

# 光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 对胃癌 SGC-7901 细胞的杀伤作用

夏春辉<sup>1,2</sup>, 于文学<sup>1</sup>, 王百齐<sup>3</sup>, 王玉<sup>2</sup>, 王璐<sup>2</sup>, 黄海涛<sup>2</sup>

(1. 吉林大学材料科学与工程学院, 长春 130012; 2. 齐齐哈尔医学院药理学系, 齐齐哈尔 161006;  
3. 天津医科大学公共卫生学院, 天津 300070)

**摘要** 探讨了光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 对胃癌 SGC-7901 细胞的杀伤作用, 考察了在不同纳米 TiO<sub>2</sub> 浓度及不同光照时间下纳米 TiO<sub>2</sub> 的抑瘤效果, 并探讨了抑瘤机制. 结果表明, 光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 对胃癌 SGC-7901 细胞具有明显的抑制作用, 其过程类似一级反应的动力学规律; 当纳米 TiO<sub>2</sub> 浓度为 300 μg/mL 时, 对胃癌 SGC-7901 细胞表现出较强的杀伤效果, 其主要表现形式有两种, 即细胞坏死和细胞凋亡, 是由光激发条件下, 纳米 TiO<sub>2</sub> 表面产生的活性氧组分对肿瘤细胞的有效杀伤所致.

**关键词** 纳米 TiO<sub>2</sub>; 胃癌 SGC-7901 细胞; 光激发; 杀伤效应

**中图分类号** O614.4; O643; R735.7

**文献标识码** A

**文章编号** 0251-0790(2009)11-2123-04

肿瘤光动力治疗法是继传统的手术、化疗、放射治疗之后兴起的一种令人瞩目的治疗肿瘤的新型医疗技术. 该方法基于将光敏剂选择性地滞留在肿瘤细胞中, 经富集后, 用一定波长的光激发产生光动力学反应, 从而杀死肿瘤细胞. 其最大的优点是可选择性地消灭肿瘤, 而基本不危及正常组织. 光敏剂的选择是光动力学疗法的关键<sup>[1,2]</sup>. 由于纳米 TiO<sub>2</sub> 在肿瘤细胞中比正常细胞中具有更为显著的聚集作用, 因而有望成为具有靶向作用的抗肿瘤光敏剂<sup>[3]</sup>. 此外, 由于纳米 TiO<sub>2</sub> 在紫外光照射下产生的活性氧等组分可对肿瘤细胞内外的物质产生强氧化作用, 从而有效地杀伤肿瘤细胞<sup>[4~6]</sup>. 目前, 研究主要集中在气相法、溶胶凝胶法及修饰改性法制备的纳米 TiO<sub>2</sub> 在光激发下对一些肿瘤细胞的抑制作用<sup>[4~6]</sup>, 而利用水热法制备的纳米 TiO<sub>2</sub> 对肿瘤细胞的抑制作用的机制研究还鲜见报道. 本文报道了利用水热法制备的纳米 TiO<sub>2</sub> 在光激发条件下对胃癌 SGC-7901 细胞的杀伤效应, 考察了不同条件下纳米 TiO<sub>2</sub> 的抗肿瘤效果, 初步探讨了纳米 TiO<sub>2</sub> 对肿瘤细胞的作用机制, 为纳米 TiO<sub>2</sub> 光敏剂的深入研究及临床应用奠定了理论与实验基础.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

噻唑兰 (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; 胃癌 SGC-7901 细胞购自中国科学院上海细胞研究所; 其它试剂为国产分析纯. SB-100P 黑光灯 (美国 Spectronics 公司); UV-2550 紫外分光光度计 (日本岛津公司); DSZ5000 倒置显微镜 (重庆奥特光学仪器有限公司); 洁净操作台 (苏净集团安泰公司); JEOL-1200 EX 透射电镜 (TEM, 日本电子公司); D/max-rA 型 X 射线衍射仪 (XRD, 日本理学公司), Cu 靶,  $\lambda = 0.15418$  nm, 管电压 30 kV, 管电流 20 mA.

