

纳米 TiO₂ 光催化氧化对胃癌细胞周期的影响

文雯^a 高晓亚^a 张爱平^{a*} 宋志英^a 孙彦平^b

(^a山西医科大学药学院 太原 030001; ^b太原理工大学洁净化工研究所 太原 030024)

摘要 以胃癌细胞系 BGC-823 为研究对象,采用倒置相差显微镜观察纳米 TiO₂ 光催化氧化前后 BGC-823 细胞形态的变化,通过流式细胞仪考察其对 BGC-823 细胞凋亡率及细胞周期的影响。结果表明,纳米 TiO₂ 光催化氧化使 BGC-823 细胞呈受激坏死或凋亡晚期继发性坏死状态;导致 BGC-823 细胞周期阻滞于 G₂/M 期并诱导细胞凋亡,从而抑制其 DNA 合成及增殖分化进程。当 TiO₂ 比负载量为 9.8×10^{-7} g/cm²、光照时间为 40 min 时, G₂/M 期阻滞较为显著,细胞凋亡率达 24.34%。

关键词 光催化氧化, 纳米 TiO₂, 胃癌细胞 BGC-823, 细胞周期, 细胞凋亡

中图分类号: O643; R735.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2012)06-0663-05

DOI: 10.3724/SP.J.1095.2012.00324

TiO₂ 光催化氧化杀伤癌细胞是一种探索中的治疗癌症的新方法^[1],其基本原理是紫外光可激发 TiO₂ 产生光生空穴-电子对,它们与水 and 溶解氧作用形成的活性氧类物质可直接或通过一系列过氧化链式反应与生物大分子反应,破坏其生物结构,从而杀伤癌细胞^[2-3]。

近年来国内外学者对纳米 TiO₂ 光催化氧化杀伤癌细胞的效应进行了一些有意义的探索^[4-6],发现其可以不同程度地杀伤多种癌细胞。目前,有关纳米 TiO₂ 杀伤癌细胞的机制主要集中在对 DNA、RNA 损伤及膜脂质过氧化程度的研究上^[7-10],结果表明,纳米 TiO₂ 光催化氧化产生的活性氧类物质可增加细胞膜的通透性,导致细胞内容物渗漏,并使 TiO₂ 更易进入被损细胞直接攻击其细胞核及其它细胞器,引发 DNA 结构和细胞脂质过氧化损伤、Ca²⁺ 稳态失衡及微管重组障碍等,最终导致细胞坏死或凋亡。但是,纳米 TiO₂ 光催化氧化对相关调控基因和蛋白的影响及其杀伤癌细胞的作用靶点等问题尚不明确。

本课题组前期对纳米 TiO₂ 杀伤胃癌 BGC-823 细胞进行了一系列研究^[11-13],发现纳米 TiO₂ 对 BGC-823 细胞几乎没有毒性,单纯紫外光照对其有微弱的杀伤作用,而紫外光激发纳米 TiO₂ 对 BGC-823 细胞杀伤效果明显。为进一步探讨 TiO₂ 杀伤癌细胞的机理,本文采用流式细胞仪检测纳米 TiO₂ 光催化氧化对 BGC-823 细胞生长周期的影响,为探究纳米 TiO₂ 对调控 BGC-823 细胞周期的上游基因及相关蛋白表达的影响奠定基础,以期从基因水平明确 TiO₂ 杀伤癌细胞的作用靶点。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 BD 公司);二氧化碳培养箱(美国 Asheville NC 公司);GB-II 型超净工作台(北京新技术应用研究所);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);Rigaku, D/max-2500 型 X 射线衍射仪(日本理学公司);JSM-35C 型扫描电子显微镜(日本电子公司);GGZ-300W 型高压汞灯(上海亚明灯泡厂);VLX-3W 型光强测定仪(美国 SP 公司)。

二氧化钛粉末(德国 Degussa 公司,分析纯,锐钛型);RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司);胰蛋白酶(Difco 分装);小牛血清、碘化丙啶(美国 Sigma 公司)。

2011-07-22 收稿,2011-09-25 修回

山西省自然科学基金(2010011048-1)、山西医科大学科技创新基金(01200806)资助项目

通讯联系人:张爱平,教授;Tel:0351-4690071;Fax:0351-4690114;E-mail:zhangap1@163.com;研究方向:纳米二氧化钛的生物效应

