

TiO₂ 纳米光催化剂薄膜对牛晶状体上皮细胞黏附及移行的影响

单 玫 翁景宁 苏文悦

The effects of TiO₂ nano thin film on the migration and adherence of BLEC in vitro

Shan Mei, Weng Jingning, Su Wenyue. Department of Ophthalmology, Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

Abstract Objective The generate of posterior capsular opacification (PCO) is associated with the adhesive and migration of residual subcapsular lens epithelial cells (LECs). Titanium dioxide (TiO₂) nanometer is proved to have the ability of killing tumor cells and cultured bovine LECs. This study tried to observe the effects of TiO₂ nanometer thin film provoked by light on adhesiveness and migration of bovine LECs in vitro. **Methods** The fresh bovine lenses were obtained and cultured in DMEM containing 10% of newborn bovine serum. The second to fifth generation of cells were used in this experiment. The slide modified by TiO₂ photocatalyst film was prepared by sol-gel method. Cultured cells were seeded in filmed or unfilmed slides respectively and exposed to ultraviolet (wavelength 365 nm) for 20 or 40 minutes. The contact angle between water drop and slide was measured by dropping method and the cells adhered to slides were calculated after 24 and 48 hours of culture. The growth status and migration distance of bovine LECs were assayed and compared between filmed and unfilmed groups. **Results** The contact angle between water drop and slide was $0^\circ \pm 2^\circ$ and $18.825^\circ \pm 2.342^\circ$ in filmed and unfilmed group respectively, indicating a obviously smaller contact angle in TiO₂ filmed group than unfilmed one. The numbers of bovine LECs adhered to filmed slide was considerably reduced in TiO₂ filmed group compared with unfilmed group in different UVA exposure time ($t_{0 \text{ min}} = 5.492, P = 0.001; t_{20 \text{ min}} = 6.031, P = 0.000; t_{40 \text{ min}} = 6.828, P = 0.000$). However, no significant difference was found in the numbers of adhesive cells among 3 UVA irradiation time points ($F = 1.278, P = 0.297$). The migration distance of the cells was significantly shorter in TiO₂ filmed group in comparison with unfilmed group in 24 and 48 hours after UVA irradiation ($F_{\text{group}} = 14.965, P = 0.000; F_{\text{time}} = 38.033, P = 0.000$). **Conclusion** The TiO₂ nanometer thin film is characterized by the superhydrophilic property. So it can effectively impede the adhesion and migration of bovine LECs in vitro.

Key words lens epithelium cell; after cataract; titanium dioxide; photocatalyst film

摘要 目的 观察经光激发后 TiO₂ 纳米光催化剂薄膜对体外培养的牛晶状体上皮细胞 (LECs) 黏附及移行的影响。**方法** 采用溶胶-凝胶法在载玻片表面制备 TiO₂ 光催化剂薄膜, 对载玻片行接触角测量。体外培养牛 LECs 爬片生长于此薄膜上。未经 TiO₂ 纳米光催化剂薄膜修饰的载玻片设为对照。进行细胞黏附和迁移实验, 测定并比较牛 LECs 在 TiO₂ 薄膜修饰载玻片与对照载玻片表面的生长、移行情况。**结果** 对 TiO₂ 薄膜组和对照组载玻片行接触角测量: 对照组载玻片接触角为 $18.825^\circ \pm 2.342^\circ$, TiO₂ 镀膜组载玻片接触角为 $0^\circ \pm 2^\circ$, TiO₂ 镀膜组载玻片的接触角明显小于对照组。通过细胞黏附实验, TiO₂ 镀膜组载玻片表面细胞黏附数平均为 36.60 ± 11.20 , 对照组细胞黏附数平均为 96.40 ± 19.67 , 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。细胞迁移实验 (划痕法) 中, 对照组细胞移行距离平均为 0.951 mm , TiO₂ 镀膜组细胞平均移行距离为 0.640 mm , 差异有统计学意义 ($P = 0.000$)。**结论** TiO₂ 纳米光催化剂薄膜具有超亲水性, 能够明显抑制牛 LECs 在其表面的黏附和移行。

