

5 Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~ 159

6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 7. 26~ 7. 30

7 入江伸吉. グル内タンパク質の高感度銀染色法. *生化学 (东京)*, 1980, **52**: 411~ 412

8 Georgellis D, Sohlberg B, Hartl F *et al.* Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 1995, **16**: 1259 ~ 1264

Cloning cDNA of RNA-binding Proteins by Using Phage Display Method: Construction of the Phage Expression Library. HE Yuanzheng, NI Xiaodong, LIU Dinggan, QING Guoliang, LI Zaiping (*Shanghai Institute of Biochem-*

istry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China).

Abstract In order to clone cDNAs coding for proteins specially binding to NF-IL6's 3' UTR, a phagemid expression library was constructed from cDNAs of revertant RR cells. The termination codons of those cloned cDNAs were largely removed by restricted exo III enzyme digestion, in order to facilitate the expression of cDNA as fusion proteins with the phage gene III. Examinations of this library showed that the library includes various lengths of cDNA inserts and it can express exogenous cDNA.

Key words phage display, RNA-binding protein, NF-IL6 3' UTR

超微粒 TiO₂ 对 U937 细胞光杀伤效应及机理研究

黄宁平 黄 丹¹⁾ 徐敏华 袁春伟
(东南大学分子与生物分子电子学实验室, 南京 210096)

摘要 超微粒 TiO₂ 经光催化氧化后对 U937 白血病细胞有明显的杀伤作用, DNA 琼脂糖凝胶电泳图证明了光激发 TiO₂ 能够损伤细胞内的 DNA, 从而导致细胞死亡, 提出了一种杀伤癌细胞的新思路.

关键词 超微粒 TiO₂, 光催化氧化, U937 细胞, 活性氧类

当 TiO₂ 半导体吸收了能量大于禁带宽度的光后, 价带电子被激发至导带, 产生电子-空穴对. 光生空穴具有强氧化性, 它能促使许多化学反应发生, 如光还原、光催化、光有机合成等^[1~ 5]. 目前将 TiO₂ 的光催化性质用于降解有机污染物的研究已比较多, 而将其应用于生物领域特别是研究它对人体内癌细胞作用的还很少. 通常人们治疗癌症采用的大多是放射疗法和使用抗癌药物的化学疗法, 放疗和化疗都会产生较大范围的副作用. 本文提出的思路中所需光为 300~ 400nm 的长波紫外光, 不仅容易获得, 而且射线的伤害较小. 本文以人体 U937 单核白血球的白血病细胞为实验对

象, 研究了超微粒 TiO₂ 对恶性细胞的光催化杀伤效应, 观察了细胞 DNA 的变化, 阐明了 TiO₂ 对细胞的作用机理.

1 材料和方法

1.1 超微粒 TiO₂ 胶体溶液的制备

采用水解钛酸丁酯 [Ti (OC₄H₉)₄] 的方法^[6, 7]来制备 TiO₂ 超微粒胶体溶液. 为了防止钛酸丁酯发生强烈水解, 先将 25 ml 钛酸丁酯加入装有异丙醇的滴液漏斗中, 然后将混合液缓慢滴入含有少量 70% 硝酸的 150 ml 去离

¹⁾南通师范专科学校, 南通 226000.
收稿日期: 1996-09-05, 修回日期: 1996-12-07

子水中, 该混合液保持在 75 ℃ 左右不停搅拌 6 h, 可形成透明稳定的 TiO_2 超微粒胶体溶液. 透射电镜 (TEM) 显示溶液由粒径在 10 nm 以下的 TiO_2 超微粒子组成.

由上述方法制得的 TiO_2 胶体溶液 pH 值为 1.8, 而本实验要求处理细胞用的 TiO_2 胶体溶液的微环境不应有害于细胞生长, 否则将对实验结果产生假象干扰, 因此我们在 TiO_2 胶体溶液中先加入高分子稳定剂聚乙烯醇, 超声后, 再用 NaOH 溶液将 pH 调至 7.0 左右. 处理过的 TiO_2 胶体溶液稀释至实验所需浓度, 然后在 121 ℃ 下高压灭菌 20 min.

1.2 细胞培养

人体 U937 单核白血球的白血病细胞由南京大学国家医药技术重点实验室提供. U937 细胞在 37 ℃, 含 5% CO_2 的培养箱内, 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基培养, 培养基中加入终浓度为 100 mg/L 的卡那霉素. 收集对数生长期的细胞, 细胞浓度用血球计数板测定.