### 1.2 纳米 TiO<sub>2</sub> 的制备及表征

将 20 mL 异丙醇与 10 mL 钛酸异丙酯的均匀混合液缓慢滴加到含有 10 mL 水、2 mL 硝酸和 40 mL 异丙醇的溶液中, 滴加结束后继续搅拌 2 h. 然后将反应液转移至高压釜中于 180 °C 保温 10 h, 冷却后

收稿日期: 2009-03-04.

基金项目: 黑龙江省自然科学基金 (批准号: D2007-113, D2007-114)、黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助计划 (批准号: 1055G066, 1154G01) 和黑龙江省卫生厅科学技术项目 (批准号: 2006-414) 资助.

联系人简介: 于文学, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事功能材料制备与性质研究. E-mail: yuwenxue@jlu.edu.cn

用蒸馏水洗涤沉淀3次,即得到纳米TiO<sub>2</sub>.将纳米TiO<sub>2</sub>用水配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1 mol/L NaOH将纳米TiO<sub>2</sub>溶胶液的pH值调至7.0左右,然后在120℃下高压灭菌20 min,冷却至室温备用.

利用TEM对纳米TiO<sub>2</sub>的形貌及粒径进行分析;通过XRD法对纳米TiO<sub>2</sub>的物相组成进行测定.

### 1.3 细胞培养

将胃癌SGC-7901细胞培养在含10%小牛血清的DMEM培养液中,加入100 μ/L青霉素、100 mg/L链霉素,置于37℃和5%CO<sub>2</sub>培养箱内培养.

### 1.4 光激发纳米TiO<sub>2</sub>杀伤胃癌SGC-7901细胞的处理及检测

取对数生长期细胞,用胰蛋白酶消化后,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 $4 \times 10^4$  cell/mL.取1 mL细胞悬液分别接种于24孔培养板中,培养24 h后,弃去原培养液,在每孔中分别加入不同浓度的纳米TiO<sub>2</sub>新培养液,在37℃下,用SB-100P黑光灯(主波长365 nm)照射不同时间,照射距离为38 cm,强度为4.0 mW/cm<sup>2</sup>.

光激发纳米TiO<sub>2</sub>对SGC-7901细胞抑制率采用MTT法测定<sup>[7]</sup>.

胃癌SGC-7901细胞经光激发纳米TiO<sub>2</sub>(300 μg/mL)作用30 min后,于倒置显微镜下观察细胞形态变化及与MTT生成的Formazan蓝紫色结晶变化.

## 2 结果与讨论

### 2.1 纳米TiO<sub>2</sub>的TEM和XRD分析

图1和图2分别为纳米TiO<sub>2</sub>的TEM照片及XRD衍射图.由图1可见,纳米TiO<sub>2</sub>分散性较好,粒子呈近似球形,平均粒径约为10 nm.由见图2可见,纳米TiO<sub>2</sub>粒子以锐钛矿(Anatase)形式存在,并未发现其它物相的衍射峰,这表明实验所用的纳米TiO<sub>2</sub>纯度较高.

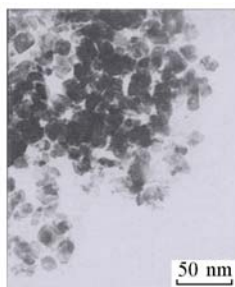


Fig. 1 TEM image of TiO<sub>2</sub> nanoparticles

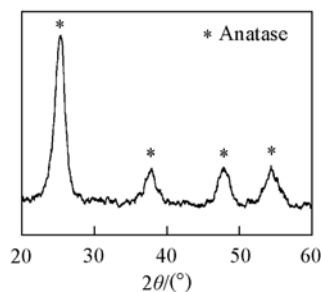


Fig. 2 XRD pattern of TiO<sub>2</sub> nanoparticles

### 2.2 光激发纳米TiO<sub>2</sub>对SGC-7901细胞的杀伤作用

采用MTT法测定光激发纳米TiO<sub>2</sub>对SGC-7901细胞的抑制作用的机理在于,活细胞内线粒体琥珀酸脱氢酶将淡黄色的MTT还原为蓝紫色的Formazan结晶,Formazan产量与活细胞数成正比.图3为抑瘤率与TiO<sub>2</sub>含量的关系曲线.从图3中可看出,在紫外光照射40 min后,仅有7%左右的SGC-7901细胞被杀死.在无紫外光条件下,纳米TiO<sub>2</sub>微粒对细胞几乎无毒性,700 μg/mL的TiO<sub>2</sub>微粒对细胞的抑制率仅为8%.在紫外光照射下,纳米TiO<sub>2</sub>表现出对细胞极强的杀伤能力.随着光照时间的增加,抑瘤率逐渐上升,但抑瘤率在开始10 min内上升较快,随着时间延长逐渐减慢,表现出类似一级反应动力学规律<sup>[8]</sup>.此外,从图3还可以看出,随着纳米TiO<sub>2</sub>