1.2 TiO₂薄膜的制备与表征

采用涂覆法制备纳米 TiO₂ 薄膜,通过 X 射线衍射仪和扫描电子显微镜对 TiO₂ 的晶相结构、晶体形貌进行了分析表征^[12],得出微晶的平均粒径为 22.7 nm,且纳米 TiO₂ 呈均匀的团簇状结构。

1.3 细胞培养与实验设计

胃癌 BGC-823 细胞系购于中国科学院上海细胞生物研究所。将 BGC-823 细胞置于 37 ℃、含 5% CO₂ 的饱和湿度的培养箱内,用含 10% 小牛血清、青霉素 100 × 10³ U/L、链霉素 100 mg/L 的 RPMI-1640 培养液培养,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞进行传代培养。将对数生长期的 BGC-823 细胞制成浓度为 5 × 10⁶ 个/mL 的单细胞悬液用于实验,细胞浓度用血球计数板测定。本研究设计 3 组实验,即对照组、紫外光照组和实验组,各组具体处理方法如下^[13]:

对照组处理:将 1.5 mL BGC-823 单细胞悬液接种于直径 30 mm 涂覆 TiO₂ 的培养皿中,无光照,常规培养。

紫外光照组处理:将 1.5 mL BGC-823 单细胞悬液接种于直径为 30 mm 未涂覆 TiO₂ 的培养皿中,孵育 1 h 后在 37 ℃ 下用高压汞灯照射。照射完毕,继续孵育 3 h 后处理 BGC-823 细胞。

实验组处理:同紫外光照组处理,但培养皿中涂覆不同量 TiO₂。

1.4 纳米 TiO₂ 光催化氧化杀伤 BGC-823 细胞的实验装置

TiO₂ 光催化氧化杀伤 BGC-823 细胞的实验采用主波长为 365 nm 的 300 W 高压汞灯为光源,培养皿上加盖石英玻璃片,以滤去 300 nm 波长以下的光。调整高压汞灯与培养皿之间的距离,采用光强测定仪测定其实际光强,本实验中实际光强为 1.06 × 10⁻³ W/cm²。为了减少灯的热效应,在实验中将超净工作台上的换气扇开启。为了防止光的散射和外部光源的干扰,整个超净工作台四周采用铝箔包裹,前方用黑布遮盖。

1.5 纳米 TiO₂ 光催化氧化前后 BGC-823 细胞的形态学观察

将 TiO₂ 光催化氧化前后的 BGC-823 细胞分别离心后,重新悬浮于 RPMI-1640 培养液中,样品转移至 24 孔板,直接置于倒置相差显微镜下(放大 100 倍)观察并拍照。

1.6 细胞周期的测定

终止培养各组 BGC-823 细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化,离心后以 pH = 7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,调整待测 BGC-823 细胞浓度为 1 × 10⁶ 个/mL;用 70% 的冷乙醇固定至少 2 h。上机测定前,用 PBS 洗去乙醇,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,以 PBS 调整 BGC-823 细胞浓度至 2 × 10⁶ 个/mL;加碘化丙啶(PI)(50 g/L)400 μL,其中碘化丙啶中含有 10 g/L 的 RNA 酶。避光染色 30 min 后,以流式细胞仪测定 BGC-823 细胞周期,数据在 Modfit 软件下进行分析。每组实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

各组数据皆以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS10.0 软件进行数据处理,组间比较皆采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 纳米 TiO₂ 光催化氧化前后 BGC-823 细胞的形态学变化

TiO₂ 光催化氧化处理前后 BGC-823 细胞形态的变化如图 1 和 2 所示。

图 1 为正常 BGC-823 细胞的形态,图 2 为 TiO₂ 比负载量为 9.8 × 10⁻⁷ g/cm²、紫外光照射 40 min 处理后的细胞形态。对比图 1 和图 2 可以看出,TiO₂ 光催化氧化处理前后的 BGC-823 细胞形态有明显变化。处理前,BGC-823 细胞透明度大、折光性强、轮廓不清,细胞之间空隙非常小,细胞规则,还可观察到部分细胞细微结构;处理后,BGC-823 细胞的折光性变弱,轮廓增强,细胞收缩变小,细胞之间空隙加大,细胞变得不规则,失去原有特点,活细胞数大量减少,有许多细胞碎片生成,这可能是细胞受激坏死或凋亡晚期细胞发生继发性坏死^[14] 的表现。