1.3 超微粒 TiO_2 对细胞的杀伤处理

将一定浓度的 TiO_2 溶液加入到 U937 细胞 ($10^6/\text{ml}$) 中, 在 37 ℃ 磁力搅拌下, 用 500 W 高压汞灯照射, 加紫外滤光片得到波长为 300~400 nm 的光. 体系中光的强度用光功率计测定.

1.4 细胞存活率的测定

在细胞处理过程中, 每隔一定时间吸出 100 μl 至 96 孔板的不同孔内, 活细胞浓度采用 MTT 染色法^[8]测定. 测定时, 每孔加入 20 μl MTT (噻唑蓝, Serva) 溶液 (用 pH 7.2 的磷酸缓冲液配成 5 g/L 浓度, 过滤灭菌), 在 37 ℃ 下培养 4 h, 每孔再加入 100 μl 异丙醇 (含 0.04 mol/L HCl), 充分混合, 深蓝色结晶完全溶解后, 将 96 孔板置于酶联免疫检测仪上, 在波长 570 nm 处测定每孔光吸收值 A, 用不加 MTT 的细胞孔作本底对照. 存活率由 $[A]_t/[A]_i$ 获得, $[A]_i$ 为未经 TiO_2 处理的初始浓度细胞的光吸收值. 实验中得到的每个数据为三个平行实验获得的平均值.

1.5 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

将 TiO_2 光催化处理前后的 U937 细胞悬液 ($1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$) 在 800 g 下离心 8 min, 弃上清后, 悬浮于 40 μl 含 96% 0.2 mol/L 磷酸氢二钠和 4% 0.1 mol/L 柠檬酸的 PC 缓冲液中 (pH = 7.8) 至少 30 min. 然后在 1 000 g 下离心 5 min, 将上清转移至 0.5 ml Eppendorf 管, 真空浓缩 20 min, 随后加入 3 μl 0.25% NP-40 (Sigma) 水溶液和 3 μl 1 g/L RNase (Sigma) 水溶液. 在 37 ℃ 培养 30 min 后, 再加入 3 μl 1 g/L 蛋白酶 K (Sigma) 溶液, 37 ℃ 下继续培养 30 min, 最后加入 12 μl 凝胶加样缓冲液 (0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖). 将最后得到的样品用注射器小心注入制备好的 0.8% 琼脂糖凝胶上的点样孔内, 外加稳定电压 25 V, 电泳 10 h, DNA 从负极移向正极. 电泳结束后, 在 UV 透射照光板上将凝胶中的溴乙锭染色带拍照^[9,10].

2 结 果

2.1 超微粒 TiO_2 对细胞的光催化杀伤作用

从图 1 可看出, 在无光照条件下, 超微粒 TiO_2 对细胞几乎没有毒性, 90% 以上的细胞依旧存活. 在未加 TiO_2 微粒而只用紫外光照

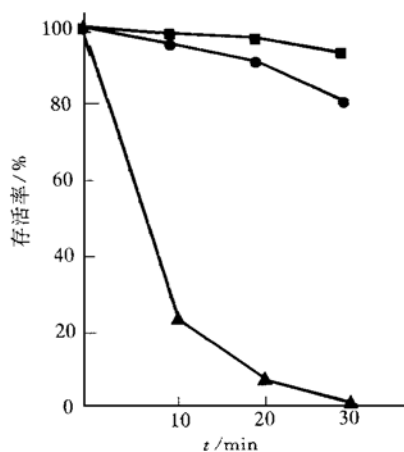


图 1 光照和 TiO_2 对 U937 细胞存活率的影响

■—■: TiO_2 (1 000 mg/L); ●—●: 光; ▲—▲: TiO_2 (1 000 mg/L) + 光.

射 30 min 后, 有 20% 细胞被杀死, 但在经历 20 min 光照后仍有 90% 细胞活着. 一旦将 TiO_2 和光照结合起来处理细胞, 该体系就显示出对 U937 细胞显著的杀伤效应, 仅作用 10 min, 就有近 80% 的细胞被杀死, 30 min 后, 细胞存活率几乎为 0. 因此通过对比可得出超微粒 TiO_2 对 U937 细胞有较好的光催化氧化杀伤效果.

2.2 经超微粒 TiO_2 光催化处理前后的变化

2.2.1 处理前后 U937 细胞形态的变化: 将经过 TiO_2 光处理以及未经处理的 U937 细胞分别离心后, 重新悬浮于 10% 三氯乙酸溶液中, 样品转移至 24 孔板, 直接置于倒置相差显微镜下观察, 得到图 2a 和图 2b. 通过对比, 发现处理后的 U937 细胞有收缩的趋势, 并且很多细胞的细胞膜上有小苞生成.