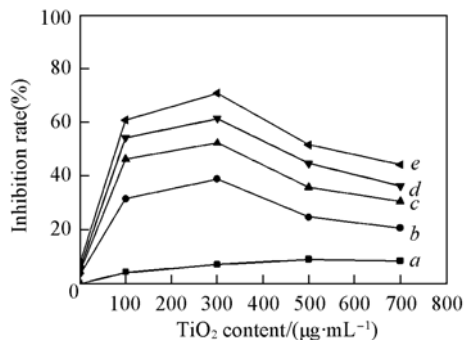


Fig. 3 Relationship between inhibition ratio of cancer cell and TiO<sub>2</sub> content

a. No UVA light; b. UVA light for 10 min; c. UVA light for 20 min; d. UVA light for 30 min; e. UVA light for 40 min. UVA: ultraviolet A.

浓度的升高, 抑瘤率先升高后降低, 在 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时达到最大值; 而后随着纳米 TiO<sub>2</sub> 浓度的继续升高, 抑瘤率反而有所下降. 这说明光照开始时, 随着浓度的升高, 纳米 TiO<sub>2</sub> 在癌细胞表面的吸附逐渐增大, 光激发下表现为对细胞抑制作用的增强. 当 TiO<sub>2</sub> 浓度继续增大时, 抑瘤率达到最大值后反而下降, 这主要是由于当纳米 TiO<sub>2</sub> 在癌细胞表面的吸附达到最大值后, 继续提高纳米 TiO<sub>2</sub> 浓度反而影响了照射到癌细胞表面 TiO<sub>2</sub> 上的有效光子数, 从而降低了光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 的抑瘤作用.

此外, MTT 染色分析(图 4)显示, 与正常的 SGC-7901 细胞相比, 单纯的紫外光照射或 TiO<sub>2</sub> 单独作用后, 细胞还原 MTT 在细胞内及细胞周围生成紫蓝色 Formazan 结晶的数量基本相同[见图 4(A), (B)和(C)]. 然而在光激发 TiO<sub>2</sub> 作用下, 细胞密度明显降低, Formazan 紫蓝色结晶明显减少[见图 4(D)]. 结果表明, 紫外光或纳米 TiO<sub>2</sub> 对细胞的毒性很小, 而光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 能杀死细胞效果显著.

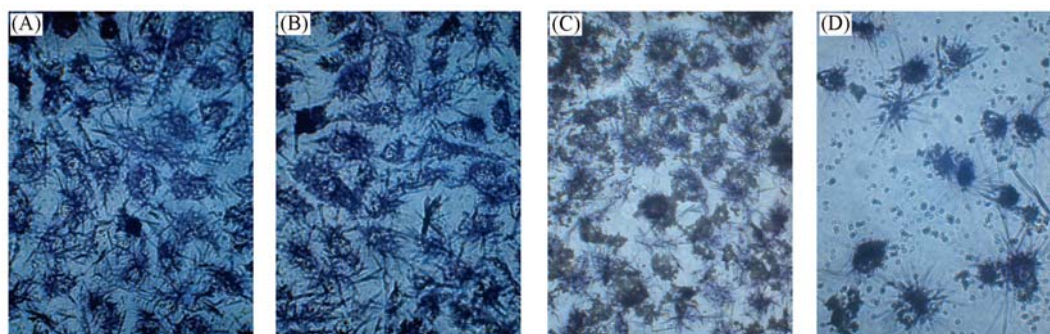


Fig. 4 Violet-blue Formazan crystalline after SGC-7901 cells reducing MTT( $\times 1000$ )

(A) Control group; (B) UVA light without TiO<sub>2</sub>; (C) TiO<sub>2</sub> without UVA light; (D) photoexcited TiO<sub>2</sub> nanoparticles.