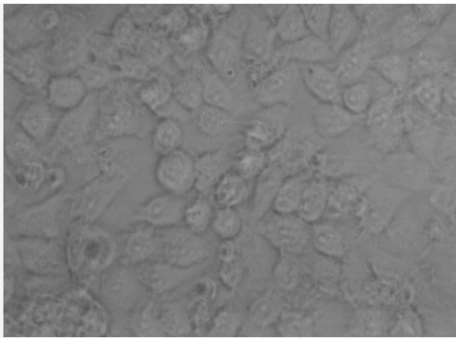


图1 TiO₂处理前 BGC-823 细胞的形态

Fig.1 Morphology of BGC-823 cells before treated with TiO₂

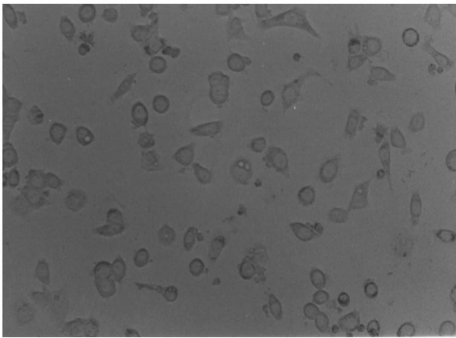


图2 TiO₂处理后 BGC-823 细胞的形态

Fig.2 Morphology of BGC-823 cells after treated with TiO₂

2.2 纳米 TiO₂光催化氧化对 BGC-823 细胞生长周期的影响

以流式细胞仪检测各组 BGC-823 细胞的细胞周期和凋亡率,结果见表 1。

表 1 TiO₂光催化氧化对 BGC-823 细胞周期及凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of TiO₂ photocatalytic oxidation on cell cycle and apoptosis rate($\bar{x} \pm s, n=3$)

| Coated amount of TiO ₂ /($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) | Irradiation time/min | (G_0/G_1)/% | S/% | (G_2/M)/% | Apoptosis rate/% |
|---|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| 0 | 0 | 75.78 \pm 2.36 | 16.85 \pm 0.91 | 7.37 \pm 0.60 | 0.38 \pm 0.09 |
| 0 | 20 | 75.17 \pm 1.97 | 15.45 \pm 0.37 | 9.39 \pm 0.65 ** | 1.75 \pm 0.69 ** |
| 0.98 | 20 | 69.56 \pm 2.22 | 12.82 \pm 0.70 | 17.62 \pm 0.91 * | 9.75 \pm 0.86 * |
| 1.95 | 20 | 70.50 \pm 1.04 | 14.40 \pm 0.80 | 15.11 \pm 0.64 * | 9.41 \pm 0.77 * |
| 0 | 40 | 71.13 \pm 2.06 | 14.47 \pm 0.82 | 13.40 \pm 0.86 * | 6.18 \pm 0.61 * |
| 0.98 | 40 | 52.38 \pm 1.07 | 9.28 \pm 0.78 | 38.35 \pm 1.14 * | 24.34 \pm 1.19 * |
| 1.95 | 40 | 53.18 \pm 1.42 | 11.14 \pm 0.24 | 35.68 \pm 1.11 * | 23.51 \pm 1.26 * |

Remark:compare with blank group, * $P<0.01$, ** $P<0.05$.

表 1 结果显示,对照组 BGC-823 细胞多数处于 G_0/G_1 期, S 期次之, G_2/M 期最少,细胞偶发凋亡;紫外光照射可引起 BGC-823 的各期细胞比例及细胞凋亡率发生变化($P<0.05$);纳米 TiO₂在紫外光照射 20 与 40 min 后均导致 G_0/G_1 期和 S 期细胞比例显著减少, G_2/M 期细胞比例和细胞凋亡率显著增大($P<0.01$)。对比不同 TiO₂ 比负载量对细胞周期及凋亡率的影响可知,比负载量 $9.8 \times 10^{-7} \text{ g/cm}^2$ 时,光照 20 与 40 min 效果均强于比负载量为 $1.95 \times 10^{-6} \text{ g/cm}^2$ 。推测可能是由于 TiO₂ 比负载量较大引起 TiO₂ 纳米粒子间发生重叠,一方面阻碍了紫外光的穿透,另一方面使自身有效催化面积减小,从而降低其催化活性,导致对 BGC-823 细胞的杀伤效应减弱。

