

纳米氧化铝颗粒对小鼠非特异性免疫功能的影响

武文慧, 张琦, 李欢, 丁勇, 路小婷, 吴晓兵, 宋静, 张玲, 牛侨, 张勤丽

摘要: [目的] 通过采用不同粒径氧化铝对小鼠进行染毒, 探讨纳米氧化铝对中性粒细胞吞噬功能的影响, 进而判断染毒对小鼠的非特异性免疫功能的影响。[方法] 取健康3月龄ICR种系雄、雌性小鼠各20只, 随机分为5组: 空白对照组, 溶剂对照组(每天滴注生理盐水), 10 μm 、50 nm、13 nm氧化铝组, 每组4只雄鼠, 4只雌鼠。采用鼻腔滴注法连续染毒60 d, 3次/d, 染毒剂量均为50 mg/kg, 制备细菌悬浮液, 内眦取血, 将血液与菌液混匀, 制作血涂片, 瑞氏染色, 油镜观察, 阅片计数150个中性粒细胞; 同时另取管做血常规分析。[结果] 吞噬百分比: 3个氧化铝染毒组均低于空白对照组和溶剂对照组(均 $P<0.05$); 与10 μm 组比较, 50 nm氧化铝组无明显变化($P=0.06$), 13 nm氧化铝组明显降低($P=0.01$); 与50 nm组比较, 13 nm氧化铝组无明显变化($P=0.08$)。吞噬指数: 3个氧化铝染毒组均低于空白对照组和溶剂对照组(均 $P<0.05$); 与10 μm 组比较, 50、13 nm氧化铝组明显降低(均 $P<0.05$); 与50 nm组比较, 13 nm氧化铝无明显变化($P=0.85$)。13 nm氧化铝组白细胞数目、淋巴细胞数目、淋巴细胞数百分比均高于空白对照组和溶剂对照组, 且差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。中性粒细胞数目各组差异均无统计学意义($P>0.05$)。[结论] 纳米氧化铝可降低小鼠中性粒细胞的吞噬功能, 影响小鼠的非特异性免疫功能, 且随粒径的减小, 吞噬功能降低越明显, 可能存在粒径效应; 纳米氧化铝可能会使外周血淋巴细胞数目增多。

关键词: 纳米氧化铝; 滴鼻染毒; 中性粒细胞; 吞噬指数; 吞噬百分比; 非特异性免疫

Effect of Nano Aluminum Oxide Particles on Non-Specific Immune Function in Mice WU Wen-hui, ZHANG Qi, LI Huan, DING Yong, LU Xiao-ting, WU Xiao-bing, SONG Jing, ZHANG Ling, NIU Qiao, ZHANG Qin-li (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China). Address correspondence to ZHANG Qin-li, E-mail: Zhangql930611@126.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the effect of nano aluminum oxide (Al_2O_3) on neutrophil phagocytosis in mice exposed to different sizes of nano Al_2O_3 particles, and to assess the impact on non-specific immune function in mice. [Methods] Three-month-old healthy ICR male ($n=20$) and female ($n=20$) mice were randomly divided into five groups with four male mice and four female mice per group: blank control, solvent control (daily infusion of saline), 10 μm Al_2O_3 , 50 nm Al_2O_3 , and 13 nm Al_2O_3 groups. Continuous exposure was conducted 3 times/d for 60 d by nasal drip and exposure dose was 50 mg/kg. Neutrophil phagocytosis was evaluated by oil immersion lens microscopy observation of 150 neutrophils on each Wright's stained blood smear which was prepared by mixing bacterial suspension and inner canthus blood sample of mice. Routine blood tests were also conducted. [Results] The phagocytic percentages of the three Al_2O_3 exposed groups were significantly lower than those of the blank control group and the solvent control group (all $P<0.05$). Compared with the 10 μm Al_2O_3 group, the 50 nm Al_2O_3 group had no obvious change in phagocytic percentage ($P=0.06$), but the 13 nm Al_2O_3 group showed significantly lowered phagocytic percentage ($P=0.01$). Compared with the 50 nm Al_2O_3 group, the 13 nm Al_2O_3 had no obvious change in phagocytic percentage ($P=0.08$). The phagocytic indices of the three Al_2O_3 exposed groups were lower than those of the blank control group and the solvent control group (all $P<0.05$). Compared with the 10 μm Al_2O_3 group, the 50 nm Al_2O_3 group and the 13 nm Al_2O_3 group were significantly decreased in phagocytic index (both $P<0.05$). Compared with the 50 nm Al_2O_3 group, the 13 nm Al_2O_3 group reported no significant change ($P=0.85$). Total white blood cells, lymphocyte counts, and lymphocyte percentages were higher in the 13 nm Al_2O_3 group than in the blank control group and the solvent control group, and the differences were statistically significant (all $P<0.05$). No significant differences were

