

# 纳米 TiO<sub>2</sub> 对人淋巴细胞 DNA损伤的研究

李卫红, 徐厚君, 白云, 李清钊, 姚林

(华北煤炭医学院, 河北 唐山 063000)

**摘要:** 目的 探讨一维及三维纳米 TiO<sub>2</sub> 和常规 TiO<sub>2</sub> 的遗传毒性。方法 人离体淋巴细胞培养, 采用不同剂量三种不同材料的 TiO<sub>2</sub> 染毒, 通过观察淋巴细胞转化率, 并结合单细胞凝胶电泳实验、微核实验测定细胞 DNA损伤。结果 淋巴细胞转化率各染毒组与阴性对照差异为无统计学意义; 单细胞凝胶电泳实验显示 1D TiO<sub>2</sub> 拖尾率与常规 TiO<sub>2</sub> 相比差异无统计学意义, 3D TiO<sub>2</sub> 与常规 TiO<sub>2</sub> 之间的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); TiO<sub>2</sub> 染毒各个剂量组的微核率与阴性对照差异均无统计学意义。结论 3D TiO<sub>2</sub> 具有一定的遗传毒性, 而 1D TiO<sub>2</sub> 表现不明显。

**关键词:** 纳米材料; 1D TiO<sub>2</sub>; 3D TiO<sub>2</sub>; 淋巴细胞; DNA损伤

**中图分类号:** R114 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2009)03-0178-03

Study on DNA damage in lymphocytes induced by nano-TiO<sub>2</sub>

LI Wei hong, XU Hou jun, BAI Yun, LI Qing zhao, YAO Lin

(Department of Preventive Medicine, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

**Abstract:** Objective To explore the genetic toxicity of one-dimensional and three-dimensional nano-TiO<sub>2</sub>. Methods Human lymphocytes were cultured and exposed to different doses of TiO<sub>2</sub>. DNA damage was observed by lymphocyte transformation rate determination, comet assay and micronucleus test. Results There was no significant difference in lymphocyte transformation rate compared with the negative controls; the difference of tailing rate was only seen between 3D TiO<sub>2</sub> and conventional TiO<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ) in comet test, and there was also no difference in micronucleus rate among different groups. Conclusions The results shows that only 3D TiO<sub>2</sub> has some genetic toxicity while the 1D TiO<sub>2</sub> seems to those effects.

**Key words:** Nanometer materials; One-dimensional TiO<sub>2</sub> (1D TiO<sub>2</sub>); Three-dimensional TiO<sub>2</sub> (3D TiO<sub>2</sub>); Lymphocyte; DNA damage

二氧化钛 (TiO<sub>2</sub>) 是金属钛的一种氧化物, 纳米级别的 TiO<sub>2</sub> 则具有粒径小、比表面积大、磁性强、光催化、吸收性能好、吸收紫外线能力强、表面活性大、热导性好、分散性好、所制悬浮液稳定等优点<sup>[1]</sup>。纳米级 TiO<sub>2</sub> 由于其优良的紫外线屏蔽作用、透明性以及无毒等特点, 使其成为生产防晒霜类护肤品、食品包装材料、农用塑料薄膜、天然和人造纤维等的理想材料。

由于纳米 TiO<sub>2</sub> 广泛的用途, 已经迅速进入人们的日常生活中, 会在多方面接触纳米 TiO<sub>2</sub>, 但目前国内对其使用安全性还未进行系统评价, 本课题将在国内外研究的基础上, 以人血淋巴细胞为研究对象, 通过比较一维及三维纳米二氧化钛 (1D TiO<sub>2</sub>、3D TiO<sub>2</sub>) 和常规 TiO<sub>2</sub> 的毒性, 为纳米 TiO<sub>2</sub> 材料的制造和使用安全性提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

