

文章编号: 1000-324X(2006)06-1467-05

纳米 TiO₂ 光诱导杀伤 Bel-7402 人体肝癌细胞研究

夏春辉¹, 王百齐², 王 玉^{1,3}, 刘亚琴¹, 徐广有¹, 吴 山¹

(1. 齐齐哈尔医学院化学教研室, 齐齐哈尔 161042; 2. 哈尔滨工业大学应用化学系, 哈尔滨 150001; 3. 中国医科大学生物化学教研室, 沈阳 110001)

摘 要: 在光诱导条件下, 采用 HE 染色法和四甲基偶氮唑蓝比色法 (MTT 法), 研究了纳米 TiO₂ 对 Bel-7402 人体肝癌细胞的杀伤作用, 考察了在不同纳米 TiO₂ 浓度、不同光照时间下纳米 TiO₂ 的抑瘤效果, 并且对抑瘤机制进行了探讨。结果发现: 在光诱导条件下, 适宜的 TiO₂ 浓度具有较高的抑瘤率, 同时抑瘤过程表现出类似一级反应的动力学规律; 在光诱导条件下, 纳米 TiO₂ 产生的活性氧组分与癌细胞膜内外的生物大分子反应, 引起广泛的细胞结构破坏; 造成癌细胞内 Ca²⁺ 离子稳态失去平衡; 引发细胞微管相关蛋白 2(MAP-2) 表达的变化, 促进微管发生重组, 从而导致细胞凋亡和坏死。

关 键 词: 纳米 TiO₂; 光诱导杀伤; 肝癌细胞; MAP-2

中图分类号: O643; R735 **文献标识码:** A

1 引言

恶性肿瘤是一种严重威胁人类健康的常见病, 在许多国家它是引起死亡的第二位原因, 因此研制高效、低毒的抗癌药物已成为国内外医学研究的前沿领域。纳米 TiO₂ 在紫外光 ($h\nu \geq 3.2\text{eV}$, $\lambda < 390\text{nm}$) 照射下, 价带上的电子被激发跃迁至导带^[1], 产生的活性氧等组分能对癌细胞内外的有机物质产生强氧化作用, 从而有效地杀伤癌细胞^[2]。此外, 纳米 TiO₂ 本身毒副作用小^[3], 能被正常组织内血管周围的巨噬细胞所吞噬, 不会引起白细胞减少等毒副作用^[4], 因而它可能成为最合适抗肿瘤光敏药剂之一。对纳米 TiO₂ 抗癌作用的研究国外刚刚起步不久^[5,6], 国内此方面的研究还鲜见报道。本文研究了在光诱导下, 纳米 TiO₂ 对人体肝癌 Bel-7402 细胞杀伤效应, 重点考察了不同条件下纳米 TiO₂ 的抗肿瘤效果, 探讨了纳米 TiO₂ 对肿瘤细胞的作用机制。

2 材料和方法

2.1 材料与试剂

MTT 为 Sigma 公司产品; RPMI-1640 培养液为 Gibco 公司产品; 牛血清为 PAA 公司产品; 胰蛋白酶为 Sigma 公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

2.2 仪器及设备

收稿日期: 2005-12-19, 收到修改稿日期: 2006-03-16

基金项目: 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划 (1055G066, 1054G070); 黑龙江省青年科学技术专项资金 (QC05C18); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (10511129); 齐齐哈尔医学院科学技术计划项目 (xp20044417)

作者简介: 夏春辉 (1969-), 男, 硕士, 副教授。 E-mail: chunhuixia1969@sohu.com

SB-100P 黑光灯 (美国 Spectronics 公司); UV-2550 紫外分光光度计 (日本岛津); XDS-1B 倒置显微镜 (重庆光电仪器有限公司); 洁净操作台 (苏净集团安泰公司)、AH-2 显微镜 (日本 Olympus)、二氧化碳孵箱 (日本三洋公司)。

2.3 纳米 TiO_2 的制备

将 20mL 异丙醇与 10mL 钛酸异丙酯的均匀混合液缓慢地滴加到溶有 10mL 水、2mL 硝酸和 40mL 异丙醇中。滴加结束后继续搅拌 2h, 然后转移至高压釜中 200 °C 保温 10h, 得到纳米 TiO_2 , 用蒸馏水洗涤 3 次即得到纳米 TiO_2 。利用 XRD 和 TEM 检测证实所得到的粒子为锐钛矿相、粒径约为 8nm 左右^[7]。将纳米 TiO_2 用水调制成各种浓度的溶胶液。为了不损害细胞生长的正常环境, 用 1mol/L NaOH 将纳米 TiO_2 溶胶液 pH 值调至 7.0 左右, 然后在 120°C 下高压灭菌 20min, 冷却至室温备用。

