化物(ROS)生成的影響

將 HEL-92 細胞 (1×10^6 cell/ cm^2)加入 CM (25% v/v) 共同培養,三個小時後,抽取培養液至離心管(3000 rpm, 5 mins),去除上清液,保留離心管底部的細胞,以磷酸鹽緩衝溶液(PBS)沖洗三次,加入 $1 \mu\text{M}$ 之 DCFH-DA (2'-dichlorofluorescein Diacetate),然後靜置於 37°C 、5% CO_2 的培養箱 30 min,經離心(2500 rpm, 5 min)後,去除上清液,加入 1 mL PBS 於流式細胞儀專用之細胞過濾管過濾,並以流式細胞儀偵測螢光強度,藉以分析細胞之活性氧化物(reactive oxygen species, ROS)生成量。

利用流式細胞儀分析紅血球分化百分比

HEL-92 細胞($2 \times 10^6/\text{cm}^3$)，加入 CM (25% v/v) 培養 72 小時後，以 trypsin 處理細胞，經離心(1500 rpm)5 分鐘後收集細胞，以 PBS 清洗兩次，移除上清液，加入 500 μL 之 PBS 含有 5 μL Glycophorin A 抗體，於 37°C 避光搖晃 1 小時，再用 PBS 清洗兩次，以流式細胞儀(BD FACS calibur™, BD Biosciences, CA, USA)偵測細胞表面抗原之表現量。

統計方法

各項實驗所得數據以平均值 \pm 標準誤表示，並以 Student's t test 進行統計分析，若 $p < 0.05$ 即判定為具有統計上的差異。

結果

二氧化矽顆粒粒徑分佈

由粒徑分析儀測量之結果發現，二氧化矽顆粒粒徑分佈範圍在 80 到 700 nm，主要粒徑分佈波峰在 153.8 nm(圖 1)。

二氧化矽之細胞毒性測試

單核球 THP-1 細胞(細胞密度 $1 \times 10^4 \text{ cell}/\text{cm}^2$)加入二氧化矽顆粒培養 24 小時後，加入 MTT 可與活細胞線粒體中的呼吸鏈作用，生成紫色的 formazan 結晶，加入二甲基亞砷(dimethyl sulfoxide; DMSO)可使其溶解，且在波長 570 nm 處具有特定吸收峰；formazan 之生成量與活細胞數目成正比，故可由波長 570 nm 處的吸光值，推測活細胞之數目。

由實驗結果(圖 2)發現，二氧化矽在 500 ppm 以下，對單核球 THP-1 細胞沒有明顯的細胞毒性，當劑量超過 700 ppm 時，隨著二氧化矽劑量的增加，細胞的存活率愈低，即對細胞的毒性較顯著。

單核球 THP-1 細胞吞噬二氧化矽顆粒測試

將已標示 FITC 的二氧化矽顆粒(1 ppm)加入單核球 THP-1 細胞培養 24 小時後，由流式細胞儀偵測吞噬標示 FITC 的二氧化矽顆粒細胞之數目，結果顯示，二

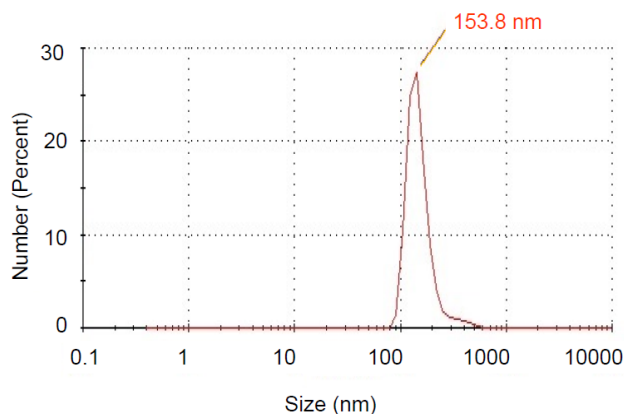


圖 1. 二氧化矽顆粒粒徑分佈。二氧化矽顆粒加入二次去離子水，利用超音波震盪將顆粒打散，再以粒徑測量分析儀測量粒徑。由結果發現，二氧化矽顆粒粒徑主要分佈範圍在 153.8 nm。

