

二氧化钛催化超声波损伤牛血清白蛋白的研究

王君^{*1} 赵红丹¹ 张朝红² 张邯玉¹ 熊大珍¹ 张向东¹ 孙伟¹ 栗荣贺¹

(¹ 辽宁大学化学系, 沈阳 110036)

(² 辽宁大学环境系, 沈阳 110036)

摘要: 利用紫外可见(UV-Vis)光谱和荧光(FL)光谱研究了二氧化钛(TiO₂)催化超声波照射对牛血清白蛋白(BSA)的损伤作用,同时对金红石型和锐钛矿型 TiO₂ 的催化性能进行了比较,并探讨了照射时间, TiO₂ 加入量, 溶液酸度, 超声波功率和离子强度等因素对 BSA 分子损伤的影响。结果表明, 金红石型 TiO₂ 的催化效果明显好于锐钛矿型 TiO₂。在一定条件下, BSA 分子的损伤程度随着照射时间的延长、照射功率和溶液酸度的增大而增大, 而 TiO₂ 的加入量和离子强度对 BSA 分子损伤的影响则较为复杂。

关键词: 超声; 二氧化钛; 损伤; 牛血清白蛋白

中图分类号: O614.41⁺; O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2007)03-0439-06

Ultrasonic Damage of Bovine Serum Albumin in the Presence of Titanium Dioxide

WANG Jun^{*1} ZHAO Hong-Dan¹ ZHANG Zhao-Hong² ZHANG Han-Yu¹ XIONG Da-Zhen¹

ZHANG Xiang-Dong¹ SUN Wei¹ LI Rong-He¹

(¹Chemical Department, Liaoning University, Shenyang 110036)

(²Environmental Department, Liaoning University, Shenyang 110036)

Abstract: The damage of bovine serum albumin (BSA) under the ultrasound irradiation in the presence of titanium dioxide (TiO₂) was studied by means of ultraviolet-visible (UV-Vis) and fluorescence (FL) spectroscopy, and the catalytic performance of rutile and anatase TiO₂ was compared. Furthermore, the effects of several factors including the irradiation time, the TiO₂ addition, solution acidity, ultrasound power and ionic strength on the damage of BSA molecule were also discussed. The results showed that the catalytic performance of rutile TiO₂ was obviously better than that of anatase TiO₂. It was found that under a certain condition, the damage degree of BSA molecule became more serious with the increase of the irradiation time and ultrasound power, while the influences of the TiO₂ addition, ionic strength and solution acidity were complicated.

Key words: ultrasound; titanium dioxide; damage; bovine serum albumin

TiO₂ 因其化学性质稳定、价廉易得、本身对人体无毒性及催化效率高等优点近些年来倍受人们青睐。并且 TiO₂ 具有较深的价带能级, 当用能量大于 TiO₂ 能带隙的光照射到其表面时, 会产生具有很强氧化和还原能力的空穴和电子, 这些空穴和电子遇 H₂O 会产生氧化性很强的·OH 自由基, 可以推动多

种化学反应的发生。且 TiO₂ 颗粒可以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副作用^[1,2]。于是, TiO₂ 光催化抗肿瘤的方法引起了人们的注意。但这种方法也暴露出一定的缺陷, 即由于紫外光在生物组织内的穿透能力有限, 一般只能达到几毫米, 对于人体内深部肿瘤, 需要借助光学纤

收稿日期: 2006-10-30。收修改稿日期: 2006-12-25。

国家自然科学基金资助项目(No. 20371023)和辽宁省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2004C018)。