无菌采集健康成年人静脉血 20 ml 肝素抗凝,

4℃冷藏备用。

### 1.2 器械

CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (SteriCycle CO<sub>2</sub> Incubator, KDC-1044型低速离心机 (科大创新股份有限公司佳分公司), DYY-III-7型转移电泳仪 (北京市六一仪器厂), OLYMPUS BX-41型荧光显微镜及其照相系统 (日本)。

### 1.3 观察指标

**1.3.1 淋巴细胞转化率** 400倍显微镜下观察标本, 计数 100个以上细胞中的转化细胞的个数, 结果以百分率 (%) 表示。转化细胞的判断标准: 细胞核膨大, 疏松, 有核仁分化, 核质着色不均一, 有颗粒状染色质。

**1.3.2 DNA损伤影像分析** 在荧光显微镜下观察计数拖尾细胞数 (每组 100个细胞), 计算拖尾率, 以百分率表示; 在高倍镜下用测微器测量拖尾细胞的核直径和尾长度, 并选取典型视野和适当倍数照相。

**1.3.3 微核试验** 计数 1 000个细胞中含微核的细胞数, 以千分率表示。

### 1.4 统计学处理

收稿日期: 2009-01-12

作者简介: 李卫红 (1973—), 女, 实验师

所有数据录入 Excel 计算淋巴细胞转化率、拖尾率、微核率,均以  $\bar{x} \pm s$  表示,将相同剂量的不同粒径 TiO<sub>2</sub> 组的淋巴细胞转化率、拖尾率、微核率进行方差分析及 t 检验, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 纳米 TiO<sub>2</sub> 对人淋巴细胞转化率的影响 (表 1)

将不同材料相同剂量的染毒组与阴性对照组比较差异无统计学意义,显示纳米 TiO<sub>2</sub> 对人离体淋巴细胞的转化无明显影响。

表 1 纳米 TiO<sub>2</sub> 对离体淋巴细胞培养转化率的影响

分组	剂量 (mg/ml)	例数	观察细胞数 (个)	转化细胞数 (个)	拖尾率 (%)
阴性对照	—	8	800	656	82.0 ± 4.72
常规 TiO <sub>2</sub>	0.1	8	800	610	76.2 ± 5.13
常规 TiO <sub>2</sub>	0.5	8	800	643	80.4 ± 5.47
常规 TiO <sub>2</sub>	1.0	8	800	601	75.1 ± 6.76
1D TiO <sub>2</sub>	0.1	8	800	636	79.6 ± 4.81
1D TiO <sub>2</sub>	0.5	8	800	642	80.2 ± 5.38
1D TiO <sub>2</sub>	1.0	8	800	608	76.0 ± 5.53
3D TiO <sub>2</sub>	0.1	8	800	590	73.8 ± 6.15
3D TiO <sub>2</sub>	0.5	8	800	595	74.3 ± 6.29
3D TiO <sub>2</sub>	1.0	8	800	597	74.6 ± 5.79
阳性对照	0.1	8	800	459	57.4 ± 4.59*

与其他各组相比, \* P < 0.05

### 2.2 纳米 TiO<sub>2</sub> 对拖尾率的影响 (见表 2)

从镜下观察拖尾细胞数量计算其拖尾率。对 1D TiO<sub>2</sub>、3D TiO<sub>2</sub> 与常规 TiO<sub>2</sub> 的相同剂量组进行比较,并进行统计学检验可以得出常规 TiO<sub>2</sub> 和 1D TiO<sub>2</sub> 与阴性对照之间拖尾率的差异不明显,常规 TiO<sub>2</sub> 和 1D TiO<sub>2</sub> 虽然也使少量淋巴细胞 DNA 出现拖尾,但差异无统计学意义 (P > 0.05)。即常规 TiO<sub>2</sub> 和 1D TiO<sub>2</sub> 无明显的毒性。而 3D TiO<sub>2</sub> 的各个剂量组的拖尾率明显高于另外两组,差异有统计学意义 (P < 0.05),即 3D TiO<sub>2</sub> 具有一定的遗传毒性。

