

# 异质金属调控下医用镁的氢气释放对 肿瘤细胞的影响

姜浩淼<sup>1</sup>, 咎睿<sup>1</sup>, 彭宏州<sup>1</sup>, 孙钰<sup>1</sup>, 张小农<sup>1</sup>, 锁涛<sup>2</sup>, 王坚<sup>3</sup>

(1.上海交通大学 材料科学与工程学院 金属基复合材料国家重点实验室, 上海 200240;

2. 复旦大学附属中山医院, 上海 200032;

3. 上海交通大学附属第六人民医院 肝胆胰外科, 上海 200233)

**摘要:** **目的** 通过异质金属引发的电偶腐蚀效应, 引起高纯镁在不同程度上的氢气释放, 达到不同程度的抗肿瘤效应。**方法** 将高纯镁 (Mg) 与镁合金 (AZ91)、纯钛 (TA2)、不锈钢 (316L) 分别连接。在 37 °C 水浴环境、PBS 溶液环境中, 通过电化学工作站测定了高纯镁的开路电位和极化曲线, 同时, 通过浸泡试验测定了析氢曲线。最后, 在体外研究了不同异质金属调控下, 高纯镁的不同氢气释放量对 Cal-62 肿瘤细胞系的生物学效应, 包括氢气对肿瘤细胞的抑制增殖、促进凋亡和阻滞细胞周期的影响。**结果** 三种金属都引起了不同程度的极化作用, 且极化作用越强, 高纯镁的开路电位、腐蚀电位和腐蚀电流密度越大, 试样的析氢量也随之增多。氢气释放 48 h 后, 显著抑制了 Cal-62 肿瘤细胞的增殖, 抑制率最高可达 55%。一方面, 氢气能够促进肿瘤细胞凋亡; 另一方面, 氢气使肿瘤细胞 G0/G1 期比例增加, S 期比例减少, 将肿瘤细胞周期阻滞在 G0/G1 期, 且随着氢气释放量增多, 凋亡和阻滞周期的作用更为显著。**结论** 异质金属调控下, 能够通过引起高纯镁不同程度的腐蚀, 加速释放产生更多的氢气, 达到更为显著的抗肿瘤效应。

**关键词:** 生物可降解材料; 镁; 电偶腐蚀; 氢气; 肿瘤

**中图分类号:** TG146.2; R736.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-3660(2021)02-0022-08

**DOI:** 10.16490/j.cnki.issn.1001-3660.2021.02.003

## Effect of Hydrogen Released from Biomedical Magnesium Regulated by Dissimilar Metals on Tumor Cell

JIANG Hao-miao<sup>1</sup>, ZAN Rui<sup>1</sup>, PENG Hong-zhou<sup>1</sup>, SUN Yu<sup>1</sup>,  
ZHANG Xiao-nong<sup>1</sup>, SUO Tao<sup>2</sup>, WANG Jian<sup>3</sup>

(1. National Key Laboratory of Metal Matrix Composites, School of Materials Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong

收稿日期: 2021-01-09; 修订日期: 2021-01-18

Received: 2021-01-09; Revised: 2021-01-18

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1106600); 上海市科学技术委员会支撑项目 (19441905600); 上海交通大学医工交叉基金项目 (ZH2018ZDA09)

**Fund:** Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1106600), the Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (19441905600), the Shanghai Jiao Tong University Interdisciplinary (Biomedical Engineering) Research Fund (ZH2018ZDA09)

作者简介: 姜浩淼 (1996—), 男, 硕士, 主要研究方向为医用镁的降解。

**Biography:** JIANG Hao-miao (1996—), Male, Master, Research focus: degradation of biomedical magnesium.

通讯作者: 张小农 (1969—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为可降解金属材料及器械研发。邮箱: xnzhang@sjtu.edu.cn

**Corresponding author:** ZHANG Xiao-nong (1969—), Male, Doctor, Associate professor, Research focus: R&D of biodegradable metals and devices. E-mail: xnzhang@sjtu.edu.cn

引文格式: 姜浩淼, 咎睿, 彭宏州, 等. 异质金属调控下医用镁的氢气释放对肿瘤细胞的影响[J]. 表面技术, 2021, 50(2): 22-29.

JIANG Hao-miao, ZAN Rui, PENG Hong-zhou, et al. Effect of hydrogen released from biomedical magnesium regulated by dissimilar metals on tumor cell[J]. Surface technology, 2021, 50(2): 22-29.

University, Shanghai 200240, China; 2.Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200032, China;

3.Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200233, China)

**ABSTRACT:** Different degrees of anti-tumor effect by hydrogen release from high purity magnesium (Mg) through galvanic corrosion induced by dissimilar metals can be achieved. High-purity Mg was connected to Mg alloy AZ91, pure titanium TA2 and stainless steel 316L respectively. The open circuit potential and polarization curve of high-purity Mg were measured by electrochemical workstation in PBS solution under 37 °C water bath condition, and hydrogen evolution curve was measured by immersion experiment under the same conditions. Finally, the biological effects of different amounts of hydrogen released by high-purity Mg under the regulation of dissimilar metals on Cal-62 tumor cell line were studied *in vitro*, including the effects of hydrogen on proliferation, apoptosis and cycle of tumor cells. It was found that the three metals cause different degrees of polarization. The open circuit potential, corrosion potential and corrosion current density of high purity Mg all increased with the increase of polarization, which caused more significant hydrogen evolution in the meantime. 48 hours after the release of hydrogen, the proliferation of Cal-62 tumor cells was significantly inhibited, up to 55%. On the one hand, hydrogen could promote apoptosis of tumor cells. On the other hand, hydrogen could increase the proportion of cells in G0/G1 phase and decrease the proportion of cells in S phase, arresting the cell cycle of tumor cells in G0/G1 phase. As the amount of hydrogen released increased, the effects of promoting apoptosis and arresting the cell cycle were more significant. Under the control of these three dissimilar metals, Mg can accelerate the release of more hydrogen through different degrees of corrosion, and achieve a more significant anti-tumor effect.