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.15229

[基金项目] 山西省科技攻关项目(编号: 20130313020-1); 国家自然科学基金项目(编号: 81241098); 山西省教育科学“十二五”规划2012年度课题(编号: GH-12017)

[作者简介] 并列第一作者。武文慧(1992—), 女, 本科生; 研究方向: 纳米粒径氧化铝毒性; E-mail: 625748789@qq.com。张琦(1992—), 女, 本科生; 研究方向: 纳米粒径氧化铝毒性; E-mail: zhangqi2016@outlook.com

[通信作者] 张勤丽, E-mail: Zhangql930611@126.com

[作者单位] 山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001

found in the number of neutrophils ($P>0.05$). [Conclusion] Nano Al_2O_3 could decrease neutrophil phagocytosis and influence the non-specific immune function in mice, and the phagocytosis would decrease with smaller sizes, indicating a potential size effect. Nano Al_2O_3 could also cause an increase in the number of lymphocytes in peripheral blood.

Key Words: nano aluminum oxide; nasal drip exposure; neutrophil; phagocytic index; phagocytic percentage; non-specific immunity

纳米技术蓬勃发展, 纳米科学日益受到重视, 它已经与生命科学、信息科学共同组成当今世界的三大支柱科学^[1], 纳米材料是指至少在一维空间上粒径1~100 nm的材料, 具有小尺寸效应、表面效应、量子尺寸效应和宏观量子隧道效应等特殊的理化性质^[2-4]。具体表现为反应活性高、强度大、韧性佳、磁性和导电性改变、吸收性增强等, 从而在工农业、食品化工、环境保护、电子信息、能源材料等多方面都得到了广泛的应用^[5]。

非特异性免疫是机体免疫系统的重要组成部分, 中性粒细胞在其中发挥着重要的作用, 已经有许多学者通过计算中性粒细胞的吞噬百分比和吞噬指数来测定中性粒细胞的功能^[6-7]。研究报道, 纳米颗粒可以靶向性作用于中性粒细胞, 通过影响中性粒细胞的吞噬功能从而影响其抗炎及免疫功能^[8], 而且纳米材料对免疫系统有抑制作用, 例如碳纳米管经过呼吸道能造成肺部多发性肉芽肿, 并引发炎症反应^[9-10]。细胞水平的实验发现, 碳纳米管可以被T和B细胞摄入并影响其细胞活力^[11], 还可诱导T淋巴细胞程序化死亡^[12]等。

虽然已经有学者研究并证实了纳米氧化铝的神经毒性, 但目前国内外对于纳米材料的免疫毒性研究较少, 纳米材料是参照常规化学物的毒性试验进行评价, 但是由于其许多理化性质都不同于常规物质, 会干扰对毒性大小的评定, 且各国的评价标准不一致, 影响了科学信息的共享, 亟待规范国际标准。本实验通过计算中性粒细胞的吞噬百分比和吞噬指数来测定小鼠外周血中性粒细胞吞噬功能, 研究不同粒径的纳米氧化铝致小鼠的免疫毒性, 为纳米氧化铝的毒性研究提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及分组 取SPF级ICR种系健康3月龄雄、雌性小鼠各20只, 购自北京大学医学部实验动物科学部(实验动物许可证号: SCXK(京)2011-0012),

小鼠均以普通饲料饲养, 自由进食和饮水。采用完全随机设计, 利用随机数字表将小鼠随机分为5组: 空白对照组, 溶剂对照组(每天滴注生理盐水), 10 μm 、50 nm、13 nm氧化铝组, 每组4只雄鼠, 4只雌鼠。采用鼻腔滴注法连续染毒60 d, 3次/d, 染毒剂量均为50 mg/kg(按体重计)。染毒剂量依据前期关于纳米氧化铝的神经毒性和遗传毒性试验而确定^[13-15]。

1.1.2 主要试剂及药物 纳米氧化铝(<50 nm、<13 nm粒径)、微米氧化铝(<10 μm 粒径), 均购自美国Sigma公司; 快速瑞氏染液, 购自南京建成科技有限公司; 金黄色葡萄球菌, 山西医科大学微生物免疫教研室赠与。

1.1.3 主要仪器 显微镜/BX51、超高分辨率制冷数码相机/DP71(日本OLYMPUS公司), 超低温保存冰箱/DW-HL388(中科美菱低温科技有限责任公司), 电子天平/AB104-N(瑞士METTLER TOLEDO公司), 隔水式电热恒温培养箱/PYX-DHS-40X50(上海跃进医疗器械一厂), 全自动血液细胞分析仪/BC-2600(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), Millipore超纯水系统/Milli-Q Reference(美国Millipore公司), 透射电子显微镜/JEM-100CX(日本电子公司)。