### 2.3 纳米 TiO<sub>2</sub> 对微核率的影响 (见表 3)

将不同材料相同剂量的染毒组与阴性对照组比较,差异无统计学意义 (P > 0.05),显示纳米 TiO<sub>2</sub> 对人体淋巴细胞的微核率无明显影响。

## 3 讨论

纳米 TiO<sub>2</sub> 根据其晶型,可分为板钛矿型、锐钛矿型 (最常见) 和金红石型 3 种。其中锐钛矿型 TiO<sub>2</sub> 属于四方晶系,其晶格参数 a = 37.85 nm, c = 95.14 nm。锐钛矿型 TiO<sub>2</sub> 的单元结构中钛原子处于钛氧八面体的中心,其周围的六个氧原子都位于八面体的棱角处,有四个共棱边,也就是说,锐钛矿型

表 2 纳米 TiO<sub>2</sub> 对淋巴细胞拖尾率的影响

分组	剂量 mg/ml	例数	观察细胞数 (个)	拖尾细胞数 (个)	拖尾率 (%)
阴性对照	—	8	800	10	1.25 ± 0.73
常规 TiO <sub>2</sub>	0.1	8	800	21	2.62 ± 1.26
常规 TiO <sub>2</sub>	0.5	8	800	11	1.38 ± 0.92
常规 TiO <sub>2</sub>	1.0	8	800	16	2.00 ± 0.75
1D TiO <sub>2</sub>	0.1	8	800	26	2.25 ± 1.37
1D TiO <sub>2</sub>	0.5	8	800	22	1.75 ± 1.21
1D TiO <sub>2</sub>	1.0	8	800	23	2.88 ± 1.48
3D TiO <sub>2</sub>	0.1	8	800	43	5.38 ± 0.83*
3D TiO <sub>2</sub>	0.5	8	800	65	8.12 ± 1.52*
3D TiO <sub>2</sub>	1.0	8	800	111	13.88 ± 1.43**
阳性对照	0.1	8	800	273	34.12 ± 1.27**

相同剂量组之间相比, \* P < 0.05 与其他各组相比, \*\* P < 0.05

表 3 纳米 TiO<sub>2</sub> 对淋巴细胞微核率的影响

分组	剂量 mg/ml	例数	观察细胞数 (个)	微核数 (个)	微核率 (%)
阴性对照	—	8	8000	7	0.88 ± 0.81
常规 TiO <sub>2</sub>	0.1	8	8000	11	1.38 ± 0.97
常规 TiO <sub>2</sub>	0.5	8	8000	10	1.25 ± 1.24
常规 TiO <sub>2</sub>	1.0	8	8000	13	1.62 ± 0.86
1D TiO <sub>2</sub>	0.1	8	8000	8	1.00 ± 1.37
1D TiO <sub>2</sub>	0.5	8	8000	16	2.00 ± 0.82
1D TiO <sub>2</sub>	1.0	8	8000	10	1.25 ± 1.54
3D TiO <sub>2</sub>	0.1	8	8000	15	1.88 ± 1.63
3D TiO <sub>2</sub>	0.5	8	8000	17	2.12 ± 1.41
3D TiO <sub>2</sub>	1.0	8	8000	18	2.25 ± 1.72
阳性对照	0.1	8	8000	54	6.75 ± 1.21*

与其他各组相比, \* P < 0.05

的单一晶格有四个 TiO<sub>2</sub> 分子。锐钛型 TiO<sub>2</sub> 的八面体呈明显的斜方晶型畸变, Ti-O 键距离均很小且不等长,这种不平衡使 TiO<sub>2</sub> 分子极性很强,强极性使 TiO<sub>2</sub> 表面易吸附水分子使水分子极化而形成表面羟基。资料显示,从常规二氧化钛到 1D TiO<sub>2</sub>、3D TiO<sub>2</sub> 极性逐渐增大,实验结果也显示极性最大的 3D TiO<sub>2</sub> 对淋巴细胞的毒性也最大<sup>[2]</sup>。