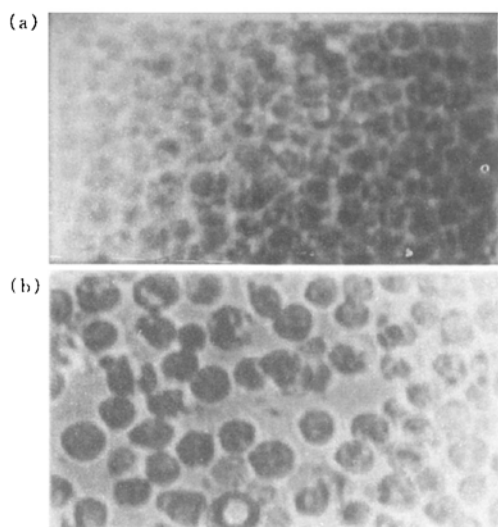


图 2 U937 细胞经超微粒 TiO_2 光催化处理引起的形态变化

(a) 处理前; (b) 处理后.

2.2.2 处理前后 U937 细胞 DNA 凝胶电泳的变化: DNA 分子在中性 pH 溶液中带负电荷, 在电场作用下向正极移动, DNA 分子在电场中通过凝胶介质而泳动, 凝胶介质具有分子筛效应, 分子越大, 则摩擦阻力越大, 越难于在凝胶孔隙中蠕动. DNA 在凝胶介质中迁移速率与碱基对数目的对数值成反比. 也就是说,

由于 DNA 分子质量的差别, 电泳后会呈现迁移位置的差异.

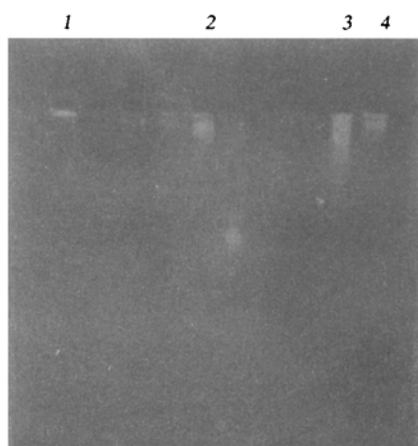


图 3 经 TiO_2 光催化处理前后的 U937 细胞 DNA 电泳图谱

点样孔 1~4 中的样品分别是经过 0、1 000、500、200 mg/L TiO_2 光催化处理 1 h 后的 U937 细胞中提取出的 DNA.

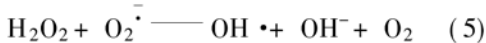
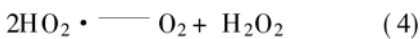
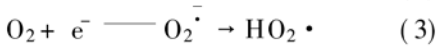
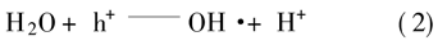
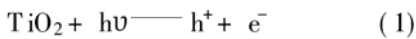
从图 3 看出, 点样孔 2, 3, 4 中样品电泳的迁移速率大于孔 1 中的 DNA 迁移速率, 说明经 TiO_2 光催化处理后, U937 细胞中 DNA 链断裂, 分子质量降低, 我们可以由此推测: U937 细胞的死亡可能与 DNA 损伤有关. 同时从电泳图谱中还可以发现浓度为 1 000 mg/L 的 TiO_2 溶液对细胞的光催化杀伤效应相对较强.

3 讨 论

人体 U937 单核白血球的白血病细胞经历超微粒 TiO_2 光催化氧化后被有效杀伤, 表现为细胞膜起苞, DNA 电泳区带呈梯状, DNA 链断裂, 这些都是细胞凋亡的特征, 但在 DNA 电泳图上也看到了细胞存在有坏死的迹象, 据此我们分析认为, TiO_2 超微粒受光照激发后能有效地杀死恶性细胞, 其对 U937 细胞的杀伤机理主要在于通过活性氧类 (ROS) 对细胞的氧化作用而最终导致细胞死亡, 这其中可能存在细胞凋亡和细胞受激坏死两个方面的死亡机制.