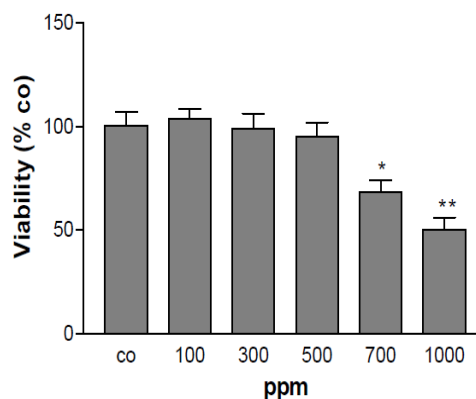


圖 2. 二氧化矽顆粒之細胞毒性測試。將單核球 THP-1 細胞，分別加入二氧化矽顆粒，24 小時後，利用 MTT assay 法，分析二氧化矽對單核球 THP-1 細胞的毒性作用。柱狀圖表示法為平均值 \pm 標準誤 (n=4)，*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

氧化矽顆粒確實有被細胞吞噬的現象(圖 3)。

條件培養液之細胞毒性測試

將紅血球先驅細胞 HEL-92，分別加入上述收集之條件培養液(25% v/v) 24 小時後，利用 MTT assay 法，分析條件培養液對 HEL-92 細胞的細胞毒性。由結果(圖 4)發現各組條件培養液，對 HEL-92 細胞沒有毒性作用，不影響細胞存活率，顯示相關生物效應，不是藉由對細胞產生傷害所引起。

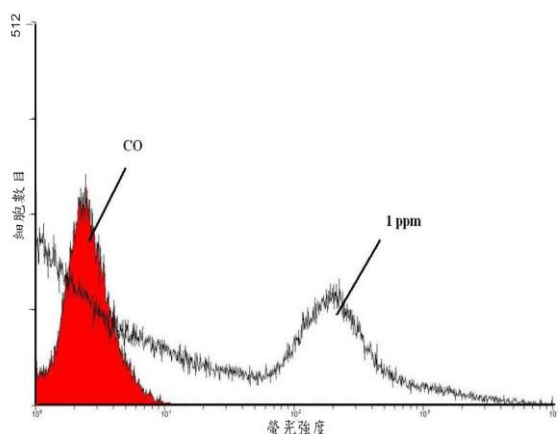


圖 3. 單核球 THP-1 細胞吞噬二氧化矽顆粒測試。將二氧化矽顆粒標示上 FITC，加入單核球 THP-1 細胞培養 24 小時後，利用流式細胞儀分析細胞的螢光強度。結果顯示，單核球細胞確實有將二氧化矽顆粒吞入細胞內的現象。CO: 為對照組即不加二氧化矽顆粒；1 ppm: 為加入 1 ppm 二氧化矽顆粒組。

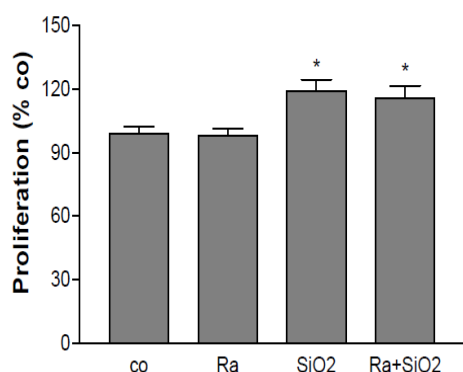


圖 5. 條件培養液之細胞增生測試。將 HEL-92 細胞 (1×10^6 cell/cm²) 加入不同處理方式之 CM (25% V/V) 培養 72 小時後，利用 MTT assay 法，分析條件培養液對 HEL-92 細胞的細胞增生作用。柱狀圖表示法為平均值±標準誤(n=4)，*: P < 0.05。

條件培養液之細胞增生測試

將紅血球先驅細胞 HEL-92 加入條件培養液(25% v/v)培養 72 小時後，結果發現，除了輻射照射處理組的條件培養液不會刺激細胞增生外，二氧化矽處理組或輻射合併二氧化矽處理組的條件培養液皆會刺激細胞增生(圖 5)，顯示二氧化矽具有誘發細胞增生之生物效應。