**KEY WORDS:** biodegradable materials; Mg; galvanic corrosion; hydrogen; tumor

癌症已经成为一个世界性的重大公共卫生问题，近年来，由于检测手段的成熟，甲状腺癌的检测发病率在全球范围内持续上升。这已经成为女性中第六常见的癌症，所有人类中第十常见的癌症，在过去一年中，新增超过 52 000 例新病例<sup>[1]</sup>。在临床上，甲状腺癌有多种表现形式，包括较低概率产生恶性病变的甲状腺结节，转移能力较差的甲状腺乳头状癌，能够通过血行转移到肺和骨头的低分化甲状腺癌，生长极为快速的未分化甲状腺癌。因此，目前治疗甲状腺癌患者的最大挑战是：找到治疗良性甲状腺肿瘤患者的轻度方案和治疗晚期或高危甲状腺癌患者的重度方案之间的平衡<sup>[2]</sup>。但是，目前对甲状腺癌的治疗方法通常为直接切除。为了改善这种相对“一刀切”的治疗方案，研发能够产生不同程度抑制肿瘤的药物或植入器械的方法就显得尤为必要。

近年来，由于镁优秀的生物相容性<sup>[3-6]</sup>、力学相容性<sup>[7]</sup>和生物可降解性<sup>[8-10]</sup>，使其在生物医用可降解材料的研究中成为热点。镁器械开始逐渐通过批准，能够在市面上销售使用<sup>[11-12]</sup>。许多研究表明，镁的降解产物能够干扰多种肿瘤细胞系的生长。Zhang 等<sup>[13]</sup>和 Chen 等<sup>[14]</sup>的体外研究表明，镁的腐蚀产物对骨肉瘤 U2-OS 细胞系和 MG-63 细胞系都有抑制增殖的作用。Qiao 等<sup>[15]</sup>研究了高纯镁丝的各种降解产物在一种卵巢癌 SKOV3 细胞系体内和体外的生物学效应。体内成像结果表明，镁丝植入荷瘤小鼠体内，可显著减少肿瘤体积，并且小鼠体重维持正常。这种抗肿瘤效应与镁金属降解产生的氢气关系密切。早在 1975

年，高压的氢气气体就首次成功用于治疗癌症<sup>[16]</sup>。2007 年，Ohasawa 等<sup>[17]</sup>发现氢气能够在不显著影响细胞正常生命活动的前提下，选择性还原羟基自由基（—OH），这是活性氧（ROS）中攻击性较强且对人体危害较大的一种。于是通过调控镁的降解速度，使氢气释放速度不同，产生不同程度的抗肿瘤效果，就成为一个可行的思路。

由于镁金属材料电位较负，与其他金属材料接触时，在腐蚀电位差的驱动下，加速了腐蚀速率，即产生电偶腐蚀的现象。当电极电位有一定差距的两种金属材料在电解质溶液环境中相互接触，形成能够导电通路时，两种材料中自腐蚀电位较负的一方成为阳极，腐蚀显著加剧。而电位较正的一方成为阴极，其电位越高，腐蚀越轻微<sup>[18-19]</sup>。因此，文将高纯镁与三种不同的金属（镁合金 AZ91、纯钛 TA2 和不锈钢 316L）直接连接，本研究这些异质金属对高纯镁析氢的影响及产生的抗肿瘤效应。

## 1 试验

以轧制态高纯镁板（纯度为 99.98%，具体成分见表 1）为原材料，线切割加工成 12 mm×10 mm×0.2 mm 的片状试样。将镁合金 AZ91、纯钛 TA2 和不锈钢 316L 三种金属板材用线切割加工成 10 mm×10 mm×1 mm 的片状试样。将所有试样用 800 目砂纸打磨，用无水乙醇超声清洗，干燥。将高纯镁试样与三种不同金属片分别用导线相连，形成电偶对后，一

表 1 高纯镁板化学成分  
Tab.1 Chemical compositions of high-purity magnesium plates

							wt %
Al	Si	Mn	Fe	Zn	Ti	Ni	Mg
0.001	0.002	0.002	0.002	0.002	<0.001	<0.0005	Bal.

并冷镶处理, 分别为 Mg&AZ91、Mg&TA2 和 Mg&316L 组。固定两种金属之间的距离, 并保证两种金属暴露在溶液中的面积一致。高纯镁片单独进行冷镶, 作为 Mg 组。冷镶液的各种化学成分比例如表 2 所示。室温下, 约 12 h 后, 冷镶液完全固化, 用 800 目砂纸再次将表面打磨干净, 用无水乙醇超声清洗并干燥后, 进行下一步的电化学测试和浸泡试验。

表 2 冷镶嵌溶液 (25 g) 中的化学成分

Tab.2 Chemical compositions in cold mounting and embedding solution of 25 g

Chemical component	Phenolic epoxy resin (E-51)	Dibutyl phthalate	Ethylene-diamine
g	20	3	2

电化学测试和浸泡试验均采用 PBS 缓冲溶液, 具体配方为: 氯化钠 (NaCl) 8.0063 g/L, 氯化钾 (KCl) 0.2013 g/L, 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 1.4196 g/L, 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 0.2722 g/L。

电化学测试过程为: 将各组试样在 37 °C 水浴的 100 mL PBS 缓冲溶液中分别浸泡 20 min 与 12 h, 取出后, 再放入新鲜的 PBS 缓冲溶液中。将 Mg 试样作为工作电极, 饱和 Hg/HgCl 作为参比电极, Pt 作为对电极, 构成三电极体系。利用电化学工作站 (CHI660E, 辰华), 首先测量了开路电位 (OCP), 测量时间为 300 s。然后对动电位极化曲线进行测量, 扫描区间为 -200~+800 mV(vs. OCP), 扫描速度为 0.5 mV/s。利用 Tafel 外推法, 在阴极极化区获得腐蚀电位  $E_c$  和腐蚀电流密度的对数  $\lg J_c$ 。