*通讯联系人。E-mail: wangjun890@126.com

第一作者: 王君, 男, 46岁, 教授, 博士; 研究方向: 无机材料和超声化学。

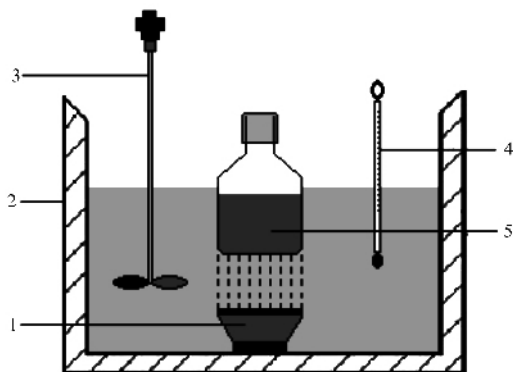
维等以达到治疗目的。超声波具有极强的穿透能力,对于水介质,其穿透能力一般也在 15~20 cm,且聚焦技术比较成熟,因此,采用超声波抑制肿瘤生长和破坏肿瘤细胞,尤其是治疗人体内深层组织肿瘤,已经引起国内外的普遍关注^[3]。另外,在某些情况下,光能催化的化学反应超声波也能胜任,如光动力化学疗法中所采用的光敏剂往往也适用于声动力化学疗法^[4-7]。因此,我们考虑用 TiO₂ 催化超声损伤生物分子来进行抗肿瘤的尝试。

在生物体中蛋白质是最重要的组成物质,各种蛋白质是生命活动的基础,例如:酶具有催化作用,抗体具有免疫作用,血浆蛋白具有运输作用,肌肉蛋白具有运动作用。如果 TiO₂ 催化超声波照射对蛋白质分子有损伤,那么就有可能造成自然情况下的细胞凋亡。因此,我们在分子水平上考察了 TiO₂ 催化超声波对牛血清白蛋白(BSA)的损伤,以求为进一步研究杀灭肿瘤细胞的方法奠定一定基础。

1 实验部分

1.1 仪器设备

超声照射装置,频率 40 MHz,功率为 0~50 W,昆山市超声仪器有限公司。如图 1 所示,实验过程中用温度计监测体系温度 (30.0±0.2 °C)。紫外-可见(UV-Vis)光谱仪,Lambda-17 型,美国 Perkin-Elmer 公司。荧光光谱仪,LS-45 型,美国 Perkin-Elmer 公司。台式高速离心机,80-2B,上海医用分析仪器厂)。



1: ultrasonic transducer; 2: water trough; 3: electromagnetic stirrer;
4: thermometer; 5: reaction solution

图 1 超声照射装置

Fig.1 ultrasonic irradiation setup

1.2 试剂

牛血清白蛋白(BSA,北京奥博星生物技术责任有限公司),使用时未经进一步纯化。在 0~4 °C 下溶于 Tris-HCl 缓冲溶液配成储备液,准确浓度由 278 nm

处的吸光度确定。储备液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 二氧化钛(TiO₂,微米级,金红石型和锐钛矿型,哈尔滨化工化学试剂厂);Tris-HCl 缓冲溶液的浓度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;实验用水为二次蒸馏水。其余均为市售分析纯试剂。

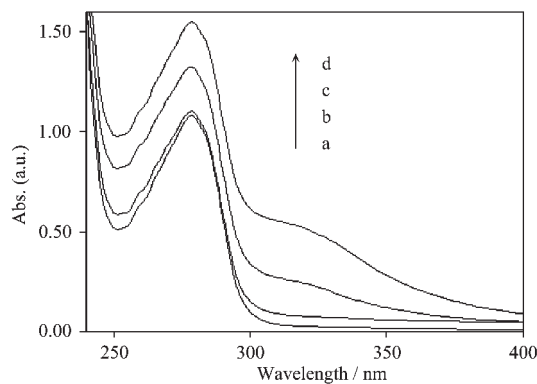
1.3 实验方法

取 4 个(分别标记为 a,b,c 和 d)容量瓶,准确量取浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液 6.25 mL 放入 a,b,c,d 中,其中 c 和 d 分别加入 0.05 g 活化后的锐钛矿型和金红石型 TiO₂,都用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 25.00 mL。溶液初始 pH 约为 7.0。将 b,c 和 d 放入超声照射装置中。照射 120 min 后取样,二次离心后测定 UV-Vis 光谱和 FL 光谱,以此判断 TiO₂ 与 BSA 的相互作用以及超声波结合 TiO₂ 对 BSA 分子的损伤作用。另外,改变照射时间、TiO₂ 加入量、溶液酸度、照射功率和离子强度等影响因素,考察这些因素对 BSA 分子损伤的影响。

2 结果与讨论

2.1 BSA 和 TiO₂ 相互作用及在超声波照射下的 UV-Vis 光谱与 FL 光谱

从图 2 可以看出,与原液(图 2 中 a)相比,在超声波作用下,加入金红石型 TiO₂ 的 BSA 溶液表现出明显的增色效应(图 2 中 d),加入锐钛矿型 TiO₂ 的 BSA 溶液也表现出一定程度的增色效应(图 2 中 c),但低于前者。而单纯超声波照射的 BSA 溶液只表现出微弱的增色效应(图 2 中 b)。



a: original solution; b: ultrasound only;
c: ultrasound + anatase TiO₂; d: ultrasound + rutile TiO₂.