目前的研究认为,在光照条件下, TiO<sub>2</sub> 表面的超亲水性起因于其表面结构的变化;在紫外光照射下, TiO<sub>2</sub> 价带电子被激发到导带,电子和空穴向 TiO<sub>2</sub> 表面迁移,在表面生成电子空穴对,电子与 Ti<sup>3+</sup> 反应,空穴则与表面桥氧离子反应,分别形成正三价的钛离子和氧空位。此时,空气中的水解离吸附在氧空位中,成为化学吸附水 (表面羟基),化学吸附水可进一步吸附空气中的水分,形成物理吸附层。TiO<sub>2</sub> 中 Ti-O 键的极性较大,表面吸附的水因极化发生解离,容易形成羟基。可以认为纳米 TiO<sub>2</sub> 发生的这种反应产生的 O<sup>-</sup> 和 OH 自由基可能是纳米 TiO<sub>2</sub>

对细胞产生遗传毒性的机制<sup>[2,3]</sup>。

常规二氧化钛已经证明是无毒的,应用于日常生活的许多方面,但具有以上性质的纳米二氧化钛是否仍然无毒,许多科学家对此进行了研究讨论,却没有得出权威统一的结果,还需进一步探讨。10~50 nm大小颗粒现已证实可以通过呼吸道进入机体其他器官,包括人体最重要器官中枢神经系统和心脏。1 μm大小颗粒就可以通过皮肤角质层,颗粒越小越容易通过,因此人体任何部位暴露面(包括皮肤体表面)都可以不同程度地吸收纳米颗粒。纳米 TiO<sub>2</sub>颗粒越小,侵入越多,150~500 nm TiO<sub>2</sub>颗粒就可以通过完整表皮和消化道,进入血液和肝脏等器官<sup>[4]</sup>。

对于纳米 TiO<sub>2</sub>颗粒的毒性,测定大都来自体外和动物体内试验,主要指标仍停留在对试验动物支气管肺泡灌洗液和肺组织进行的一些常规毒理学检查。Renwick等用125或500 μg等重量29 nm TiO<sub>2</sub>颗粒和250 nm TiO<sub>2</sub>颗粒分别气管内滴注24 h后对支气管肺泡灌洗液中细胞总数、巨噬细胞吞噬和趋化功能、反映上皮细胞损伤的γ-2谷氨酰转肽酶活力、反映细胞毒性的乳酸脱氢酶活力和总蛋白含量进行测定分析,结果除肺泡巨噬细胞吞噬百分率两者相同外,其余各项毒性指标高剂量组纳米 TiO<sub>2</sub>颗粒均有显著改变,而细 TiO<sub>2</sub>颗粒与对照差异不明显<sup>[5]</sup>。因 TiO<sub>2</sub>广泛应用于各类防晒产品,其是否可以经皮渗透进入人体引起了人们的普遍关注。关于纳米级 TiO<sub>2</sub>粒子的皮肤渗透可能性已经进行了若干研究,但结果不一。Tan等将含有8%超细微 TiO<sub>2</sub>(10~50 nm)的防晒产品在16名志愿者的皮肤上应用2至6周,以研究其是否渗入皮肤。结果表明,皮肤的 TiO<sub>2</sub>粒子有明显升高的现象,首次提供了关于纳米级 TiO<sub>2</sub>皮肤渗透的证据,但因 TiO<sub>2</sub>的样本量还不够大,因此需要加大样本量来观察。而Schulz等和Pflecker等应用光电子显微镜后,认为 TiO<sub>2</sub>(20~200 nm)仅沉积在角质层的最外边,角质层的深面和真皮层并没有检测到它的

存在,纳米粒子不能渗入志愿者的皮肤。Lademann等报道在毛囊角质层和毛乳头处发现了防晒霜中的超细 TiO<sub>2</sub>颗粒的沉积,但是这并不能认为颗粒能穿透活皮肤组织。Bennet等将水状和油状的 TiO<sub>2</sub>用于评价其皮肤渗透性,结果表明,油状的 TiO<sub>2</sub>较水状的 TiO<sub>2</sub>的皮肤渗透现象明显<sup>[6]</sup>。