浸泡试验过程中, 将各组试样在同样的条件下浸泡 48 h。通过排水法测量 48 h 内氢气的释放量, 利用水素计 (ENH-1000, TRUSTLEX) 测定 48 h 内溶液中氢气浓度的变化情况。在每一个样品对应的溶液中, 都人为设定了三个测量点, 以比较全面地反映溶液中的溶氢量, 分别在高纯镁样品表面上方 2 mm 处, 阴极金属片样品表面上方 2 mm 处和溶液 50 mm 深处。

异质金属作用下的高纯镁电化学腐蚀和氢气释放特性表征结束后, 在 37 °C、5%  $\text{CO}_2$  环境下, 将 1 mL  $1 \times 10^5$  个/孔浓度的人甲状腺肿瘤 Cal-62 细胞悬液培养在六孔板细胞嵌入皿 (PET Transwell Insert, JET Biofil) 中。过夜贴壁后, 进行换液处理, 在下室中放入冷镶好的各组高纯镁及高纯镁连接金属片的电偶对样品, 并加入 5 mL PBS 缓冲溶液, 将氢气单独作用于 Cal-62 肿瘤细胞。为保证氢气持续释放, 对

下室 PBS 溶液进行换液处理, 每 8 h 一次。待氢气作用后, 分别进行细胞增殖、细胞凋亡和细胞周期试验。

在细胞增殖试验中, 氢气作用 24、48、72 h 后, 在避光条件下, 利用 CCK-8 试剂 (Dojindo), 通过酶标仪 (ELX-800, BioTek) 测试每个细胞嵌入皿溶液在 450 nm 波长处的吸光度 (OD 值)。OD 值与该皿中的细胞数量成正比。

在细胞凋亡试验中, 氢气作用 48 h 后, 用 -4 °C 预冷的 PBS 溶液洗涤细胞, 将细胞用不含 EDTA 的胰蛋白酶 (TRYPsin 0.25%, Corning Cellgro) 消化后, 利用 FITC/Annexin V 和 PI (Sony Biotechnology) 进行双染, 常温避光孵育后, 通过流式细胞仪 (CytoFLEX S, Beckman) 分析细胞凋亡状况。

在细胞周期试验中, 氢气作用 48 h 后, 用 -4 °C 预冷的 PBS 溶液洗涤细胞, 将细胞消化后, 用 -20 °C 预冷的 70% 乙醇固定过夜。测试前, 再次用预冷的 PBS 溶液洗涤, 重悬细胞。在室温、避光环境下, 用 PI/RNase 综合染剂 (BD Pharmingen) 进行单染, 避光孵育后, 通过流式细胞仪分析细胞周期。

## 2 结果与讨论

### 2.1 异质金属作用下高纯镁的电化学腐蚀特征

各组 Mg 试样在 PBS 溶液中浸泡 20 min 和 12 h 后的 OCP 曲线如图 1 所示。可以发现, Mg 试样连接异质金属片后的 OCP 发生了不同程度的提升, 从 20 min 到 12 h, 这种提升显著增大, 且保持着  $\text{Mg} < \text{Mg}\&\text{AZ91} < \text{Mg}\&\text{TA2} < \text{Mg}\&316\text{L}$  的趋势, 这是异质金属片的极化作用导致的。如果腐蚀电位分别是  $E_{c1}$  和  $E_{c2}$  的两种金属材料直接接触, 假设  $E_{c1} < E_{c2}$ , 那么对于  $M_1$  而言, 在  $M_2$  作用下,  $M_1$  的阳极电流增加, 电位正向移动, 阳极溶解反应加剧。经过足够长的时间以后, 两种金属材料产生耦合, 其构成的复相电极会有统一的电极电位, 位于  $E_{c1}$  和  $E_{c2}$  之间。

各组 Mg 试样在 PBS 溶液中浸泡 20 min 和 12 h 后的极化曲线如图 2 所示。将扫描区间起点定为 -200 mV(vs. OCP), 主要是因为强阴极极化条件下, 很有可能生成氢化镁产物<sup>[20]</sup>。在这种状况下, 不仅电流测量值会有额外增量, 氢化镁的生成也会导致镁金属表面状态的变化, 使测量值不够准确。

极化曲线上,  $\lg J$  最小的点对应的纵坐标为  $E_c$  值。

在阴极极化区曲线上纵坐标为-100 mV(vs. OCP)处作切线，获得阴极区的塔菲尔曲线。该切线上纵坐标为  $E_c$  值的点所对应的横坐标，表示该试样的腐蚀电流密度  $\lg J_c$ 。通常情况下，塔菲尔外推法的过程为：在表观极化曲线上确定强阴极极化区和强阳极极化区，这两条曲线近似为直线，通过拟合这两条直线，交点代表阴阳极的电流密度绝对值相等，外测电流为零，其对应的纵坐标和横坐标分别为腐蚀电位和腐蚀

电流密度。但是对于镁这种金属而言，当镁在阳极极化时，负差数效应会引起异常的析氢，影响测定真实阳极电流密度<sup>[21]</sup>。因此在本研究中，我们只用阴极极化相对较弱的区域拟合塔菲尔曲线。

各组 Mg 试样在 PBS 溶液中浸泡 20 min 和 12 h 后的  $E_c$  和  $\lg J_c$  统计在表 3 中。腐蚀电流密度的增大程度与腐蚀电位在极化作用下的增大程度一致，为  $Mg < Mg\&AZ91 < Mg\&TA2 < Mg\&316L$ 。