关键词 晶状体上皮细胞; 后发性白内障; 二氧化钛; 光催化剂膜

分类号 R 776.1 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808 (2009) 12-1073-04

后囊膜混浊 (posterior capsular opacification, PCO) 是白内障术后影响视功能的主要远期并发症, 发生机制与术后残留在囊膜下的晶状体上皮细胞 (lens epithelium cells, LECs) 黏附、移行于后囊膜有关。如何抑制或阻断 LECs 的移行及在人工晶状体 (intraocular lens, IOL) 表面的黏附是防止 PCO 的重要手段之一。TiO₂ 纳米光催化剂具有光催化氧化及光生超亲水特性, 已有报道纳米 TiO₂ 可明显杀伤肿瘤细胞及体外培养的牛 LECs^[1-3]。但其是否具有抑制 LECs 黏附和移行的作用, 目前国内尚未见报道。本研究对 TiO₂ 纳米光催化剂薄膜的表面性状及其对牛 LECs 黏附和移行的作用进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 PBS (福州迈新生物公司); DMEM (美国 Gibco 公司); 新生牛血清 (澳大利亚 PAA 公司); 胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司)。

1.1.2 主要仪器 CO₂ 培养箱 (美国 Revco 公司); 倒置相差荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); 光强测量仪 (中国计量科学研究所); OCA20 型接触角仪 (德国 Dataphysics 公司)。

1.2 方法

1.2.1 接触角的测量 将通过溶胶-凝胶法制得的 TiO₂ 纳米光催化剂薄膜的载玻片设为 TiO₂ 镀膜组和未涂覆 TiO₂ 薄膜的空白载玻片设为对照组, 经长波紫外线 (ultraviolet A, UVA) (主波长 365 nm, 平均光照强度 0.5 mW/cm²) 活化 5 min 后, 在 OCA20 型接触角仪上采用座滴法测定膜表面对水的接触角, 水滴体积为 5 μL, 实验时连续测定几个接触角, 然后取平均值, 测量误差为 ±2°。

1.2.2 牛 LECs 的培养 取新鲜小牛眼球, 剔除肌肉组织, 暴露干净的巩膜, 浸泡在含 320 U/mL 庆大霉素的生理盐水中 0.5 h, 再用 75% 乙醇浸泡 10 min。置超净台无菌操作, 无菌 PBS 冲洗 2 次, 沿角巩膜缘剪开角膜, 撕去虹膜, 暴露并截取晶状体前囊, 将其剪成若干碎片, 置于加有 3 mL 含 20% 新生牛血清的 DMEM 培养液的 6 孔板中, 每只眼晶状体囊膜放置 1 孔, 于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中静置培养, 4~7 d 后换液 1 次。原代培养的细胞在 6 孔板中生长呈亚融合状

态后, 按 1:2 传代, 在含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液中继续培养, 选取 2~5 代 LECs 进行实验^[4]。

1.2.3 细胞黏附实验 UVA 对载玻片进行预照射, 时间分别为 0、20、40 min, 同时消化细胞悬液, 密度为 1 × 10⁵/mL。预照射完毕后, 立即取 1 滴细胞悬液滴于 2 组载玻片上, 2 h 后用 PBS 冲洗 2 遍, 洗去未贴壁细胞, 加培养液培养 24 h 后, 进行瑞特染色, 光学显微镜下计数细胞^[5-6]。

1.2.4 细胞迁移实验 (划痕法) 细胞爬片生长融合至单层, 用 PBS 洗 2 遍, 血清饥饿法 (含 10 g/L 牛血清白蛋白和 1% 新生牛血清的 DMEM 培养液) 培养约 24 h, 用无菌滴管在载玻片中间轻轻划伤细胞约 5 mm, 然后用 PBS 洗 2 遍 (去除细胞碎片), 加 3 mL 左右的新鲜饥饿血清培养 24 h 和 48 h, 分别照相并进行比较, 用目镜上的标尺记录细胞移行距离 (以划伤边缘至移行最远细胞的垂直距离为细胞移行距离)^[7-9]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计学软件对数据进行分析。实验测试指标的数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对不同分组 (TiO₂ 镀膜组和对照组)、亚组 (各处理时间组) 之间测试指标的比较采用 A × B 析因实验设计方差分析; 各组间和各时间点间的多重比较采用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 接触角的测量