2.4 细胞培养

细胞系 Bel-7402 人肝癌细胞, 哈尔滨医科大学肿瘤研究所提供。细胞在 37°C, 含 5% CO_2 的培养箱内, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 培养基中分别加入终浓度为 100mg/L 的链霉素与青霉素, 细胞贴壁生长 24h。

2.5 纳米 TiO_2 的光诱导杀伤 Bel-7402 细胞

取对数生长期细胞, 胰蛋白酶消化后, 轻轻吹打制成单细胞悬液, 用血球计数板计数, 调整浓度约为 4×10^4 个 /mL。取 2mL 细胞悬液分别接种于 6 孔培养板中, 培养 24h 后, 弃掉原培养液, 在每孔中分别加含不同浓度的纳米 TiO_2 新培养液, 孵育 1h。然后在 37 °C 左右, 调整照射距离为 38cm (照射强度为 $4.0\text{mW}/\text{cm}^2$), 用 SB-100P 黑光灯 (主波长 365nm) 照射不同时间。

2.6 细胞形态观察 — HE 染色

将 2mL (浓度约为 4×10^4 个 /mL) 细胞悬液, 加至放有盖玻片的六孔培养板中, 培养 24h, 弃掉原培养液, 加入浓度约为 $300\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 TiO_2 新培养液, 光照 40min 后, 37°C 下置培养箱中孵育 1h, 取出盖玻片经 PBS 轻轻漂洗后, 用 10% 中性甲醛常温下固定 15min, 最后用 PBS 彻底清洗。待盖玻片自然干燥后进行 HE 染色: 苏木精染色, 盐酸乙醇分化, 自来水中返蓝, 伊红染色, 酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。在 AH-2 显微镜 (日本 Olympus) 下观察 HE 染片。

2.7 MTT 染色法测定纳米 TiO_2 的光诱导作用对 Bel-7402 细胞抑制率

纳米 TiO_2 的光诱导作用对 Bel-7402 细胞抑制率采用 MTT 染色法测定^[8]。基本原理为: 活细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶能将淡黄色的 MTT 还原为蓝紫色的 formazan 结晶, formazan 的产量与活细胞数成正比例关系。在波长 570nm 处测定光吸收值 A, 根据公式: 细胞抑制率 (IR) = $(1 - \text{实验孔 } A \text{ 值} / \text{对照孔 } A \text{ 值}) \times 100\%$ 进行计算。当 $IR < 30\%$ 为不敏感, $30\% \leq IR \leq 50\%$ 为低度敏感, $50\% \leq IR \leq 70\%$ 为中度敏感, $IR > 70\%$ 为高度敏感。

在倒置显微镜下观察 Bel-7402 细胞还原 MTT 染色生成的蓝紫色结晶、未经纳米 TiO_2 的光诱导作用及经纳米 TiO_2 的光诱导杀伤的细胞形态。

3 结果和讨论

3.1 癌细胞经纳米 TiO_2 光诱导杀伤前后 HE 染色观察

正常 Bel-7402 细胞形态规整, 呈多边形生长, 可见细胞有伪足, 核染成均一浅兰紫色, 核仁清晰可见 (图 1(a)). 而经过纳米 TiO_2 光诱导杀伤作用后, 细胞的形态发生了变化, 部分细胞的细胞质受到损伤, 细胞核固缩, 核染色质边集浓缩, 呈现细胞凋亡特征; 部分细胞发生自溶现象、细胞膜的连续性破坏, 呈均质红染无结构物质, 呈现细胞坏死特征 (图 1(b)、1(c)). 由此可见, 纳米 TiO_2 光诱导杀伤效应表现为细胞坏死和细胞凋亡两种形式. 细胞坏死和细胞凋亡在纳米 TiO_2 光诱导杀伤 Bel-7402 细胞中共同起作用.