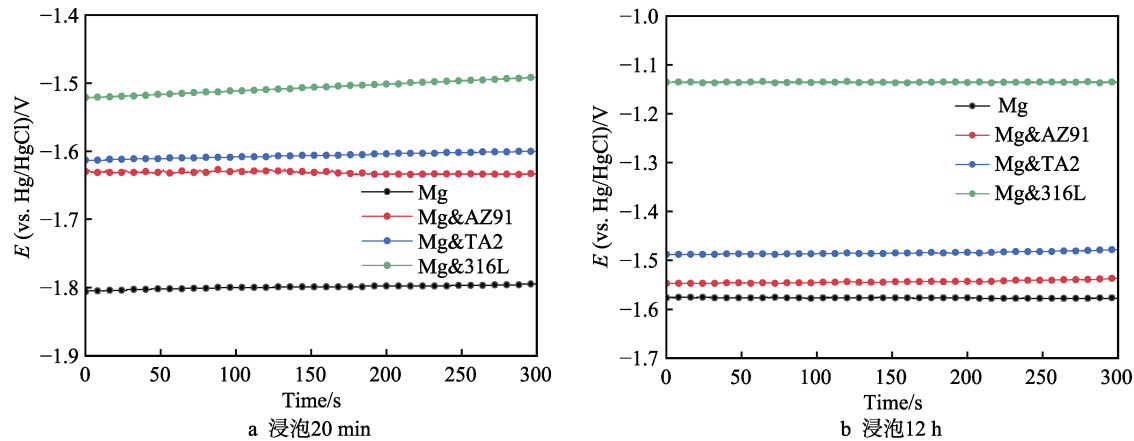


图 1 Mg 试样的 OCP 曲线  
Fig.1 OCP curves of Mg samples: a) soak for 20 min; b) soak for 12 h

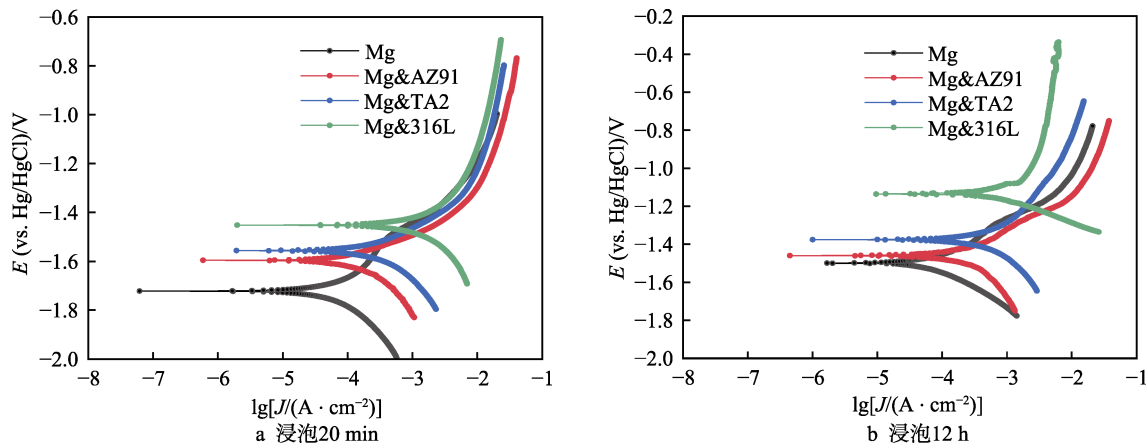


图 2 Mg 试样的极化曲线  
Fig.2 Polarization curves of Mg samples: a) soak for 20 min; b) soak for 12 h

表 3  $E_c$  和  $\lg J_c$  的数值统计

Tab.3 Statistics of  $E_c$  and  $\lg J_c$

Samples	$E_c/V$	$\lg[J_c/(A \cdot cm^{-2})]$	Samples	$E_c/V$	$\lg[J_c/(A \cdot cm^{-2})]$
Mg-20 min	-1.722	-4.094	Mg-12 h	-1.499	-4.245
Mg&AZ91-20 min	-1.596	-3.791	Mg&AZ91-12 h	-1.460	-3.625
Mg&TA2-20 min	-1.556	-3.536	MgTA2-12 h	-1.376	-3.340
Mg&316L-20 min	-1.452	-2.938	Mg&316L-12 h	-1.135	-3.279

2.2 异质金属作用下高纯镁氢气释放的特征

图 3 为各组试样在 PBS 缓冲溶液中浸泡 48 h 的氢气释放量随时间的变化趋势。Mg 在 PBS 溶液中浸

泡 48 h 后，释放的氢气总量为 23.44 mL，Mg&AZ91 为 31.61 mL，Mg&TA2 为 42.13 mL，Mg&316L 为 77.99 mL。由此可见，在 48 h 内，四组试样的氢气释放量与电化学腐蚀试验中的腐蚀速率变化规律一致。

在 PBS 溶液中浸泡 48 h 的过程中, Mg&316L 在 24 h 左右, 氢气释放就开始大幅减少, 从宏观腐蚀形貌

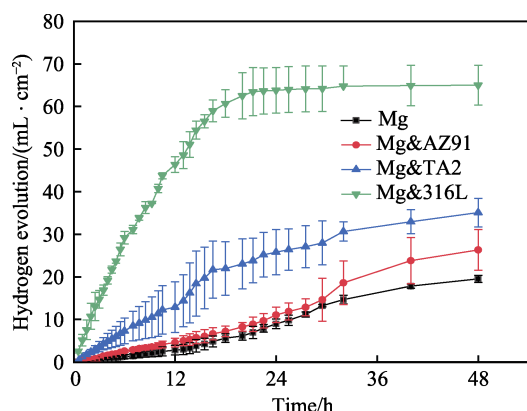


图3 浸泡 48 h 内的析氢曲线

Fig.3 Hydrogen evolution curves during 48 h immersion

(图4)可以看出, 这可能是由于腐蚀速率过快; 在腐蚀后期, Mg&316L 中的镁片已经基本腐蚀完全。

各组试样在 PBS 缓冲溶液中浸泡 48 h 后, 引起溶液中的氢气溶解浓度随时间的变化曲线如图 5 所示。可以发现, 三个测量位置的溶氢量差距较大。异质金属片表面的溶氢量显著大于其他两个位置, 主要是因为电偶电流的极化作用下, 很大程度地促进了异质金属片表面的阴极析氢反应。相对而言, 溶液中 50 mm 深度处的氢气溶解浓度更能代表溶液中平均的氢气溶解量。腐蚀较快的试验组的氢气溶解曲线完全处于腐蚀较慢的试验组上方, 且 Mg&316L 的峰值为 1.315 mg/L, Mg&TA2 的峰值为 0.981 mg/L, Mg&AZ91 的峰值为 0.496 mg/L, Mg 的峰值为 0.133 mg/L。基本能够说明, 在 48 h 过程中, 不同试验组溶液中的氢气溶解量存在比较显著的差距, 且与异质金属作用下的腐蚀速率变化规律保持一致。