对照组载玻片的接触角为 15.8° ± 2°, TiO₂ 镀膜组为 0° ± 2°。结果显示, TiO₂ 镀膜组的载玻片表面具有超亲水性, 说明 TiO₂ 纳米光催化剂薄膜与机体有良好的相容性 (图 1)。

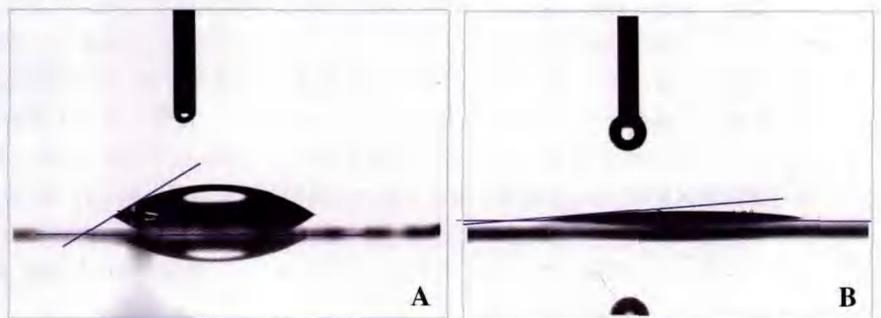


图 1 对照组与 TiO₂ 镀膜组载玻片的接触角测量 (座滴法) A: 水滴滴在对照组载玻片上后形成的纵切面图像, 接触角为 20° B: 水滴滴在 TiO₂ 镀膜组载玻片上后形成的纵切面图像, 接触角为 4.9°

Fig. 1 Measurement of contact angle formed by the water drop on the filmed and unfilmed slides (dropping method) A: On the unfilmed slide, the contact angle is 20° B: On the filmed slide, the contact angle is 4.9°

2.2 细胞黏附实验

对照组细胞黏附数为 (96.40 ± 19.67) 个/视野 (图 2A₁₋₃), TiO₂ 镀膜组细胞黏附数为 (36.60 ± 11.20) 个/视野 (图 2B₁₋₃), 差异有统计学意义 ($F = 111.011, P = 0.000$)。3 个时间点 2 组间细胞黏附均数的比较差异均有统计学意义 ($t_{0 \text{ min}} = 5.492, P = 0.001$; $t_{20 \text{ min}} = 6.031, P = 0.000$; $t_{40 \text{ min}} = 6.828, P = 0.000$)。不同 UVA 预照时间下的细胞黏附数比较, 差异无统计学意义 ($F = 1.278, P = 0.297$) (表 1)。

表 1 UVA 激发不同时间对照组与 TiO₂ 镀膜组载玻片上黏附的 LECs 数 ($\bar{x} \pm s$, 个/视野)

Table 1 Cell adhesive numbers on the filmed and unfilmed slides during different UVA exposure time ($\bar{x} \pm s$, cell/view field)

Group	n	Cell adhesive number in different UVA exposure time		
		0 min	20 min	40 min
Unfilmed	5	93.000 ± 18.276	103.800 ± 25.193	92.400 ± 16.817
TiO ₂	5	47.200 ± 3.701	34.800 ± 4.438	27.800 ± 12.834
t		5.492	6.031	6.828
P		0.001	0.000	0.000

$F_{\text{group}} = 111.011, P = 0.000$; $F_{\text{time}} = 1.278, P = 0.297$; $F_{\text{interaction}} = 1.840, P = 0.186$ (ANOVA, LSD-t test)

2.3 细胞迁移实验 (划痕法)

细胞划伤后细胞的移行距离对照组与 TiO₂ 镀膜组比较, 差异有统计学意义 ($F = 14.965, P = 0.000$);

不同时间点细胞的移行距离比较, 差异有统计学意义 ($F = 38.033, P = 0.000$), 2 个时间点间 2 组细胞移行距离的差异均有统计学意义 ($t_{24 \text{ h}} = 3.633, P = 0.002$; $t_{48 \text{ h}} = 2.821, P = 0.010$)。表明纳米 TiO₂ 光催化剂薄膜对体外培养的牛 LECs 的移行可产生一定的抑制作用 (表 2)。