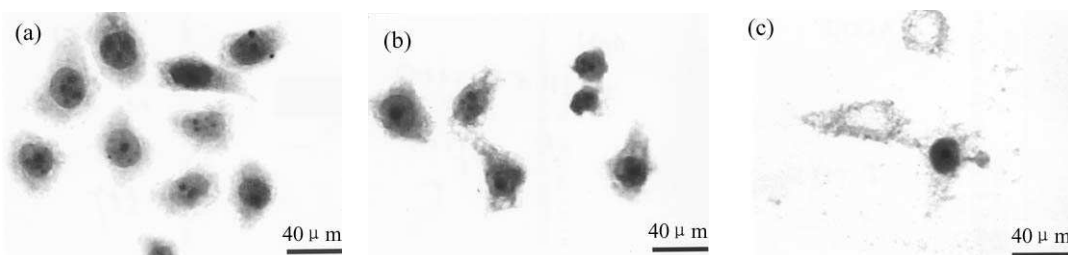


图 1 癌细胞经纳米 TiO_2 诱导杀伤处理前 (a)、后 (b) 与 (c) 的 HE 染色变化

Fig. 1 Differences of HE dye of cancer cells before (a) and after (b,c) photoinduced-damage by nanosized TiO_2 treatment

3.2 癌细胞经纳米 TiO_2 光诱导杀伤前后形态学变化

正常 Bel-7402 细胞呈多边形、梭形, 细胞轮廓较为清晰, 呈贴壁式生长 (图 2(a)). Bel-7402 癌细胞经过纳米 TiO_2 光诱导作用后, 存活细胞还原 MTT 在细胞内及细胞周围生成紫蓝色 Formazan 结晶 (图 3), 而部分细胞失去贴壁性, 形态完整性遭到破坏, 失去还原 MTT 生成 Formazan 紫蓝色结晶的代谢活性, 细胞处于凋亡和坏死状态 (图 2(b)), 这与 He 染色观察所得到的结论是相一致的.

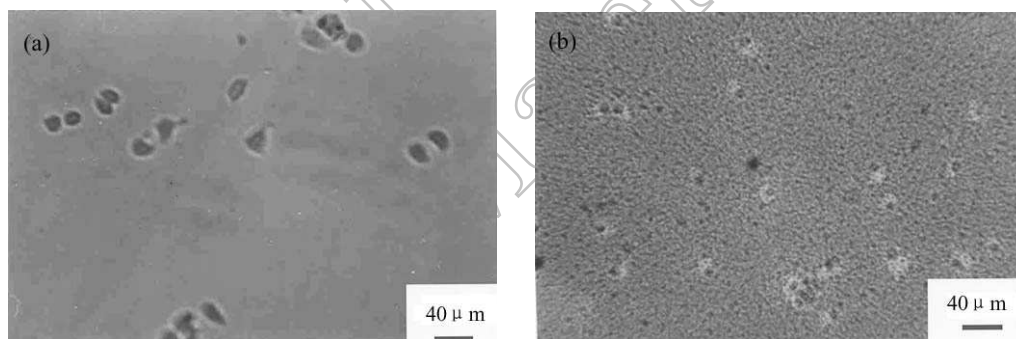


图 2 癌细胞经纳米 TiO_2 诱导杀伤处理前 (a)、后 (b) 的形态学变化

Fig. 2 Morphological changes of cancer cells before (a) and after (b) photoinduced-damage by nanosized TiO_2 treatment

3.3 纳米 TiO_2 对肿瘤细胞的光诱导杀伤作用

图 4 为抑瘤率与 TiO_2 含量及与光照时间的关系曲线. 从图中可看出, 随着光照时间的延长, 抑瘤率在逐渐上升. 但抑瘤率在开始的 10min 内上升较快, 而后随着时间的延长逐渐减慢, 表现出类似于一级反应的动力学规律^[9,10]. 在未加纳米 TiO_2 微粒而只用紫外光照射

的实验中, 在光照 40min 后, 仅有 10% 左右的 Bel-7402 细胞被杀死. 而在有光照的条件下, 纳米 TiO_2 立即表现出对肝癌细胞极强的杀伤能力. 随着纳米 TiO_2 浓度的升高, 抑瘤率先升高后降低, 在 $300\mu\text{g/mL}$ 时达到最大值. 而后随着纳米 TiO_2 浓度的继续升高, 抑瘤率反而有所下降. 这说明开始时随着浓度的升高, 纳米 TiO_2 在癌细胞表面的吸附逐渐增大, 在光诱导下, 表现出对 Bel-7402 细胞抑制作用的增强. 但当 TiO_2 浓度继续增大, 抑瘤率达到最大值后反而下降, 这主要是由于当纳米 TiO_2 在癌细胞表面的吸附达到最大值后, 继续提高纳米 TiO_2 浓度反而影响了照射到吸附在癌细胞表面 TiO_2 上的有效光子数, 从而降低了纳米 TiO_2 光诱导的抑瘤作用.