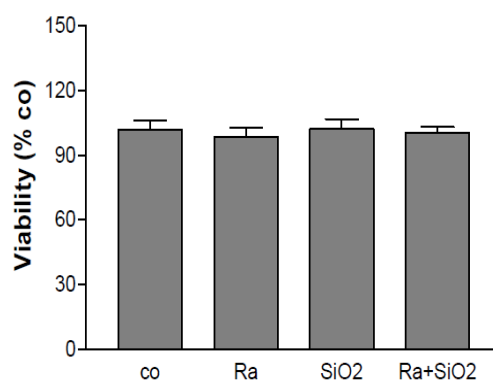


圖 4. 條件培養液之細胞毒性測試。將紅血球先驅細胞 HEL-92 加入不同處理方式之 CM (25% v/v) 24 小時後，利用 MTT assay 法，分析條件培養液對 HEL-92 細胞的細胞毒性作用。柱狀圖表示法為平均值±標準誤(n=4)。註: CM: 條件培養液，co: 對照組，Ra: 輻射照射組，SiO₂: 二氧化矽處理組，Ra+SiO₂: 輻射合併二氧化矽處理組

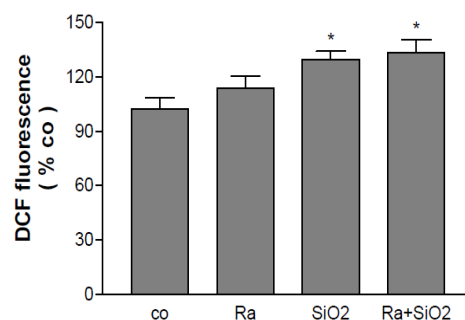


圖 6. 條件培養液對細胞內活性氧化物生成的影響。THP-1 細胞 (1×10^4 cell/mL)，經條件培養液培養，培養 3 小時後，加入 DCF-DA，利用 ELISA reader 讀取激發波 492 nm、發射波 520 nm，讀取螢光強度，分析活性氧化物(ROS)相對生成量。柱狀圖表示法為平均值±標準誤(n=4)，*: P < 0.05。

條件培養液對細胞內活性氧化物生成的影響

將紅血球先驅細胞 HEL-92 加入條件培養液(25% v/v)共同培養 3 個小時後，以流式細胞儀偵測細胞生成 ROS 之相對量，結果顯示，THP-1 單核球細胞單獨經二氧化矽處理($133.3 \pm 7.1\%$)或經輻射合併二氧化矽處理($129.5 \pm 4.6\%$)之條件培養液皆會誘發 HEL-92 細胞生成

ROS ($p<0.05$)，而僅經輻射照射處理組(113.5 ± 6.8)與對照組(102.3 ± 6.4)相較則無顯著差異($p<0.05$) (圖 6)。

利用流式細胞儀分析紅血球分化百分比

將紅血球前驅細胞 HEL-92 加入 CM (25% v/v) 培養 72 小時後，加入 Glycophorin A 抗體，觀察細胞表面 Glycophorin A 抗原之表現情形，結果發現，輻射照射處理組之細胞 Glycophorin A 的表現量(10%)低於對照組(20.67%)，但無顯著差異，而二氧化矽處理組之 Glycophorin A 抗原表現量(57.33%)顯著高於對照組 ($p<0.05$)，然而輻射合併二氧化矽處理後，其 Glycophorin A 抗原表現量(44%)降低，顯見二氧化矽促進紅血球分化之現象會被輻射照射所抑制(圖 7)。

討論

由實驗結果(圖 1)發現，本實驗二氧化矽顆粒之粒徑主要分佈範圍約在 150 nm 左右，但研究發現二氧化矽顆粒粒徑的差異會影響細胞發炎[12]與毒性[13,14]等生物效應。本研究所使用的二氧化矽顆粒，濃度在 500 ppm 以下時無明顯細胞毒性，濃度高於 700 ppm 以上時會對細胞產生毒性效應(圖 2)。含矽顆粒被吸入肺臟後，會被由血液單核球分化而來的巨噬細胞所吞噬，引起細胞毒性[15-17]。在 THP-1 單核球細胞吞噬二氧化矽顆粒之實驗中，發現 THP-1 單核球確實在培養 24 小時後將二氧化矽顆粒吞噬至細胞內(圖 3)，並可能產生一些細胞激素釋放至培養液中，該收集之培養液即為條件培養液(CM)；經細胞毒性測試，結果發現，各組不同處理方式的 CM 對紅血球前驅細胞 HEL-92 而言不會產生細胞毒性(圖 4)。雖然這些經二氧化矽顆粒處理後細胞所產生之 CM 已被發現含有許多與發炎與纖維化相關的因子[18,19]，可能與肺部纖維母細胞(Fibroblast)的增生有關，且由細胞增生試驗結果顯示，二氧化矽或輻射合併二氧化矽處理組的 CM 皆會誘發 HEL-92 細胞增生，然而單獨輻射處理組的 CM 卻沒有刺激該細胞增生的現象(圖 5)，因此，推測誘發增生的主要因子為二氧化矽顆粒。已知二氧化矽顆粒會刺激細胞分泌與細胞