表 2 划伤单层 LECs 后 24 h 和 48 h 各组细胞自划伤边缘的移行距离 ($\bar{x} \pm s$, mm)
Table 2 Migration distance of LECs in 24 and 48 hours after single layer scratching ($\bar{x} \pm s$, mm)

Group	n	Migration distance of LECs in different period	
		24 h	48 h
Unfilmed	11	0.644 4 ± 0.162 4	1.257 6 ± 0.501 8
TiO ₂	12	0.449 9 ± 0.086 2	0.829 4 ± 0.153 5
t		3.633	2.821
P		0.002	0.010

$F_{\text{group}} = 14.965, P = 0.000$; $F_{\text{time}} = 38.033, P = 0.000$; $F_{\text{interaction}} = 3.430, P = 0.071 1$ (ANOVA, LSD-t test)

3 讨论

白内障是主要的致盲性眼病之一, 尽管手术摘出联合 IOL 植入术能够使患者视力恢复, 但术后不同程度的眼内炎症反应及 PCO 的发生均可导致视力再次下降。目前, 许多学者致力于 IOL 材料及表面修饰的研究, 以提高 IOL 的生物相容性^[10-12], 从而减少术后

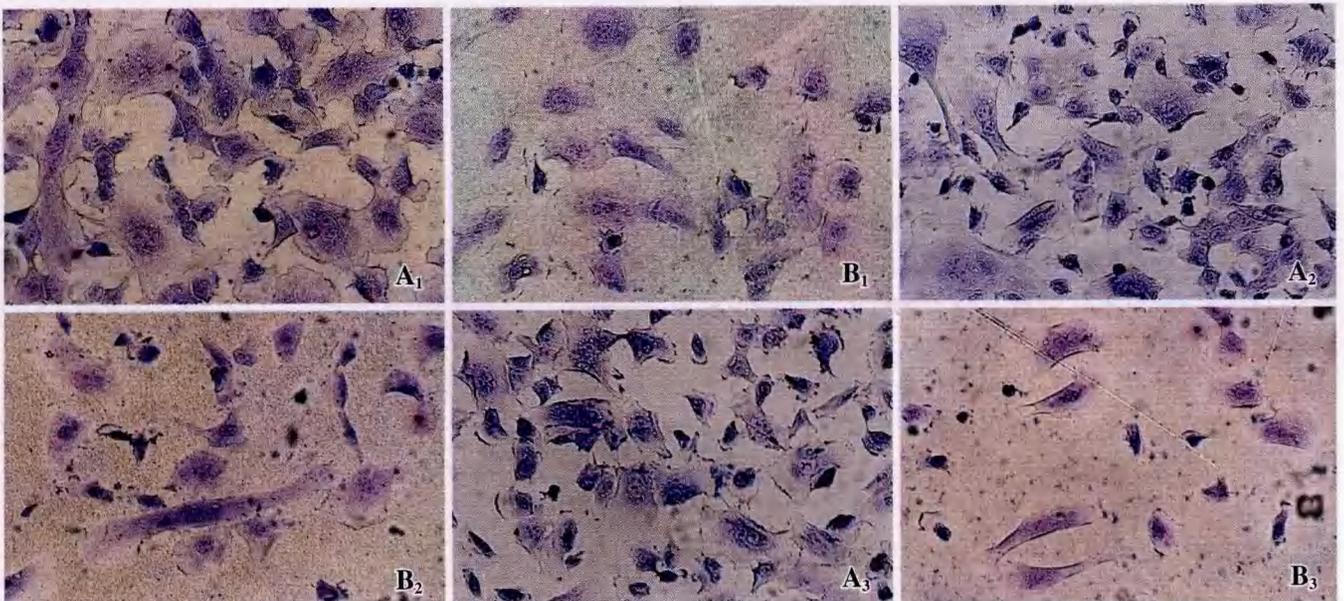


图 2 UVA 激发不同时间对照组载玻片上黏附的 LECs 较 TiO₂ 镀膜组增多, 细胞呈蓝紫色不规则形 (瑞特染色 × 200) A₁₋₃: 对照组载玻片表面所黏附的细胞 B₁₋₃: TiO₂ 镀膜组载玻片表面黏附的细胞 A₁、B₁: 预照时间为 0 min A₂、B₂: 预照时间为 20 min A₃、B₃: 预照时间为 40 min
Fig. 2 Numbers of LECs adhered on the unfilmed slides were more than those of filmed slides after exposure to UVA (Wright's staining × 200) A₁: LECs exposed to UVA for 0 min A₂: LECs exposed to UVA for 20 min A₃: LECs exposed to UVA for 40 min B₁₋₃: LECs adhered on the filmed slide (LECs present amethyst irregular shape)