图 2 不同条件下 BSA 溶液的 UV-Vis 吸收光谱
Fig.2 UV-Vis spectra of BSA solution at different conditions

BSA 溶液的 FL 光谱也证明了这一点。如图 3 所示,激发波长为 282 nm 时,BSA 溶液在 350 nm

处的荧光强度顺序从上到下依次为:原液,单纯超声,超声+锐钛矿型 TiO_2 和超声+金红石型 TiO_2 。荧光猝灭趋势与 UV-Vis 光谱的增色顺序一致。即 BSA 分子在单纯超声波作用下有一定的猝灭现象(图 3 中 b)。加入 TiO_2 后,荧光猝灭现象更加明显,而且金红石型 TiO_2 存在时的荧光猝灭(图 3 中 d)要比锐钛矿型 TiO_2 存在时强烈(图 3 中 c)。

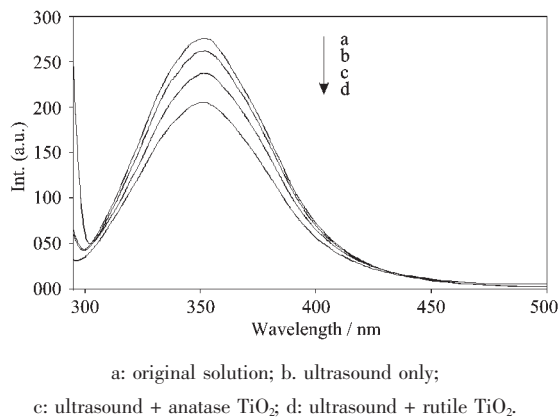


图 3 不同条件下 BSA 溶液的 FL 光谱

Fig.3 Fluorescence spectra of BSA solution at different conditions

UV-Vis 光谱产生增色效应的原因主要是超声波激发 TiO_2 产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基,进攻 BSA 分子中的二硫键,氧化硫原子,使二硫键断裂,导致 BSA 分子二级结构的破坏,使芳香环暴露,吸光度增强^[8]。

2.2 超声波照射时间对 BSA 损伤作用的影响

准确量取 3 份浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BSA 溶液 12.50 mL,用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 50.00 mL,溶液初始 pH 约为 7.0。1 份为空白,另 2 份分别加入 0.05 g 活化后的金红石型和锐钛矿型 TiO_2 ,超声照射

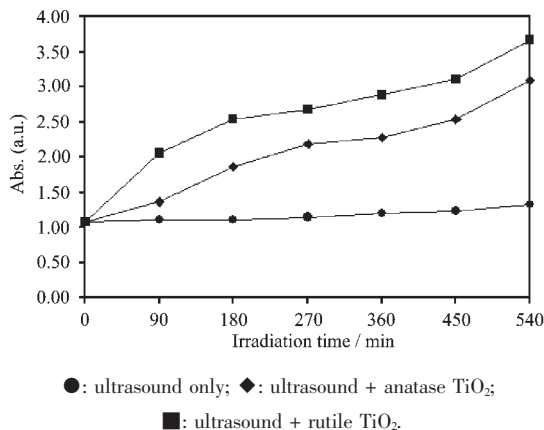


图 4 不同照射时间时 BSA 溶液的吸光度变化

Fig.4 Changes of absorbance of BSA solutions with irradiation time

时间分别为 0,90,180,270,360,450 和 540 min,在时间点取样离心后测其 278 nm 处的吸光度。结果如图 4。

从图 4 可以看出,随着照射时间的延长,BSA 溶液在单纯超声波照射下其吸光度无明显变化,加入 TiO_2 后则呈现出明显的增色效应,而且加入金红石型 TiO_2 的 BSA 溶液的吸光度一直高于加入锐钛矿型 TiO_2 的吸光度。这说明虽然超声波照射激活金红石型和锐钛矿型 TiO_2 都产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基,但前者的数目要远远大于后者。照射时间愈长,对 BSA 分子的损伤也就越大。