细胞周期是指连续分裂的细胞从上一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂完成所经历的整个过程,它包含 G_1 期、 S 期、 G_2 期、 M 期 4 个阶段, M 期与 G_1 期之间的静止期为 G_0 期^[15]。纳米 TiO₂ 光催化氧化使 G_0/G_1 期、 S 期细胞比例显著减少,可能是其产生的活性氧类物质对 DNA 进行了直接损伤,或对 G_1 和 S 期细胞的 RNA 及蛋白质合成产生了抑制作用;同时使 G_2/M 期细胞阻滞,提示纳米 TiO₂ 光催化氧化可阻碍与 BGC-823 细胞分裂有关的蛋白质和微管蛋白等物质的合成^[16],使多数细胞不能通过 M 期向 G_1 期转变,无法完成正常的有丝分裂,从而导致 G_1 期细胞减少, G_2 期细胞累积。此研究结果与熊先立等^[17]报道的纳米 TiO₂ 光催化氧化使人肝癌 Bel-7402 细胞周期阻滞于 G_1 期不一致,推测可能是催化剂存在形态和所选肿瘤细胞系不同及实验条件差异所致。

不同阶段的细胞周期的过渡,主要是在不同的细胞周期调节因子、增殖细胞核抗原、抑癌基因 p53 等推动下完成的。Cyclin B1-Cdc2 复合物(有丝分裂促进因子)是 G_2/M 期检验点的关键调节因子,很多相关基因和蛋白通过影响其活性对 G_2/M 期检验点进行调控^[18]。根据本文结果,可向上游追寻引起 G_2/M 期阻滞的原因,研究纳米 TiO₂ 光催化氧化对相关基因和蛋白的影响,并进一步探明其诱发癌细胞

凋亡的具体通路,阐明光催化氧化纳米 TiO_2 杀伤癌细胞的机理。

3 结 论

纳米 TiO_2 光催化氧化使胃癌 BGC-823 细胞周期阻滞于 G_2/M 期并诱导细胞凋亡,从而抑制其 DNA 合成及增殖分化进程。当光强为 $1.06 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$ 、光照为 40 min、 TiO_2 比负载量为 $9.8 \times 10^{-7} \text{ g/cm}^2$ 时, G_2/M 期阻滞较为显著,细胞凋亡率达 24.34%。这一研究结果有利于阐明 TiO_2 光催化氧化杀伤胃癌细胞的机理。