并发症的发生。IOL 生物相容性优劣的指标包括 PCO、前囊膜混浊 (anterior capsular opacification, ACO) 的发生率, LECs 的增生, 晶状体前表面的细胞反应, Nd:YAG 激光晶状体后囊膜切开率等^[13]。因此人们期望通过对 IOL 进行表面修饰, 以起到减少 LECs 及炎性细胞在 IOL 上的黏附、增生、移行, 从而降低白内障摘出联合 IOL 植入术后 PCO、ACO 及眼内炎症反应的发生率。

TiO₂ 纳米光催化剂具有光催化氧化及光生超亲水特性, 目前大量研究已证实纳米 TiO₂ 的光催化氧化作用能够对多种肿瘤细胞及体外培养的牛 LECs 产生明显的杀伤作用^[1-3]; 但是其光生亲水性能否对细胞的黏附及移行产生一定的影响尚未得到证实。

亲水性是影响 IOL 生物相容性的重要理化特性, 其与 LECs 及炎性细胞等在 IOL 表面的黏附密切相关。亲水性常用接触角表征, 接触角是指在一固体水平面上滴一液滴, 固体表面上的固-液-气三相交界点处, 其气-液界面和固-液界面两切线把液相夹在其中时所成的角^[14]。接触角越小, 亲水性越好, 则 IOL 的生物相容性越好。本实验对 TiO₂ 薄膜接触角进行了测量, 结果显示未镀有 TiO₂ 纳米光催化剂薄膜的玻片接触角为 $15.8^\circ \pm 2^\circ$, 而镀有 TiO₂ 纳米光催化剂薄膜的载玻片接触角小至仪器无法测出, 说明纳米 TiO₂ 薄膜可以改变载玻片的亲水性, 产生超亲水状态, 从而改善了物体表面的生物相容性。

镀有 TiO₂ 薄膜的载玻片在具有了良好的超亲水状态之后能否对 LECs 的黏附和移行产生影响呢? 本实验通过体外培养的牛 LECs 在镀有 TiO₂ 薄膜的载玻片及未镀有 TiO₂ 的载玻片上对细胞黏附数及划伤后细胞移行距离进行了研究, 发现对照组表面细胞黏附数明显多于 TiO₂ 镀膜组, 差异有统计学意义 ($P = 0.000$), 因此, 可以认为纳米 TiO₂ 薄膜能够明显地减少牛 LECs 在载玻片上的黏附。同时, 细胞迁移实验 (划痕法) 也显示: 镀有 TiO₂ 薄膜的载玻片细胞移行最远距离明显小于对照组 ($P = 0.000$), 说明纳米 TiO₂ 薄膜能够明显抑制牛 LECs 在载玻片上的移行。TiO₂ 对细胞黏附和移行的抑制作用机制可能是由于受光激发后纳米 TiO₂ 薄膜表面结构发生了变化, 具体表现为在适当能量的光线激发下, TiO₂ 价电子被激发到导带, 电子和空穴向 TiO₂ 表面迁移, 在表面形成电子-空穴对, 电子与钛发生反应, 将四价钛阳离子还原为三价; 同时空穴氧化超氧阴离子 (O_2^-) 形成氧空位。随后水分子占据了这些氧空位, 成为化学吸附水 (表面羟基 OH^-), 一方面使 TiO₂ 薄膜表面产生超亲水特性; 另一方面, 由于 OH^- 带有负电荷, 可使 TiO₂ 薄膜表面带有负电荷。而在正常 pH 值时, 细