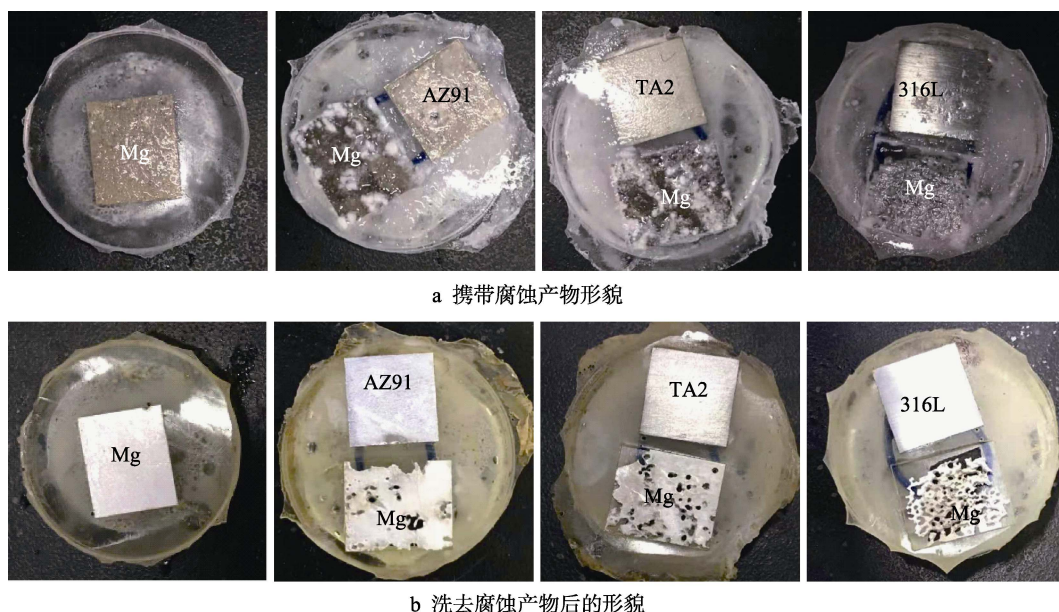


图4 浸泡 48 h 后各组试样宏观腐蚀形貌

Fig. 4 Macroscopic corrosion morphology of each group of samples after immersion for 48 h: a) carrying corrosion products; b) washing away corrosion products

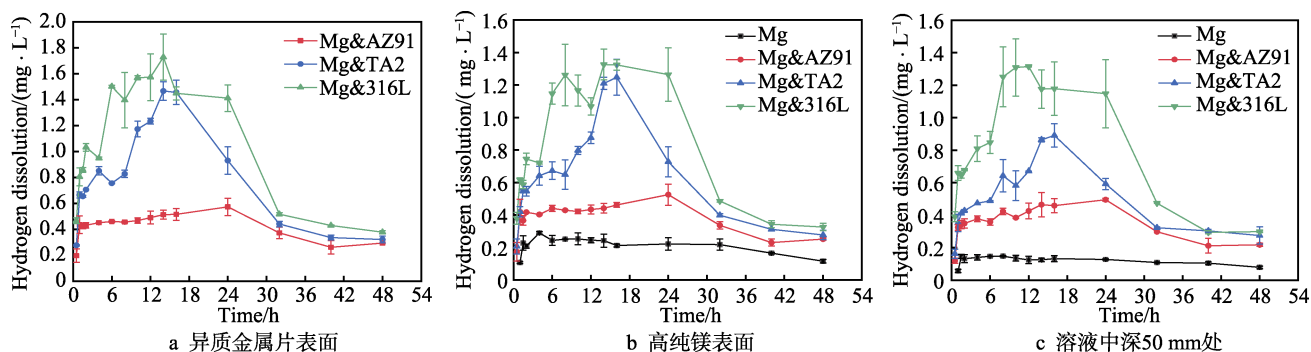


图5 浸泡 48 h 内 PBS 溶液中的氢气溶解浓度

Fig.5 Hydrogen dissolution in PBS solution during 48 h immersion: a) above the surface of dissimilar metals; b) above the surface of Mg; c) 50 mm deep in the solution



## 2.3 异质金属作用下高纯镁氢气释放的抗肿瘤效应

图 6 为不同氢气释放量对甲状腺肿瘤 Cal-62 细胞增殖的试验结果。从图中看出, 氢气处理肿瘤细胞 24、48、72 h 时, 有氢气释放的试验组相比于对照组基本上都具有统计学差异 (其中\*代表  $p<0.05$ , \*\*代表  $p<0.01$ , \*\*\*代表  $p<0.005$ , \*\*\*\*代表  $p<0.001$ )。而且, 随着氢气释放量及氢气溶解浓度的升高, 这种抑制作用有着增强的趋势。关于氢气抗肿瘤的机制研究目前也已经展开, 其核心在于氢气与 ROS 的相互作用。由于人肿瘤产生 ROS 的速度比正常细胞系快<sup>[22]</sup>, 且 ROS 能够通过多种渠道促进肿瘤微环境中血管的

生长, 从而加快肿瘤细胞增殖和长大<sup>[23]</sup>。而氢气能通过清除 ROS, 干扰肿瘤细胞呼吸和新陈代谢, 保护 DNA、RNA 和蛋白质免受过量 ROS 氧化, 造成损伤, 并且还可以抑制肿瘤侵袭和肿瘤血管生成<sup>[16,24]</sup>。培养 48 h 后, 需要对肿瘤细胞进行换液处理, 导致 48 h 内溶解在嵌入皿中的氢气大量损失, 使 48 h 和 72 h 的氢气抑制作用差异不大, 远不及在 24 h 和 48 h 之间的差异明显, 因此在凋亡试验和周期试验中, 只进行了 48 h 的氢气释放。