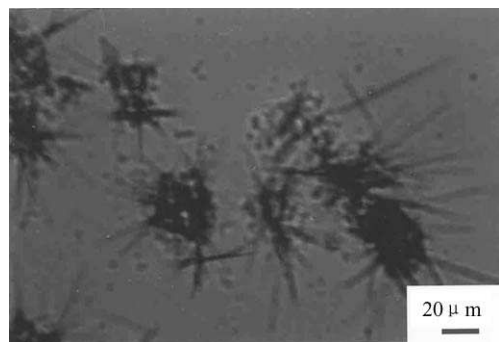


图 3 癌细胞还原 MTT 生成 Formazan 紫蓝色结晶

Fig. 3 Violet-blue Formazan crystalline after cancer cell reducing MTT

一般认为, 纳米 TiO_2 的等电点在 6.0 左右^[11,12], 因此在 pH 值为 7.0 时, TiO_2 表面应该带负电荷. 而肝癌细胞在 pH 值 7.0 附近, 其表面应带正电荷^[13]. 这样, 由于静电相互作用使得二者非常容易结合, 也就是说在 pH 为 7 左右时, 纳米 TiO_2 易于吸附至肝癌细胞的细胞膜上. 当纳米 TiO_2 受到大于其带隙能的光子激发时, 其价带上的电子跃迁进入导带, 形成光生电子空穴对. 光生电子能够与水及 O_2 作用, 经一系列的变化最终生成 $\cdot\text{OH}$ ^[14]. $\cdot\text{OH}$ 在生物化学反应中是强的活性组分, 它能够与癌细胞膜内外的生物大分子 (如脂类、蛋白质与核酸等)、以及细胞分泌出其代谢所必需的酶发生化学反应^[15], 破坏它们正常的生理代谢, 直接损害或通过一系列过氧化链式反应而引起广泛细胞结构破坏, 从而促使肝癌细胞凋亡和坏死. 而光生空穴本身就是一种极强氧化性物种^[16], 它会无选择性氧化攻击与其接触地癌细胞上的任何有机物质, 直接导致肝癌细胞的凋亡和坏死. 在光生电子与空穴抑制肝癌细胞作用中, 均属活性氧组分, 它们破坏细胞膜中的脂类物质, 能够引起细胞内钙稳态失去平衡, 导致依赖于 Ca^{2+} 离子浓度的核酸内切酶的活化, 也能够导致癌细胞凋亡与坏死^[17].

另外, 在光诱导作用下, 纳米 TiO_2 还能引起在 Bel-7402 人肝癌细胞中具有调节微管蛋白组装及动力学作用的 MAP-2 表达的变化, 促进微管发生重组, 从而抑制细胞的正常分裂, 导致癌细胞的凋亡和坏死. 在实验过程中, 本课题组已经证实这一过程的存在.

4 结论

1. 在光诱导下, 适宜的纳米 TiO_2 浓度对 Bel-7402 细胞表现出较高的抑制效应, 同时抑制过程表现出类似一级反应的动力学规律.
2. 在光诱导下, 纳米 TiO_2 产生的活性氧组分与细胞膜内外的生物大分子 (如脂类、蛋

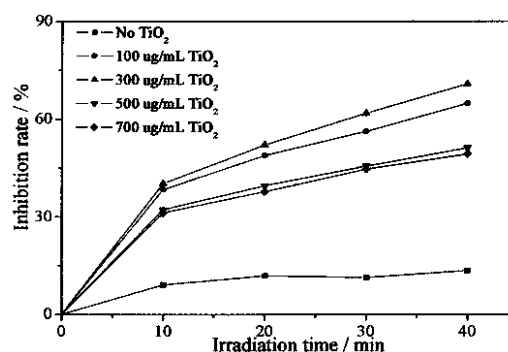


图 4 抑瘤率与 TiO_2 含量和光照时间的关系

Fig. 4 Relationship between inhibition ratio of cancer cell and TiO_2 content, irradiation time

白质、酶类与核酸等) 反应, 直接损害或通过一系列过氧化链式反应而引起广泛的细胞结构破坏, 从而导致细胞调亡或死亡.