2.3 TiO_2 加入量对 BSA 损伤作用的影响

BSA 溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,都用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 50.00 mL,溶液初始 pH 值约为 7.0。改变(活化后的金红石型和锐钛矿型) TiO_2 的加入量分别为 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0 和 2.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,超声波照射 100 min 后,测定 278 nm 处吸光度,考察 TiO_2 加入量对 BSA 分子损伤的影响。结果见图 5。

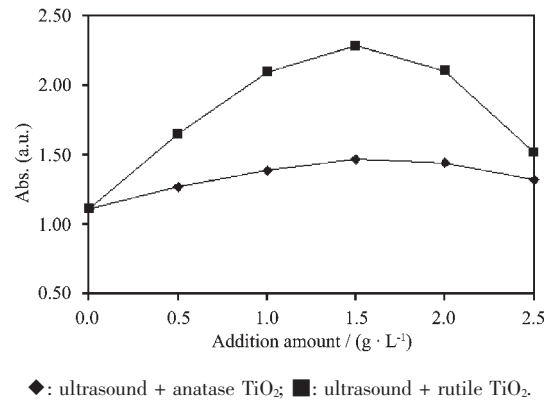


图 5 不同 TiO_2 加入量时 BSA 的吸光度变化

Fig.5 Changes of absorbance of BSA solutions with different TiO_2 added

从图 5 可以看出,随着 TiO_2 的加入,BSA 溶液的吸光度不断上升,在 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时吸光度达到最大,说明损伤程度达到最大。当加入量超过 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,增色效应开始减弱,其原因可能是催化剂用量过大, TiO_2 粒子彼此遮蔽,不能有效发挥催化作用。另外, TiO_2 吸附量的加大也是原因之一。

2.4 溶液初始 pH 值对 BSA 损伤作用的影响

人体正常组织液的 pH 值为 7.35~7.45,而在细胞发生癌变时,周围微环境内组织液的 pH 值会发生微小的改变(pH 值约为 6.90),比正常组织液的 pH 稍低。考虑上述因素,通过改变 Tris 和 HCl 的比例,调节 BSA 溶液的 pH 值分别为 5.0、6.0、7.0、8.0 和

9.0, 考察溶液酸度对 BSA 分子损伤的影响。BSA 溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 都用相应 pH 值的 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 50.00 mL, 分别加入 0.05 g 活化后的金红石型和锐钛矿型 TiO_2 , 超声波照射 100 min 后, 测定 278 nm 处吸光度。结果见图 6。

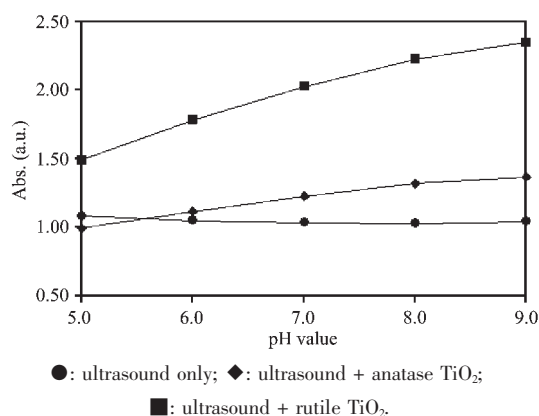


图 6 不同 pH 值时 BSA 的吸光度变化

Fig.6 Changes of absorbance of BSA solutions with different pH values

从图 6 可以看出, 单纯超声波照射时, 酸度对 BSA 溶液的吸光度影响不大, 说明单纯超声波照射不会引起 BSA 分子 α -螺旋结构的大幅度转变。加入 TiO_2 后, BSA 溶液的吸光度表现出明显的增色效应。这是因为, TiO_2 的等电点高于 BSA 的等电点, 这导致在很宽的酸度范围内 BSA 分子表面带负电荷, 而 TiO_2 的表面带正电荷, 两者容易相互靠近。另外, Hoffman 机理认为, OH^- 可以充当价带空穴的捕获剂, 氩同位素实验和 ESR 研究也证明 OH^- 捕获空穴后形成 $\cdot\text{OH}$ 自由基^[9]。因此, 碱性溶液中过多的 OH^- 在超声波和 TiO_2 联合作用下产生更多的 $\cdot\text{OH}$ 自由基。 $\cdot\text{OH}$ 自由基切断 BSA 分子中的二硫键从而削弱氢键作用, 同时碱的加入会破坏 BSA 分子中的盐键, 起到协同破坏 α -螺旋结构的作用。综上所述, 碱的加入使 α -螺旋的二级结构遭到更严重的破坏, 更多的芳香环暴露出来, UV-Vis 光谱的增色效应更加显著。与前述一致, 金红石型 TiO_2 催化下的 BSA 分子的吸收峰明显高于加入锐钛矿型 TiO_2 。