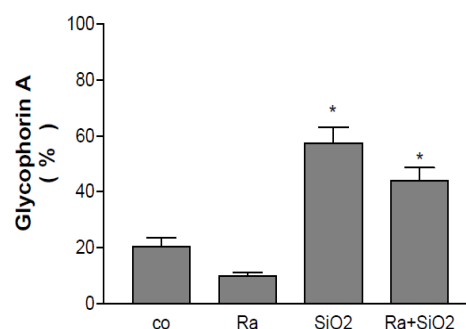


圖 7. 條件培養液對 HEL-92 細胞表面抗原 Glycophorin A 表現的影響。HEL-92 細胞($2\times10^6/\text{cm}^3$)，加入 CM (25% v/v)，72 小時後，加入 Glycophorin A 抗體，分析細胞表面抗原表現。柱狀圖表示法為平均值 \pm 標準誤($n=3$)，*: $P<0.05$ 。

增生有關的因子[例如:轉化生長因子- β (transforming growth factor-beta)[20,21]而存在 CM 中，這些因子可造成 HEL-92 細胞增生(8)。

THP-1 單核球 (1×10^4 cell/mL)經條件培養液培養 3 小時後，各實驗組的 ROS 相對生成量均增高，且二氧化矽處理與輻射合併二氧化矽處理組之增加量具顯著性 (圖 6)。由結果推論，THP-1 吞噬二氧化矽顆粒後，可分泌許多發炎因子，例如:介白質素-6 (interleukin 6; IL-6)[22]及腫瘤壞死因子(tumor necrosis factor; TNF)[23]等，而細胞內活性氧化物與發炎因子的生成有關，亦為細胞訊號的調控因子之一[24]，推測二氧化矽及輻射可能造成細胞氧化壓力(oxidative stress)提高而起動發炎因子的釋放[25]，而發炎因子又可進而影響細胞內 ROS 生成量的變化，且二氧化矽之影響大於輻射照射處理。ROS 之產生被認為與紅血球生成過程中因應人體傳送氧氣時之氧化壓力有關[26]，而 ROS 被發現可刺激 erythropoietin (EPO)誘發之紅血球分化[27]，由本研究 HEL-92 細胞之 Glycophorin A (紅血球特有的細胞表面標誌)[28]表現分析得知，經輻射照射之 CM 會抑制紅血球的分化，而經二氧化矽處理之 CM 可促進紅血球分化，輻射合併二氧化矽處理後則稍微抑制其分化，可見二氧化矽是導致紅血球分化之主要因素，而此現象可能由於單核球吞噬二氧化矽後產生 ROS，進而

刺激 EPO 產生，並促進紅血球之分化所致。

結論

二氧化矽顆粒可抑制因輻射照射所引起之紅血球再生不良效應，此機制可能透過刺激細胞增生因子的分泌，以及被單核球吞噬後釋放分泌發炎因子，導致 ROS 的產生，進而促進紅血球之分化，致使因輻射照射所造成紅血球降低之現象被抑制。本研究有助於了解使用二氧化矽生醫材料者進行輻射治療時對紅血球分化及增生之影響。有關 CM 所引發紅血球分化之相關因子則須進一步分析及確認，以利於生醫工程的應用。