3. 纳米 TiO_2 在光诱导作用下, 能够造成癌细胞内 Ca^{2+} 离子稳态失去平衡, 引发 MAP-2 表达的变化, 促进微管发生重组, 从而导致癌细胞调亡和坏死.

参考文献

- [1] 赵秀峰, 孟宪锋, 张志红, 等 (Zhao Xiu-Feng, *et al.*). 无机材料学报 (Journal of Inorganic Materials), 2004, **19** (1): 140–146.
- [2] Xu Min-Hua, Huang Ning-Ping, Xiao Zhong-Dang, *et al.* *Supramolecular Science*, 1998, **5-6** (5): 449–451.
- [3] Cai R, Kubota Y, Shuin T, *et al.* *Cancer Res*, 1992, **52** (8): 2346–2348.
- [4] Kubota Y, Shuin T, Kawasaki C, *et al.* *Br J Cancer*, 1994, **70** (6): 1107–1111.
- [5] Fujishima A, Rao T N, Tryk D A. *J Photochem Photobiol C*, 2000, **1** (1): 1–21.
- [6] Kozikowski A P, Tuckmantel W, Bottcher G, *et al.* *J Org Chem*, 2003, **68** (5): 1641–1658.
- [7] Wang Bai-qi, Jing Li-qiang, Qu Yi-chun, *et al.* *Appl Surf Sci*, 2006, **252**: 2817–2825.
- [8] Mosmann T J. *Immunol Methods*, 1983, **65** (1): 55–63.
- [9] Ho W, Yu J C, Yu J G. *Langmuir*, 2005, **21** (8): 3486–3492.
- [10] Tao X, Ma W, Zhang T, *et al.* *Angew Chem Int Ed*, 2001, **40** (16): 3014–3016.
- [11] Lea J, Adesina A A. *J Photochem Photobiol A Chem*, 1998, **118**: 111–122.
- [12] Jing C, Meng X, Liu S, *et al.* *J Colloid Interface Sci*, 2005, **290**: 14–21.
- [13] Tan PH, Chu V, Stray J E, *et al.* *Immunotechnology*, 1998, **4** (2): 107–114.
- [14] Linseblgler A L, Lu G, Jr J T Y. *Chem Rev*, 1995, **95** (3): 735–758.
- [15] Maness P C, Smolinski S, Blake D M, *et al.* *Appl Envir Microbiol*, 1999, **65** (9): 4094–4098.
- [16] Hoffmann M R, Martin S T, Choi W, *et al.* *Chem Rev*, 1995, **95** (1): 69–96.
- [17] 汪 冰, 丰伟悦, 赵宇亮, 等. 中国科学 B, 2005, **35** (1): 1–10.

Damaging Effects of Nanosized TiO_2 on Bel-7402 Human Liver Cancer Cell Under Photoinduce

XIA Chun-Hui¹, WANG Bai-Qi², WANG Yu^{1,3}, LIU Ya-Qin¹, XU Guang-You¹, WU Shan¹

(1. Chemistry Department, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161042, China; 2. Department of Applied Chemistry, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China; 3. Department of Biological Chemistry, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: The damaging effects of nanosized TiO_2 on human Bel-7402 liver cancer cell were investigated by means of HE dye method and MTT colorimetric assay under condition of photoinduce. The influences of nanosized TiO_2 content, and irradiation time on cancer inhibition were systematically studied, and the inhibition mechanism was primarily discussed. The results show that nanosized TiO_2 exhibits good inhibition effects under appropriate TiO_2 concentration, and the inhibition process obeys first order reaction rule approximately; In addition, activity oxygen produced by nanosized TiO_2 under illumination can react with organic molecules in and out the cancer cell membrane, so that lead to damage cell structure, result into imbalance of Ca^{2+} in the cancer cell, and induce microtubule reassembly due to expression changes of microtubule-associated protein-2, which are responsible for the apoptotic and dead cancer cells.

Key words nanosized TiO_2 ; photoinduced-damage; liver cancer cell; MAP-2