图 7 为不同氢气释放量对 Cal-62 甲状腺肿瘤细胞凋亡影响的试验结果。由于本研究采用了 AnnexinV-FITC/PI 双染法, 在细胞凋亡的统计图中, 双阳区 (Q2) 代表晚期凋亡, FITC 单阳区 (Q3) 代表早期凋亡,

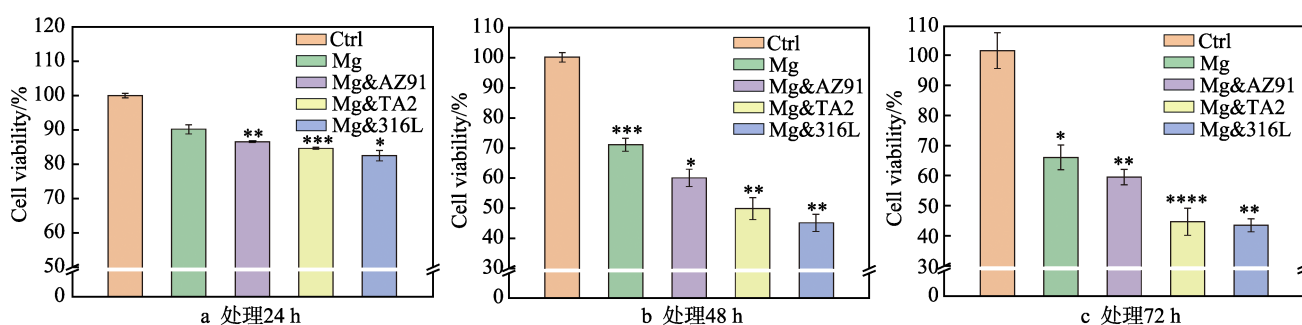


图 6 氢气对 Cal-62 肿瘤细胞增殖的影响

Fig.6 Effect of hydrogen on the proliferation of Cal-62 tumor cells: a) treat for 24 h; b) treat for 48 h; c) treat for 72 h

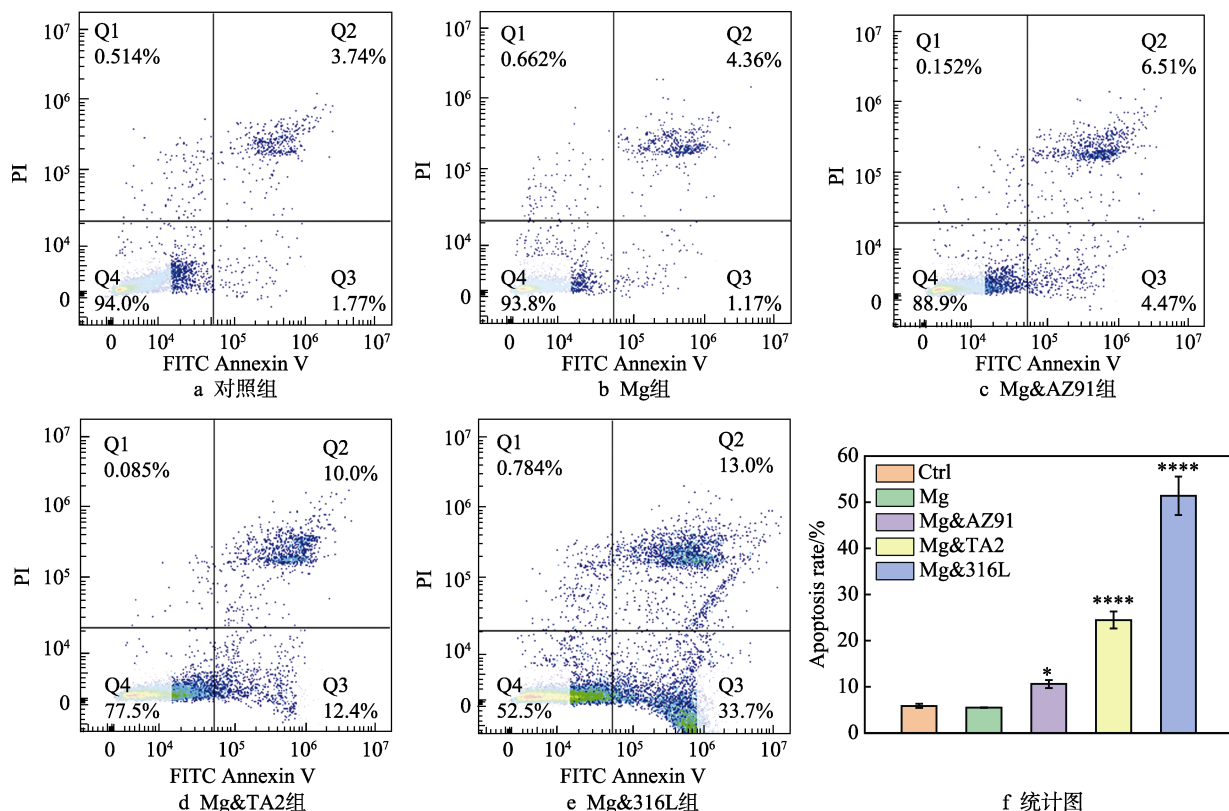


图 7 氢气处理 48 h 对 Cal-62 肿瘤细胞凋亡的影响

Fig.7 Effect of hydrogen on the apoptosis of Cal-62 tumor cells after treating for 48 h: a) control group; b) Mg group; c) Mg&AZ91 group; d) Mg&TA2 group; e) Mg&316L group; f) statistical chart