本实验对人离体淋巴细胞进行纳米二氧化钛染毒,在已经显示的研究结果上进行进一步探讨,研究 TiO<sub>2</sub>通过完整表皮和消化道进入血液和肝脏等器官后是否对人淋巴细胞产生毒性作用。结果显示,淋巴细胞转化率常规、1D 3D TiO<sub>2</sub>各个剂量组与阴性对照之间差异无统计学意义;单细胞凝胶电泳实验常规、1D TiO<sub>2</sub>各个剂量组与阴性对照之间差异无统计学意义,3D TiO<sub>2</sub>与阴性对照、常规 TiO<sub>2</sub>、1D TiO<sub>2</sub>之间的差异有统计学意义;微核实验 TiO<sub>2</sub>染毒各个剂量组与阴性对照差异无统计学意义。即常规、1D TiO<sub>2</sub>无明显毒性,3D TiO<sub>2</sub>具有一定的毒性。

由于本实验中存在许多局限条件,对 TiO<sub>2</sub>进入机体后的转运机制,是否在血液中首先作用于淋巴细胞还未见有研究资料,所以本结果仅仅对 TiO<sub>2</sub>的遗传毒性提供参考,为 TiO<sub>2</sub>安全性和毒性的研究提供依据。

#### 参考文献:

- [1] 唐萌, 王晓娜, 李倩. 纳米氧化铁、纳米 TiO<sub>2</sub>、碳纳米管的毒理学研究进展 [J]. 国际生物医学工程杂志, 2006, 29(6): 340-345.
- [2] 周晓谦, 周文淮. 纳米二氧化钛的光催化特性及应用进展 [J]. 辽宁化工, 2002, 31(10): 448-451.
- [3] 刘清, 治洪, 郭宝岗. 纳米 TiO<sub>2</sub>毒性的试验研究 [J]. 现代预防医学, 2006, 33(7): 1211-1212.
- [4] 何继亮. 纳米材料的毒理学研究进展 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24(8): 502-505.
- [5] 应贤平, 仲伟鉴. 纳米二氧化钛颗粒毒理学进展 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20(5): 334-336.
- [6] 冯晶, 肖冰, 陈敬超. 纳米材料对生物体及环境的影响 [J]. 材料科学与工程学报, 2006, 24(3): 462-465.
- [7] 曹殿凤, 孙杰, 尚波. 染尘动物及肺支气管肺泡灌洗液的研究进展 [J]. 职业与健康, 2007, 23(12): 1039-1041.
- [8] 张素华, 张兆志. 148例矽肺患者肺叶灌洗回收液检验结果分析 [J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18(4): 241-242.
- [9] Tesohler H, Friedrichs K S, Hohelsel G B, et al. Asbestos fibers in bronchoalveolar lavage and lung tissue of former asbestos workers [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 29(16): 12-14.
- [10] 姜蕙馨, 胡一本, 马国云, 等. 尘肺患者支气管肺泡灌洗液分析 [J]. 中国工业医学杂志, 1992, 4(5): 24-27.
- [11] 谈光新. 全肺灌洗治疗矽肺与其他尘肺 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1990, 8(4): 220-223.
- [12] Keller G A, Wames T G, Steiner K S, et al. Cu<sup>2+</sup> Zn superoxide dismutase is a peroxidomal enzyme on human fibroblasts and hepatoma cell [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7381.
- [13] 孙太东, 陈朝万, 王波. 隧道工及矽肺患者发中微量元素 Cu<sup>2+</sup> Zn<sup>2+</sup> Fe<sup>2+</sup> Mn<sup>2+</sup>含量测定 [J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 1998, 25(3): 186-187.
- [14] Noel-Georis J, Bernal A, Fajnaigne P, et al. Database of bronchoalveolar lavage fluid proteins [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2002, 7(27): 221-236.

(上接第177页)