2.5 超声波功率对 BSA 损伤作用的影响

BSA 溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 50.00 mL, 溶液初始 pH 值约为 7.0, 分别加入 0.05 g 活化后的金红石型和锐钛矿型 TiO_2 , 改变超声波功率分别为 20、30、40 和 50 W, 超声照射 100 min 后, 测定其 278 nm 处吸光度, 考察超声波功率对 BSA 分子损伤的影响, 结果见图 7。

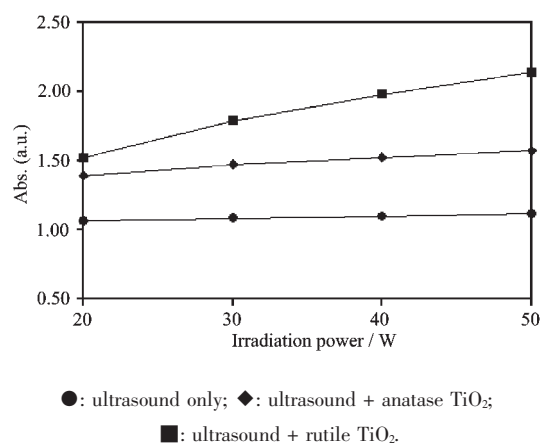


图 7 不同功率时 BSA 的吸光度变化

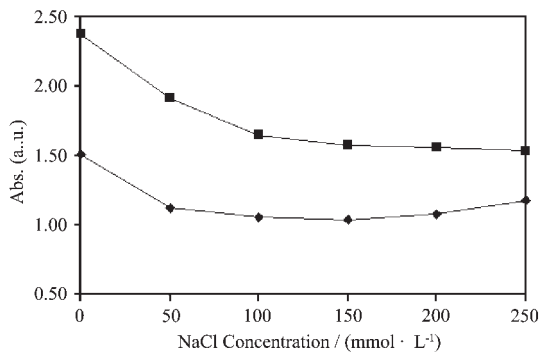
Fig.7 Changes of absorbance of BSA solutions with different ultrasound power

从图 7 可以看出, 随着超声波功率的增加, BSA 溶液的增色效应明显增加。这是由于在一定频率超声波作用下, 当超声波强度(功率与辐照面积之比)小于空化阈声压时, 较难产生空化作用。但超声波强度增加到一定程度, 即达到或超过空化阈声压时, 就很容易产生空化气泡, 而且空化泡的溃陷也更为猛烈。因此, 随着超声功率增加, 空化效应增强, 产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力加强, 对 BSA 分子的损伤也更严重。与单纯超声波照射相比, 金红石型和锐钛矿型 TiO_2 催化时 BSA 增色效应更为明显, 且前者要高于后者。

2.6 溶液离子强度对 BSA 损伤作用的影响

Na^+ 和 K^+ 在人体内共同调整细胞与血液之间的容量、渗透压和酸碱平衡, 对维持细胞的正常结构和功能起着非常重要的作用。 Ca^{2+} 作为第二信使, 在细胞凋亡的信号传导过程中起着重要的作用^[10]。人体血清内 3 种离子浓度正常值大概是 Na^+ : $140.50 \pm 5.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; K^+ : $4.60 \pm 1.00 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; Ca^{2+} : $2.40 \pm 0.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[11,12]。随着病变的发生, 这些离子的含量和比例会发生相应的变化。因此, 有必要考察这些离子不同浓度时 TiO_2 催化超声波对 BSA 分子的损伤情况。