致謝

感謝慈濟技術學院由研究計畫 TCCT-992A09 提供本研究經費。

參考文獻

1. Lim TY, Wang W, Shi Z, Poh CK, Neoh KG. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation on titanium with surface-grafted chitosan and immobilized bone morphogenetic protein-2. *J Mater Sci Mater Med* 2009;20(1):1-10.
2. Hildebrandt C, Buth H, Thielecke H. Influence of cell culture media conditions on the osteogenic differentiation of cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Ann Anat* 2009;191(1):23-32.
3. Kim WS, Zhu Y, Deng Q, Chin CJ, He CB, Grieco AJ, et al. Erythropoiesis from human embryonic stem cells through erythropoietin-independent AKT signaling. *Stem Cells* 2014;32(6):1503-14.
4. Zochodne B, Truong AH, Stetler K, Higgins RR, Howard J, Dumont D, et al. Epo regulates erythroid proliferation and differentiation through distinct signaling pathways: implication for erythropoiesis and Friend virus-induced erythroleukemia. *Oncogene* 2000;19(19):2296-304.
5. Aoki T, Chimura K, Nakao N, Mizuno Y. Isolation and characterization of glycophorin from carp red blood cell membranes. *Membranes (Basel)* 2014;4(3):491-508.
6. Blinova EA, Veremeyeva GA, Akleyev AV. Apoptosis of peripheral blood lymphocytes and mutations in the gene of the T-cell receptor in survivors of chronic radiation exposure. *Health Phys* 2012;103(1):58-60.
7. Wang G, He X, Chen L, Zhu Y, Zhang X. Ultrasensitive IL-6 electrochemical immunosensor based on Au nanoparticles-graphene-silica biointerface. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;116:714-9.
8. Masuda H, Ushiyama A, Takahashi M, Wang J, Fujiwara O, Hikage T, et al. Effects of 915 MHz electromagnetic-field radiation in TEM cell on the blood-brain barrier and neurons in the rat brain. *Radiat Res* 2009;172(1):66-73.
9. Feng J, Yan W, Gou Z, Weng W, Yang D. Stimulating effect of silica-containing nanospheres on proliferation of osteoblast-like cells. *J Mater Sci Mater Med* 2007;18(11):2167-72.
10. Korventausta J, Jokinen M, Rosling A, Peltola T, Yli-Urpo A. Calcium phosphate formation and ion dissolution rates in silica gel-PDLLA composites. *Biomaterials* 2003;24(28):5173-82.
11. Liu WC, Tsai CS, Chen YY, Keng NT. Erythropoietin gene expression in the stromal cell increased by silica to induce erythrocyte differentiation. *Adv Mater Res* 2013; 647: 494-8.
12. Brown DM, Kanase N, Gaiser B, Johnston H, Stone V. Inflammation and gene expression in the rat lung after instillation of silica nanoparticles: effect of size, dispersion medium and particle surface charge. *Toxicol Lett* 2014;224(1):147-56.
13. Kaewamatawong T, Kawamura N, Okajima M, Sawada M, Morita T, Shimada A. Acute pulmonary toxicity caused by exposure to colloidal silica: particle size dependent pathological changes in mice.