TiO_2 作为一种半导体材料, 其光催化活

性好. 当紫外光 ($h\nu > 3.2$ eV, 波长小于 390 nm) 照射到 TiO_2 微粒上, 价带电子被激发跃迁至导带, 形成光生电子-空穴对, 在空间电荷层的电场作用下, 电子与空穴有效分离, 分别迁移到 TiO_2 微粒表面. 吸附于 TiO_2 表面的水分子被光生空穴氧化, 水中的溶解氧被光生电子还原, 生成 $\text{OH}\cdot$, H_2O_2 , $\text{HO}_2\cdot$ 等活性氧类. Bard 等^[11] 已采用自旋捕捉法, 用 ESR 波谱仪检测出在 TiO_2 微粒光分解水的体系中存在自由基 $\text{OH}\cdot$ 和 $\text{HO}_2\cdot$. 反应表示如下:



这些活性氧类很容易与生物大分子反应, 直接损害或通过一系列过氧化链式反应而引起广泛的生物结构的破坏.

本实验中采用超微粒 TiO_2 有其优越性. TiO_2 粒径越小, 电子从粒内迁移到表面所需时间越短, 由于比表面积大, 电子与空穴复合几率就越小, 反应 (2) 和 (3) 亦越易发生, 因此 TiO_2 超微粒的催化活性将更优. 另外由于粒径小, TiO_2 微粒能与活细胞结合更紧密, 杀伤作用更显著.

本文结果表明光催化超微粒 TiO_2 对白血病细胞具有一定杀伤效应, 其中起作用的主要是 $\text{OH}\cdot$ 等活性氧类, 由于这些活性氧对作用物无选择性, 所以可以推测本文提出的方法同样适用于杀伤其他癌细胞. 这就提示人们可以将它作为一条治疗肿瘤和癌症的新思路. 虽然研究中所用的光 (300~400 nm) 不能穿透到人体内深处, 但这种光动力学疗法仍可用于治疗生长在某些器官如皮肤、口腔等表皮的肿瘤. 如果借助于光转化器, 或用光纤传导激光作光源, 将光纤插入皮下肿瘤组织, 这样不经开刀就能治疗其他器官的肿瘤将会成为可能.

参 考 文 献

1 Fujihira M, Satoh Y, Osa T. Heterogeneous photocatalytic

oxidation of aromatic compounds on TiO_2 . *Nature*, 1981, **293**: 206~208

- 2 Onoe J, Kawai T. Photochemical formation of glycine and methylamine from glycolic acid and ammonia in the presence of particulate cadmium sulphide. *J Chem Soc Chem Commun*, 1987, **401**: 1480~1481
- 3 Kawai T, Sakata T. Conversion of carbohydrate into hydrogen fuel by a photocatalytic process. *Nature*, 1980, **268**: 474~476
- 4 Inoue T, Fujishima A, Honda K. Photoelectrocatalytic reaction of carbon dioxide in aqueous suspensions of semiconductor powders. *Nature*, 1979, **277**: 637~638
- 5 Shimamura Y, Misama H, Oguchi T *et al.* Titanium dioxide photocatalyzed oxidation of aromatic hydrocarbons: The role of water and oxygen to induce aromatic hydroxylation. *Chemistry Letters*, 1983, **139** (11): 1691~1694
- 6 Kormann C, Bahnemann D W, Hoffmann M R. Preparation and characterization of quantum-size titanium dioxide. *J Phys Chem*, 1988, **92**: 5196~5201
- 7 O'Regan B, Moser J, Anderson M *et al.* Vectorial electron injection into transparent semiconductor membranes and electric field effects on the dynamics of light-induced charge separation. *J Phys Chem*, 1990, **94**: 8720~8726
- 8 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immuno Methods*, 1983, **65**: 55~63
- 9 Gong J P, Tragano F, Darzynkiewicz Z. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Analytical Biochemistry*, 1994, **218**: 314~319
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 6.1~6.58
- 11 Jaeger C D, Bard A J. Spin trapping and electron spin resonance detection of radical intermediates in the photodecomposition of water at TiO_2 particulate systems. *J Phys Chem*, 1979, **83**: 3146~3152

The Study of the Photokilling Effect and Mechanism of Ultrafine TiO_2 Particles on U937 Cells. HUANG Ningping, HUANG Dan, XU Minhua, YUAN Chunwei (*National Laboratory of Molecular and Biomolecular Electronics, Southeast University, Nanjing 210096, China*).

Abstract The killing effect of photoexcited TiO_2 particles on U937 cells has been studied. DNA agarose gel electrophoresis shows that photoexcited TiO_2 particles can damage DNA, leading to the death of cells. So a new assumption of the way to kill cancer cells is proposed.

Key words ultrafine TiO_2 particles (UFP TiO_2), photocatalytic killing effect, U937 cells, reactive oxygen species (ROS)