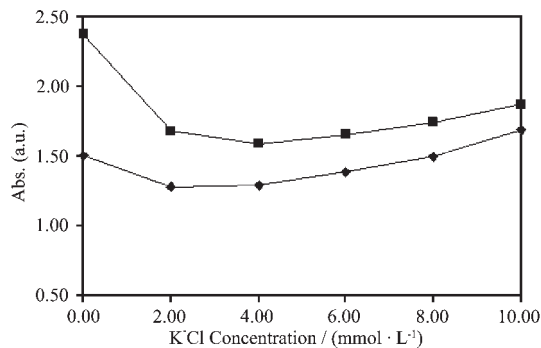
BSA 溶液浓度为 $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释至 50.00 mL, 溶液初始 pH 值约为 7.0, 分别加入 0.05 g 活化后的金红石型和锐钛矿型 TiO_2 , 改变 NaCl、KCl 和 CaCl_2 的浓度。NaCl 的浓度变化范围为 0, 50, 100, 150, 200 和 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; KCl 和 CaCl_2 的浓度变化范围为 0, 2, 4, 6, 8 和 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。超声照射 100 min 后, 测定 278 nm 处吸光度, 结果见图 8, 9 和 10。



◆: ultrasound + anatase TiO₂; ■: ultrasound + rutile TiO₂.

图8 BSA溶液的吸光度随NaCl浓度的变化

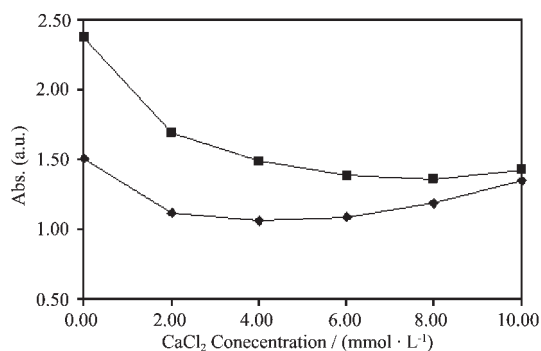
Fig.8 Changes of absorbance of BSA solutions with NaCl concentration



◆: ultrasound + anatase TiO₂; ■: ultrasound + rutile TiO₂.

图9 BSA溶液的吸光度随KCl浓度的变化

Fig.9 Changes of absorbance of BSA solutions with KCl concentration



◆: ultrasound + anatase TiO₂; ■: ultrasound + rutile TiO₂.

图10 BSA溶液的吸光度随CaCl₂浓度的变化

Fig.10 Changes of absorbance of BSA solutions with CaCl₂ concentration

从图8可以看出,BSA溶液在278 nm处的吸光度随NaCl浓度的增加而逐渐降低,这说明Na⁺的浓度低于正常值时,超声波结合TiO₂对BSA分子的损伤较为明显。但对于K⁺和Ca²⁺离子的情况,其变化

趋势却有所不同。从图9和图10可以看出,低浓度时,两者对BSA分子的损伤都较为明显。但在超过它们的正常值时,对于K⁺离子,损伤程度呈现出上升趋势,而对于Ca²⁺离子则相对呈现出下降趋势。不同的离子种类和强度对超声波结合TiO₂对BSA分子的损伤有不同的影响,由此可以获得提示,通过改变不同的离子浓度,可以控制超声波结合TiO₂对BSA分子损伤的程度。

2.7 TiO₂催化超声波损伤BSA机理的探讨

蛋白质分子因为有特定的三维结构而表现出各种生物活性。维持蛋白质空间构象的作用力主要有氢键、二硫键、疏水键、盐键和范德华力等。其中二硫键为共价键,结合比较牢固,对于稳定蛋白质的空间结构十分重要。 α -螺旋是其二级结构的主要形式。在 α -螺旋中,氨基酸残基的侧链伸向外侧,肽键中电负性很强的氮原子上的氢和在它后面的第4个残基的羰基氧形成链内氢键。所有肽键都能参与形成链内氢键, α -螺旋的稳定性就靠这种氢键维持。BSA为球状蛋白,疏水作用的存在使分子中疏水性较强的氨基酸残基的侧链避开水相彼此粘附在一起,在分子内部形成空穴,同时又使亲水性侧链留在分子表面。超声波照射激发TiO₂产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基会进攻BSA分子中的二硫键,氧化硫原子使二硫键断裂,导致BSA分子空间结构的破坏,同时又改变BSA分子周围微环境的酸碱性,进而削弱BSA分子中的氢键。随着维系 α -螺旋的氢键作用的削弱, α -螺旋含量减少,同时肽链伸展,包裹在分子内部的疏水性氨基酸(如色氨酸和酪氨酸等)残基暴露出来,导致BSA生物活性的丧失。而且,任何一个蛋白质在其自然状态或活性形式下,都具有特征而稳定的三维结构(空间结构和立体结构),一旦这种专一的空间结构遭到破坏,即使化学结构完全不变,蛋白质的功能也会立即消失^[13]。