参 考 文 献

- [1] Fujishima A, Tata N R, Donald A T. Titanium Dioxide Photocatalysis[J]. *Photochem Photobiol C:Photochem Rev*, 2000, **1**(1):1-21.
- [2] Dodd N J F, Jha A N. Titanium Dioxide Induced Cell Damage: A Proposed Role of the Carboxyl Radical[J]. *Mutat Res, Fundm Mol Mech Mutagen*, 2009, **660**(1/2):79-82.
- [3] Wang J, Guo Y W, Liu B, *et al.* Detection and Analysis of Reactive Oxygen Species(ROS) Generated by Nano-sized TiO_2 Powder under Ultrasonic Irradiation and Application in Sonocatalytic Degradation of Organic Dyes[J]. *Ultrason Sonochem*, 2011, **18**(1):177-183.
- [4] ZHU Rongrong, WANG Shilong, CHEN Xiaoping, *et al.* Selective Apoptosis Inducing Effect of Nano- TiO_2 on CHO Cells [J]. *Acta Chim Sin*, 2006, **64**(21):2161-2164 (in Chinese).
朱融融, 汪世龙, 陈小平等. 纳米二氧化钛对卵巢肿瘤细胞的选择性凋亡的诱导作用[J]. *化学学报*, 2006, **64**(21):2161-2164.
- [5] Lo'pez T, Figueras F, Manjarrez J, *et al.* Catalytic Nanomedicine: A New Field in Antitumor Treatment Using Supported Platinum Nanoparticles. *In vitro* DNA Degradation and *in vivo* Tests with C6 Animal Model on Wistar Rats[J]. *Eur J Med Chem*, 2010, **45**(5):1982-1990.
- [6] Harada Y, Ogawa K, Irie Y, *et al.* Ultrasound Activation of TiO_2 in Melanoma Tumors[J]. *J Controlled Release*, 2011, **49**(2):190-195.
- [7] Long T C, Saleh N, Tilton R D, *et al.* Titanium Dioxide(P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia(BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity[J]. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**(14):4346-4352.
- [8] XIA Chunhui, YU Wenxue, WANG Baiqi, *et al.* Damaging Effects of Photo Excited TiO_2 Nanoparticles on Gastric Cancer SGC-7901 Cells[J]. *Chem J Chinese Univ*, 2009, **30**(11):2123-2126 (in Chinese).
夏春辉, 于文学, 王百齐, 等. 光激发纳米 TiO_2 对胃癌 SGC-7901 细胞的杀伤作用[J]. *高等学校化学学报*, 2009, **30**(11):2123-2126.
- [9] Wang L, Mao J, Zhang G H, *et al.* Nano-cerium-element Doped Titanium Dioxide Induces Apoptosis of Bel 7402 Human Hepatoma Cells in the Presence of Visible Light[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, **13**(29):4011-4014.
- [10] Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and Modulation of Apoptosis by Oxidative Stress[J]. *Free Radical Biol Med*, 2000, **29**(3/4):323-333.
- [11] Zhang A P, Sun Y P. Photocatalytic Killing Effect of TiO_2 Nanoparticles on Ls-174-t Human Colon Carcinoma Cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2004, **10**(21):3191-3193.
- [12] ZHANG Aiping, SUN Yanping, LIANG Zhenhai, *et al.* The Photocatalytic Killing Effect of Surface Fractal Dimension of TiO_2 Film on Human Gastric Cancer[J]. *Rare Met Mater Eng*, 2005, **34**(2):279-282 (in Chinese).
张爱平, 孙彦平, 梁镇海, 等. TiO_2 薄膜表面分形结构对光催化氧化杀伤胃癌细胞的影响[J]. *稀有金属材料与工程*, 2005, **34**(2):279-282.
- [13] ZHANG Aiping, SUN Yanping, FAN Caimei. Photocatalytic Killing Effect of Nanometer Titanium Dioxide on Human Gastric Cancer Cell[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2004, **21**(11):1109-1112 (in Chinese).
张爱平, 孙彦平, 樊彩梅. 纳米 TiO_2 对胃癌细胞的光催化氧化杀伤效应[J]. *应用化学*, 2004, **21**(11):1109-1112.
- [14] PENG Liming, WANG Zengli. The Basic and Clinic of Cell Apoptosis[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000:153 (in Chinese).
彭黎明, 王曾礼. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000:153.
- [15] CHEN Guangxiang, CHEN Li. Cell Cycle and Its Control with Tumor[J]. *Chinese J Med Officer*, 2002, **30**(6):78-79 (in Chinese).
陈广祥, 陈丽. 细胞周期及其调控与肿瘤[J]. *临床军医杂志*, 2002, **30**(6):78-79.
- [16] Lagopati N, Kitsiou P V, Kontos A I, *et al.* Photo-induced Treatment of Breast Epithelial Cancer Cells Using Nanostructured Titanium Dioxide Solution[J]. *Photochem Photobiol A:Chem*, 2010, **214**(2/3):215-223.

[17] XIONG Xianli, WU Meiling, LI Shipu. Effects of Nano-TiO₂ on the Cell Cycle of Hepatoma Carcinoma Bel-7402 Cell[J]. *Cancer Res Prev Treat*, 2003, **30**(4):300 (in Chinese).
熊先立, 吴美玲, 李世普. 纳米二氧化钛对人肝癌 Bel-7402 细胞周期的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2003, **30**(4):300.

[18] Santamaria D, Ortega S. Cyclins and CDKS in Development and Cancer: Lessons from Genetically Modified Mice[J]. *Front Biosci*, 2006, **1**(11):1164-1188.

Effects of Nano-TiO₂ Photocatalytic Oxidization on the Cell Cycle of BGC-823 Gastric Cancer Cells

WEN Wen^a, GAO Xiaoya^a, ZHANG Aiping^{a*}, SONG Zhiying^a, SUN Yanping^b
(^a*School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;*
^b*Institute of Clean Technique for Chemical Engineering of
Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, China*)

Abstract In order to explore the mechanisms of killing cancer cells *via* nano-TiO₂ photocatalytic oxidization, gastric cancer cell line BGC-823 was cultured as research object in this study. The morphologic changes were observed by inverted phase-contrast microscope, the apoptotic rates and cell cycle of BGC-823 cells were examined by flow cytometer. The results showed that nano-TiO₂ photocatalytic oxidation caused the necrosis or secondary necrosis of BGC-823 cells, and inhibited the synthesis of DNA and their proliferation process, through arresting the *G*₂/*M* phase and inducing apoptosis of BGC-823 cells. Significant arrest was observed and the apoptotic rates of BGC-823 cells reached 24.34% when the coated amount of TiO₂ was 9.8 × 10⁻⁷ g/cm² and the irradiation time was 40 min.

Keywords photocatalytic oxidization, nano-TiO₂, gastric cancer cell line BGC-823, cell cycle, apoptosis