Q2+Q3 之和为统计的细胞凋亡率。从统计结果可以看出,除 Mg 组之外,其余有氢气作用的组的肿瘤细胞凋亡率均与对照组存在显著差异,氢气作用明显促进了细胞凋亡,且随着氢气释放量增加,凋亡率有上升趋势。对照组凋亡率为 5.87%,Mg 组为 5.49%,Mg&AZ91 组为 10.63%,Mg&TA2 组为 24.47%,Mg&316L 组为 51.37%。事实上,有研究显示,氢气在体内和体外试验时,激活了结肠癌细胞中一系列的细胞凋亡通路(磷酸化单磷酸腺苷活化蛋白激酶(p-AMPK)、凋亡诱导因子(AIF)和胱天蛋白酶 3 型(Caspase3)等),促进了肿瘤细胞凋亡<sup>[25]</sup>。

图 8 为不同氢气释放量试验组对 Cal-62 甲状腺肿瘤细胞周期影响的试验结果。细胞周期分为 DNA 合成前期(G0/G1)、DNA 合成期(S)和 DNA 合成

后期与分裂期(G2/M),各个时期细胞中的 DNA 含量具有对应的特征。结果显示,在氢气作用后,Cal-62 细胞的 G2/M 期无显著变化,但 G0/G1 期大幅延长,S 期显著缩短,即 Cal-62 肿瘤细胞被阻滞在 G0/G1 期,细胞增殖的过程也受到阻碍。同时,随着氢气释放量增加,对肿瘤细胞周期的阻滞作用也显现出增强的趋势。目前,已经存在氢气对肿瘤细胞周期产生影响的报道,但对于不同细胞,影响的细胞周期时段不同。例如,Saitoh 等<sup>[26]</sup>发现氢气和铂纳米胶体联合治疗肿瘤细胞后,G0/G1 期细胞比例下降,G2/M 期细胞增加。但 Wang 等<sup>[27]</sup>的研究表明,氢气诱导的肺癌肿瘤 A549 和 H1975 细胞阻滞在 G2/M 期,可能的原因是氢气抑制了一种细胞周期中染色体结合所需的复合物 SMC3 的表达。

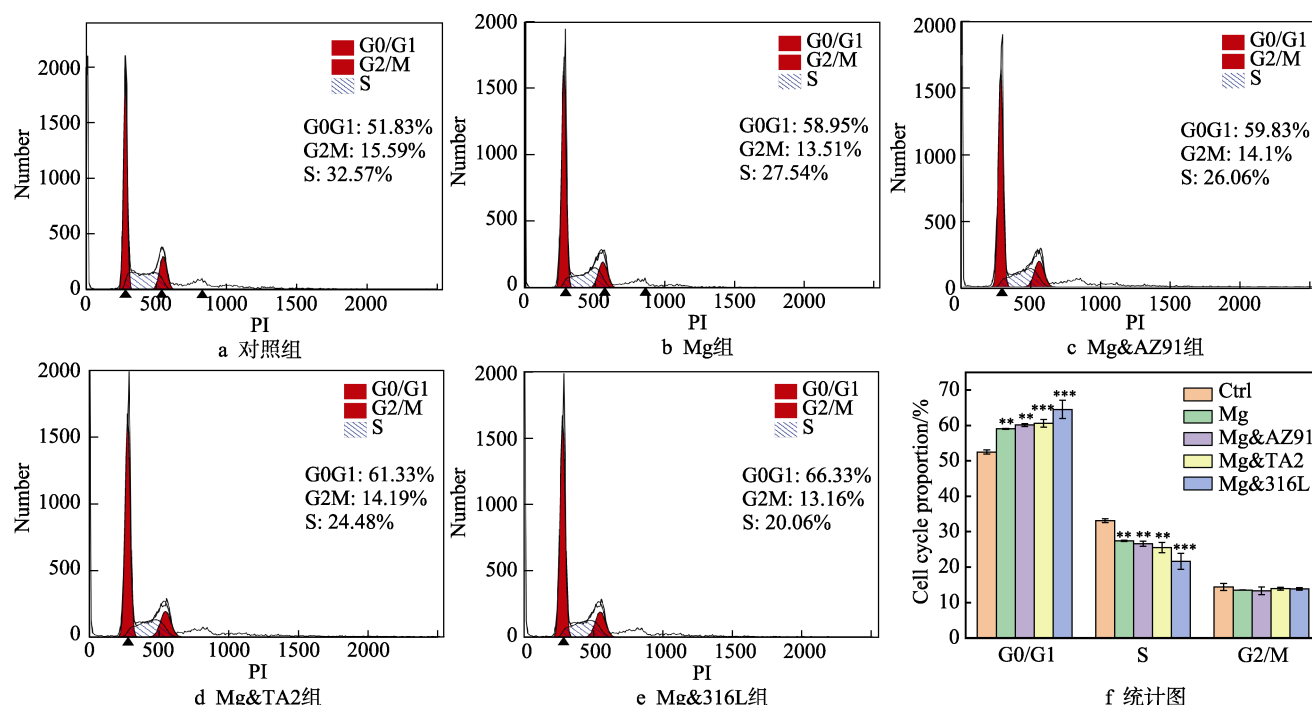


图 8 氢气处理 48 h 对 Cal-62 肿瘤细胞周期的影响

Fig. 8 Effect of hydrogen on the cell cycle of Cal-62 tumor cells after treating for 48 h: a) control group; b) Mg group; c) Mg&AZ91 group; d) Mg&TA2 group; e) Mg&316L group; f) statistical chart

### 3 结论

1) 不同异质金属对 Mg 试样产生了不同程度的极化作用,引起 OCP、 $E_c$  和  $\lg J_c$  的升高。排序均为: Mg<Mg&AZ91<Mg&TA2<Mg&316L。

2) 异质金属引起腐蚀加速的同时,又加剧了氢气释放,各组之间氢气释放量存在明显差异,能够形成氢气溶解量差异明显的溶液,且这种差异与腐蚀加速规律保持一致。

3) 增加氢气释放量能够显著增强氢气对甲状腺肿瘤 Cal-62 细胞增殖的抑制作用,在氢气释放量最多的 Mg&316L 组中,抑制率高达 55%。这是由于氢

气释放量增加,肿瘤细胞凋亡率和 G0/G1 期的阻滞比例升高共同达成。

### 参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. CA: A cancer journal for clinicians, 2020, 70(1): 7-30.
- [2] CABANILLAS M E, MCFADDEN D G, DURANTE C. Thyroid cancer[J]. The lancet, 2016, 388(10061): 2783-2795.
- [3] 耿芳,谭丽丽,张炳春,等. 多孔镁作为新型骨组织工程材料的研究探索[J]. 材料导报, 2007, 21(5): 76-78.