### 2.3 光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 杀伤 SGC-7901 细胞的形态学变化

图 5 为光激发杀伤实验前后 SGC-7901 胃癌细胞的形态学照片. 正常的 SGC-7901 细胞呈贴壁生长, 轮廓较为清晰, 呈多边形和梭形[图 5(A)]. 在单纯的紫外光照射或 TiO<sub>2</sub> 单独作用 SGC-7901 癌细胞后, 细胞的形态几乎未发生变化[见图 5(B)和(C)]. 然而当光激发 TiO<sub>2</sub> 作用后, 部分细胞失去贴壁性, 细胞变圆, 细胞核固缩, 呈现细胞凋亡特征; 部分细胞发生自溶现象, 细胞膜的连续性被破坏, 呈均质无结构物质, 即细胞坏死特征[图 5(D)]. 由此可见, 光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 的杀伤效应表现为细胞坏死和细胞凋亡两种形式.

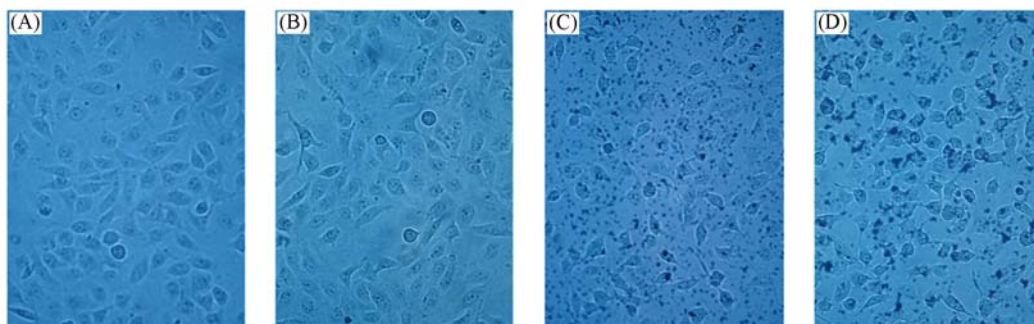


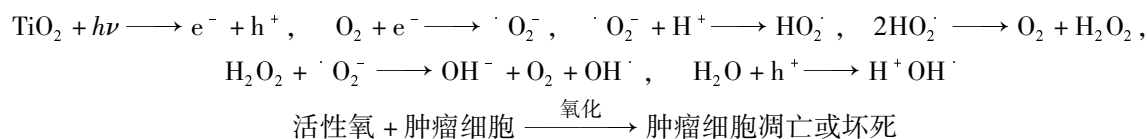
Fig. 5 Effect of photoexcited TiO<sub>2</sub> nanoparticles on SGC-7901 cells morphology( $\times 1000$ )

(A) Control group; (B) UVA light without TiO<sub>2</sub>; (C) TiO<sub>2</sub> without UVA light; (D) photoexcited TiO<sub>2</sub> nanoparticles.

此外, 纳米 TiO<sub>2</sub> 易于吸附在细胞膜上[见图 5(C)], 这主要是因为纳米 TiO<sub>2</sub> 的等电点在 6.0 左右<sup>[9]</sup>, 因此在 pH=7.0 时, TiO<sub>2</sub> 表面应带负电荷, 而 SGC-7901 细胞膜表面具有带正电荷的特性. 因此静电相互作用使得二者非常容易结合.

光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 杀伤 SGC-7901 细胞的作用机理可能是<sup>[10~12]</sup>: (1) 当吸附在细胞膜上的纳米 TiO<sub>2</sub> 受到大于其带隙能的紫外光激发时, 其价带上的电子跃迁进入导带, 形成电子(e<sup>-</sup>)-空穴(h<sup>+</sup>)对, 活泼的电子和空穴在电场的作用下分别迁移到纳米 TiO<sub>2</sub> 粒子表面的不同位置, 在纳米二氧化钛表面, 光生电子 e<sup>-</sup> 易被水中溶解氧等氧化性物质所捕获, 生成 OH<sup>·</sup>, <sup>·</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等活性氧, 而 h<sup>+</sup> 则将