对TiO₂催化超声波损伤机理的解释目前有两种观点可以被接受,即声致发光机理和高热激发机理。声致发光可以由超声波使水中的照相底片感光这一实验事实证明^[14]。水溶液中的光可以使TiO₂粉末发挥光催化剂的作用,激发价带上的电子跃迁到导带,从而在价带产生空穴。导带上的电子和价带上的空穴分别与吸附在TiO₂表面的O₂和H₂O反应生成氧化性极强的O₂⁻和OH自由基。另外,超声波由于空化效应在水中产生的“热点”高达几千K,本身就可以使水分子产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基,但效率极低^[15]。

TiO₂ 催化剂获得这部分能量后导致氧原子逃离晶格而产生空穴,同样可以导致·OH 自由基生成^[16]。

3 结 论

在超声波照射下 TiO₂ 产生·OH 自由基,可以破坏 BSA 分子的结构,导致其损伤。损伤程度随着照射时间的延长和照射功率以及溶液酸度的增加而增大,且金红石型 TiO₂ 的催化效果好于锐钛矿型 TiO₂。而 TiO₂ 的加入量及离子强度对 BSA 损伤的影响则有待进一步研究。如果 TiO₂ 催化超声波对蛋白质分子有损伤,那么就有可能造成自然情况下的肿瘤细胞的凋亡,在深入研究的基础上,或许不失为一种可行的肿瘤治疗方法,为声动力化学疗法治疗肿瘤奠定基础。

参 考 文 献:

- [1] Cai R X, Kubota Y, Shuin T, et al. *Cancer Research*, **1992**, **52**:2346~2352
- [2] Kubota Y, Shuin T, Kawasaki C, et al. *Cancer*, **1994**, **70**:1107~1112
- [3] Chen L, Rivens I, ter Haar G., et al. *Ultrasound Med. & Biol.*, **1993**, **19**(1):67~74
- [4] Okamoto K, Yamamoto Y, Tanaka H, et al. *Chem. Soc. Jpn.*, **1985**, **58**:2023~2029
- [5] Augugliaro V, Plamisanò L, Schiavello M, et al. *Appl. Catal.*, **1991**, **69**:323~328
- [6] Tseng J M, Huang C P. *Water Sci. Technol.*, **1991**, **23**:377~381
- [7] Abdulah M, Low G K, Matthews R W. *J. Phys. Chem.*, **1990**, **94**:6820~6827
- [8] Hidaka H, Hirikoshi S, Ajisaka K, et al. *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1997**, **108**:197~205
- [9] Yue Lin-Hai (岳林海), Zhou Yong-Qiu (周永秋). *Huanjing Wuran Yu Fangzhi(Enviromental Pollution and Prevention)*, **1998**, **20**(3):5~8
- [10] Yuan Xiao-Jun(袁晓军), Liu Yu-Feng(刘玉峰). *Shiyong Erke Linchuang Zazhi(Pratical Paediatric Clinic Magazine)*, **1998**, **13**(2): 117~119
- [11] Guan Deng-Ming(关德明), Zhang Shu-Fen(张淑芬). *Haerbin Yike Daxie Xuebao(Journal of Haerbin Medical University)*, **1998**, **6**(32):433~435
- [12] LI Zeng-Xi, LOU Man-Teng, LI Xiao, et al. *Guangdong Weiliang Yuansu Kexue(Guangdong Microelement Science)*, **1999**, **6**(12):1~14
- [13] WANG Da-Cheng (王大成). *Protein Engineering (蛋白质工程)*. Beijing: Science Industry Press, **2000**. 1
- [14] Al-Ekabi H, Serpone N. *J. Phys. Chem.*, **1988**, **92**:5726~5735
- [15] Kruus P, Burk R, Entezari M. *Ultrasonics Sonochem.*, **1997**, **4**(3):229~233
- [16] Augugliaro V, Palmisano L, Sclafani A, Minero C, et al. *Toxicol Environ. Chem.*, **1988**, **16**(2):89~96