- GENG Fang, TAN Li-li, ZHANG Bing-chun, et al. Review of the study on porous magnesium as a new bone tissue engineering biomaterial[J]. *Materials reports*, 2007, 21(5): 76-78.
- [4] ZHANG Y, XU J, RUAN Y C, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats[J]. *Nature medicine*, 2016, 22(10): 1160-1169.
- [5] 黄作明, 黄珣. 微量元素与人体健康[J]. *微量元素与健康研究*, 2010(6): 58-62.  
HUANG Zuo-ming, HUANG Xun. Trace elements and human health[J]. *Studies of trace elements and health*, 2010(6): 58-62.
- [6] VORMANN J. Magnesium: nutrition and metabolism[J]. *Molecular aspects of medicine*, 2003, 24(1-3): 27-37.
- [7] STAIGER M P, PIETAK A M, HUADMAI J, et al. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(9): 1728-1734.
- [8] CHEN Y, YAN J, WANG Z, et al. In vitro and in vivo corrosion measurements of Mg-6Zn alloys in the bile[J]. *Materials science and engineering: C*, 2014, 42: 116-123.
- [9] WU H, ZHAO C, NI J, et al. Research of a novel biodegradable surgical staple made of high purity magnesium [J]. *Bioactive materials*, 2016, 1(2): 122-126.
- [10] ZHANG J, LI H, WANG W, et al. The degradation and transport mechanism of a Mg-Nd-Zn-Zr stent in rabbit common carotid artery: A 20-month study[J]. *Acta biomaterialia*, 2018, 69: 372-384.
- [11] WINDHAGEN H, RADTKE K, WEIZBAUER A, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: Short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study[J]. *Biomedical engineering online*, 2013, 12(1): 62.
- [12] LEE J W, HAN H S, HAN K J, et al. Long-term clinical study and multiscale analysis of in vivo biodegradation mechanism of Mg alloy[J]. *Proceedings of the national academy of sciences*, 2016, 113(3): 716-721.
- [13] ZHANG Y, REN L, LI M, et al. Preliminary study on cytotoxic effect of biodegradation of magnesium on cancer cells[J]. *Journal of materials science & technology*, 2012, 28(9): 769-772.
- [14] CHEN Y, XIAO M, ZHAO H, et al. On the antitumor properties of biomedical magnesium metal[J]. *Journal of materials chemistry B*, 2015, 3(5): 849-858.
- [15] QIAO S, WANG Y, ZAN R, et al. Biodegradable Mg implants suppress the growth of ovarian tumor[J]. *ACS biomaterials science & engineering*, 2020, 6(3): 1755-1763.
- [16] DOLE M, WILSON F R, FIFE W P. Hyperbaric hydrogen therapy: A possible treatment for cancer[J]. *Science*, 1975, 190(4210): 152-154.
- [17] OHSAWA I, ISHIKAWA M, TAKAHASHI K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nature medicine*, 2007, 13(6): 688-694.
- [18] 曾荣昌, 崔蓝月, 柯伟. 医用镁合金: 成分, 组织及腐蚀[J]. *金属学报*, 2018, 54(9): 1215-1235.  
ZENG Rong-chang, CUI Lan-yue, KE Wei. Biomedical magnesium alloys: composition, microstructure and corrosion[J]. *Acta metallurgica sinica*, 2018, 54(9): 1215-1235.
- [19] 曾荣昌, 陈君, 张津. 镁合金电偶腐蚀研究及其进展[J]. *材料导报*, 2008, 22(1): 107-109.  
ZENG Rong-chang, CHEN Jun, ZHANG Jin. Research and progress of galvanic corrosion of magnesium alloys [J]. *Materials reports*, 2008, 22(1): 107-109.
- [20] CHEN J, DONG J, WANG J, et al. Effect of magnesium hydride on the corrosion behavior of an AZ91 magnesium alloy in sodium chloride solution[J]. *Corrosion science*, 2008, 50(12): 3610-3614.
- [21] FAJARDO S, FRANKEL G S. Effect of impurities on the enhanced catalytic activity for hydrogen evolution in high purity magnesium[J]. *Electrochimica acta*, 2015, 165: 255-267.
- [22] FUKUDA K, ASOH S, ISHIKAWA M, et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2007, 361(3): 670-674.
- [23] BROWN N S, JONES A, FUJIYAMA C, et al. Thymidine phosphorylase induces carcinoma cell oxidative stress and promotes secretion of angiogenic factors[J]. *Cancer research*, 2000, 60(22): 6298-6302.
- [24] ZHANG J Y, LIU C, ZHOU L, et al. A review of hydrogen as a new medical therapy[J]. *Hepato gastroenterology-current medical and surgical trends*, 2012, 59(116): 1026-1032.
- [25] RUNTUWENE J, AMITANI H, AMITANI M, et al. Hydrogen-water enhances 5-fluorouracil-induced inhibition of colon cancer[J]. *PeerJ*, 2015, 3: 859.
- [26] SAITOH Y, IKESHIMA M, KAWASAKI N, et al. Transient generation of hydrogen peroxide is responsible for carcinostatic effects of hydrogen combined with platinum nanocolloid, together with increases intracellular ROS, DNA cleavages, and proportion of G2/M-phase[J]. *Free radical research*, 2016, 50(4): 385-395.
- [27] WANG D, WANG L, ZHANG Y, et al. Hydrogen gas inhibits lung cancer progression through targeting SMC3 [J]. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 2018, 104: 788-797.