H<sub>2</sub>O 分子氧化形成 OH· 自由基; (2) OH·, ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 都具有很强的化学活性, 能氧化细胞膜内外的生物大分子(如脂类、蛋白质、酶类和核酸等), 破坏其正常生理代谢, 直接损害或通过一系列过氧化链式反应而引起细胞结构的破坏, 从而导致肿瘤细胞凋亡或坏死. 具体反应式如下:



综上所述表明, 在光激发条件下, 浓度为 300 μg/mL 的纳米 TiO<sub>2</sub> 对胃癌 SGC-7901 细胞具有较强的杀伤作用, 其过程表现出类似一级反应动力学的规律; 光激发纳米 TiO<sub>2</sub> 杀伤 SGC-7901 细胞的作用表现为细胞坏死和细胞凋亡两种形式.

### 参 考 文 献

- [1] CHEN Jin-Can(陈锦灿), CHEN Hong-Wei(陈宏伟), LI Yong-Dong(李永东), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(11): 2131—2137
- [2] HUANG Qi-Mao(黄齐茂), XIAO Xin(肖欣), PAN Zhi-Quan(潘志权), *et al.*. Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2009, **30**(5): 923—927
- [3] ZHU Rong-Rong(朱融融), WANG Shi-Long(汪世龙), CHEN Xiao-Ping(陈小平), *et al.*. Acta Chimica Sinica(化学学报)[J], 2006, **64**(21): 2161—2164
- [4] Cai R., Kubota Y., Shuin T., *et al.*. Cancer Res. [J], 1992, **52**(8): 2346—2348
- [5] Zhang A. P., Sun Y. P.. World J. Gastroenterol[J], 2004, **10**(21): 3191—3193
- [6] Seo J. W., Chung H., Kim M. Y., *et al.*. Small[J], 2007, **3**(5): 850—853
- [7] Mosmann T. J.. Immunol Methods[J], 1983, **65**(1): 55—63
- [8] Ho W., Yu J. C., Yu J. G.. Langmuir[J], 2005, **21**(8): 3486—3492
- [9] Jing C., Meng X., Liu S., *et al.*. J. Colloid Interface Sci. [J], 2005, **290**: 14—21
- [10] Hoffmann M. R., Martin S. T., Choi W., *et al.*. Chem. Rev. [J], 1995, **95**(1): 69—96
- [11] Hirakawa K., Mori M., Yoshida M., *et al.*. Free Radic Res. [J], 2004, **38**(5): 439—447
- [12] Kwon C. H., Park J. Y., Kim T. H., *et al.*. Toxicology[J], 2009, **257**(1/2): 1—9

## Damaging Effects of Photoexcited TiO<sub>2</sub> Nanoparticles on Gastric Cancer SGC-7901 Cells

XIA Chun-Hui<sup>1,2</sup>, YU Wen-Xue<sup>1\*</sup>, WANG Bai-Qi<sup>3</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, WANG Lu<sup>2</sup>, HUANG Hai-Tao<sup>2</sup>

(1. College of Materials Science and Engineering, Jilin University, Changchun 130012, China;

2. Pharmacy Department, Qiqihaer Medical College, Qiqihaer 161006, China;

3. School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** Damaging effects of photoexcited TiO<sub>2</sub> nanoparticles on gastric cancer SGC-7901 cells were investigated. The influences of nanosized TiO<sub>2</sub> content, and irradiation time on cancer inhibition were systematically studied, and the inhibition mechanism was primarily discussed. The results demonstrate that photoexcited TiO<sub>2</sub> nanoparticles exhibit good inhibition effects on gastric cancer SGC-7901 cells, and this process follows approximately first-order reaction rule. While the concentration of TiO<sub>2</sub> nanoparticles is about 300 μg/mL, the damaging effects are rather remarkable. In addition, the exhibition forms of gastric cancer SGC-7901 cells are apoptosis and necrosis in killing experiments. Taken together, damaging effects of photoexcited TiO<sub>2</sub> nanoparticles on gastric cancer SGC-7901 cells might be attributed to the reactive oxygen species formed on the TiO<sub>2</sub> nanoparticles surface.

**Keywords** TiO<sub>2</sub> nanoparticle; Gastric cancer SGC-7901 cell; Photoexcitement; Damaging effect

(Ed.: H, J, Z)