- Toxicol Pathol 2005;33(7):743-9.
14. Panas A, Comouth A, Saathoff H, Leisner T, Al-Rawi M, Simon M, et al. Silica nanoparticles are less toxic to human lung cells when deposited at the air-liquid interface compared to conventional submerged exposure. *Beilstein J Nanotechnol* 2014;5:1590-602.
15. Brown DM, Johnston H, Gubbins E, Stone V. Serum enhanced cytokine responses of macrophages to silica and iron oxide particles and nanomaterials: a comparison of serum to lung lining fluid and albumin dispersions. *J Appl Toxicol* 2014;34(11):1177-87.
16. Qu Y, Tang Y, Cao D, Wu F, Liu J, Lu G, et al. Genetic polymorphisms in alveolar macrophage response-related genes, and risk of silicosis and pulmonary tuberculosis in Chinese iron miners. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210(6):679-89.
17. Misson P, van den Brule S, Barbarin V, Lison D, Huaux F. Markers of macrophage differentiation in experimental silicosis. *J Leukoc Biol* 2004;76(5):926-32.
18. Kuhlmann UC, Chwieralski CE, van den Brule S, Rocken C, Reinhold D, Welte T, et al. Modulation of cytokine production and silica-induced lung fibrosis by inhibitors of aminopeptidase N and of dipeptidyl peptidase-IV-related proteases. *Life Sci* 2009;84(1-2):1-11.
19. Zhang J, Postovit LM, Wang D, Gardiner RB, Harris R, Abdul M, et al. In situ loading of basic fibroblast growth factor within porous silica nanoparticles for a prolonged release. *Nanoscale Res Lett* 2009;4(11):1297-302.
20. Zhang G, Yang Z, Lu W, Zhang R, Huang Q, Tian M, et al. Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. *Biomaterials* 2009;30(10):1928-36.
21. van den Brule S, Misson P, Buhling F, Lison D, Huaux F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF-beta. *Respir Res* 2005;6:84.
22. Tripathi SS, Mishra V, Shukla M, Verma M, Chaudhury BP, Kumar P, et al. IL-6 receptor-mediated lung Th2 cytokine networking in silica-induced pulmonary fibrosis. *Arch Toxicol* 2010;84(12):947-55.
23. Li X, Hu Y, Jin Z, Jiang H, Wen J. Silica-induced TNF-alpha and TGF-beta1 expression in RAW264.7 cells are dependent on Src-ERK/AP-1 pathways. *Toxicol Mech Methods* 2009;19(1):51-8.
24. Brown DM, Donaldson K, Borm PJ, Schins RP, Dehnhardt M, Gilmour P, et al. Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286(2):L344-53.
25. Park EJ, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro. *Toxicol Lett* 2009;184(1):18-25.
26. Ge TF, The role of reactive oxygen species during erythropoiesis: An In Vitro Model Using TF-1 Cells. Master Thesis of Chinese University of Hong Kong, 2009.
27. Nagata M, Arimitsu N, Ito T, Sekimizu K. Antioxidant N-acetyl-L-cysteine inhibits erythropoietin-induced differentiation of erythroid progenitors derived from mouse fetal liver. *Cell Biol Int* 2007;31(3):252-256.
28. Gonzalez A, Friend M, Moreno A, Pintado CO, Vogeli P, Llanes D. A monoclonal antibody to swine erythrocytes recognizes the B blood group on the major glycophorin. *Anim Genet* 1995;26(5):351-3.

The Radiation Dose Measurement and Health Effect Silica Can Inhibit the Decrease of Erythrogenesis Caused by Radiation

Chun-Chih Lin¹ Nien-Tzu Keng² Mao-Chin Hung²
Cheng-Lung Lee³ Chien-Yi Ting^{4,5} *Wei-Chung Liu²

¹ Department of Natural Biotechnology Institute of Natural Healing Sciences, Nanhua University

² Department of Medical Imaging and Radiological Sciences Research Center for Agricultural Biomedicine,
Tzu Chi College of Technology

³ Department of Criminal Investigation, Taiwan Police College

⁴ Department of Biomedical Imaging and Radiological Sciences, National Yang Ming University

⁵ Department of Medical Imaging and Radiology, Shu-Zen Junior College of Medicine and Management

Abstract

Silica containing materials are commonly applied in bone tissue engineering and thereby bone marrow cells may contact with silica. Clinically, radiotherapy has been found able to inhibit erythrogenesis. In previous study, we found that silica particles can stimulate bone marrow to differentiate into erythrocytes; however, the biological effect of silicate remains unclear while ionizing radiation is applied. In this study, monocytes and erythroleukaemic cell line (HEL-92 cell line) were cocultured to evaluate the effect of silica particles on erythrogenesis. The toxicity of silica particles on monocytes was evaluated by MTT assay. Safe dose of silica particles were added into the culture medium to investigate the erythrogenesis. Four groups including the control, radiation treatment (5 Gy), silica treatment and a combinative treatment of radiation and silica were divided in the experiment. Analysis of the expression of glycophorin-A and the production of reactive oxygen species (ROS) were then carried out. In cells culture, the results indicated that radiation can inhibit the differentiation of erythrocytes, and the differentiation of erythrocytes was increased with the non-toxic concentration of silica particles. In flow cytometry assay, the glycophorin-A expression and the production of ROS were inhibited by radiation, whereas the effects were inhibited by the conditioned medium pretreated with silica. The results conclude that silica particles exert a radioprotective effect, which is probably via increasing the level of glycophorin-A expression within cells.

Keywords: Silica particle, Glycophorin-A, Erythrocyte Differentiation, Radiotherapy