胞也带负电荷, 因此, 二者可形成静电屏障^[15-16]。超亲水性和静电屏障均可能在抑制细胞黏附和移行过程中发挥重要作用。

本实验利用 TiO₂ 纳米光催化氧化及光生超亲水特性, 改变载玻片的表面特征, 获得超亲水性和减少牛 LECs 的黏附并抑制细胞移行, 提示可以通过纳米 TiO₂ 对 IOL 的表面修饰改善其生物相容性。

本实验的 TiO₂ 薄膜是采用溶胶-凝胶法制备, 其中要经过 300~500℃ 的热处理增加膜的稳定性, 而目前的 IOL 材料均不耐热, 这需要采用低温制备的方法获得 TiO₂ 修饰的 IOL, 其膜的厚度、颗粒尺寸、表面性状及稳定性等尚需进一步研究。

参考文献

- Chihara Y, Fujimoto K, Kondo H, et al. Anti-tumor effects of liposome-encapsulated titanium dioxide in nude mice [J]. *Pathobiology*, 2007, 74(6): 353-358
- Zhang AP, Sun YP. Photocatalytic killing effect of TiO₂ nanoparticles on Ls-174-t human colon carcinoma cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, 10(21): 3191-3193
- 单玫, 翁景宁. TiO₂ 纳米光催化剂薄膜对人工晶状体表面修饰作用及其意义 [J]. *眼科新进展*, 2008, 28(6): 407-411
- 胡建石, 翁景宁, 郑志斌. 成年牛晶状体上皮细胞培养、冻存与复苏 [J]. *上海实验动物科学*, 2002, 22(4): 223-226
- Kim MK, Park IS, Park HD, et al. Effect of poly(ethylene glycol) graft polymerization of poly(methyl methacrylate) on cell adhesion. In vitro and in vivo study [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2001, 27(5): 766-774
- Yamakawa N, Tanaka T, Shigeta M, et al. Surface roughness of intraocular lenses and inflammatory cell adhesion to lens surfaces [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2003, 29(2): 367-370
- Oertel M, Graness A, Thim L, et al. Trefoil factor family-peptides promote migration of human bronchial epithelial cells: synergistic effect with epidermal growth factor [J]. *Am J Respiratory Cell Mol Biol*, 2001, 25(4): 418-424
- Pennisi PA, Barr V, Nunez NP, et al. Reduced expression of insulin-like growth factor I receptors in MCF-7 breast cancer cells leads to a more metastatic phenotype [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(22): 6529-6537
- 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 2004: 219-220
- Barbour W, Saika S, Miyamoto T, et al. Biological compatibility of polymethyl methacrylate, hydrophilic acrylic and hydrophobic acrylic intraocular lenses [J]. *Ophthalmic Res*, 2005, 37(5): 255-261
- Tanaka T, Shigeta M, Yamakawa N, et al. Cell adhesion to acrylic intraocular lens associated with lens surface properties [J]. *J Cataract Refract Surg*, 2005, 31(8): 1648-1651
- Yan Q, Perdue N, Sage EH. Differential responses of human lens epithelial cells to intraocular lenses in vitro: hydrophobic acrylic versus PMMA or silicone discs [J]. *Graefes' Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2005, 243(12): 1253-1262
- 程冰. 后房型人工晶状体材料的生物相容性 [J]. *中华眼科杂志*, 2006, 42(4): 369-372
- Schroeder AC, Lingenfelder C, Seitz B, et al. Impact of fibronectin on surface properties of intraocular lenses [J]. *Graefes' Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009, 247(9): 1277-1283
- 高铁, 钱朝勇, 于向阳. TiO₂ 表面超亲水性 [J]. *材料导报*, 2000, 11(7): 27-29
- 袁佳琴, 孙慧敏, 徐延山, 等. 氟-肝素表面修饰人工晶状体的实验研究 [J]. *眼科新进展*, 2003, 23(3): 153-156

(收稿: 2009-02-20 修回: 2009-10-16)

(本文编辑: 尹卫靖)