1.1.4 菌液的配制 无菌生理盐水洗下金黄色葡萄球菌普通斜面18~24 h培养物, 经Mc Farland比浊法^[16]调整浓度至 $6 \times 10^8/\text{mL}$, 100 $^{\circ}\text{C}$ 15 min杀死细菌, 置4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 氧化铝染毒悬液的制备 将纳米氧化铝按照染毒浓度制成悬液, 超声0.5 h后滴在铜网上, 在透射显微镜下观察分散程度, 测量500个颗粒的直径, 计算平均粒径。

1.2.2 染毒方法 氧化铝悬液经鼻腔滴注, 滴注前超声0.5 h混匀, 按照小鼠体重每天滴注25~35 μL (分3次滴注), 共染毒60 d。每只小鼠滴注后置于干净的盒子中观察, 在1 min内没有液体从鼻腔中排出视作滴注成功。染毒过程中手法轻柔, 整个染毒期间, 动物室以自然节律采光, 温度18~23 $^{\circ}\text{C}$, 湿度40%~60%。

1.2.3 血涂片的制作及染色 (1)小鼠内眦取血0.1~0.2 mL置于含肝素液的EP管中,混匀。(2)取菌液0.1 mL与EP管内抗凝血混匀,置于37℃恒温箱中30 min,每10 min摇一次。(3)取3~4 μL 血液,推片,自然干燥。(4)取瑞氏染液滴于血涂片至完全铺开,静置5~8 min后,用超纯水冲洗染液1 min,自然风干。

1.2.4 细胞及细菌计数 油镜下选取清晰视野,随机计数150个中性粒细胞,记录吞噬细菌的细胞数目以及所吞噬的细菌数目,计算吞噬百分比和吞噬指数:吞噬百分比(%)=吞噬细菌的中性粒细胞数/计数的中性粒细胞总数(吞噬的+未吞噬的) $\times 100\%$;吞噬指数=被吞噬的细菌总数/吞噬细菌的中性粒细胞数。

1.2.5 血常规检测 内眦取血20 μL ,取20 μL 稀释液与之混匀,采用全自动血液细胞分析仪及相关试剂测定血常规的相关指标,记录白细胞、淋巴细胞、中性粒细胞数目,淋巴细胞、中性粒细胞百分比。

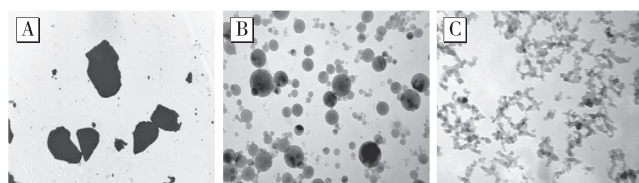
1.3 统计学分析

所有数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用SPSS 19.0软件分析。各组间比较先进行 F 检验,如果方差齐用 LSD 法两两比较,如果方差不齐用Dunnett- t 法进行比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 氧化铝颗粒表征

图1为不同粒径的氧化铝颗粒透射电镜图,可见颗粒的分散程度良好。3组氧化铝的粒径分别为(20.3 ± 0.53)、(59.94 ± 1.80) nm, (8.97 ± 0.20) μm 。

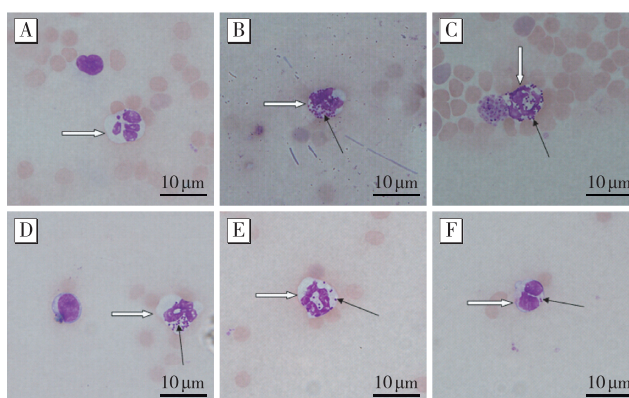


[注]A: 10 μm 氧化铝; B: 50 nm 氧化铝; C: 13 nm 氧化铝。

图1 透射电镜下不同粒径的氧化铝

2.2 实验动物一般情况及中性粒细胞吞噬金黄色葡萄球菌的情况

染毒期间各组小鼠全部存活。染毒前后各组小鼠的饮食和活动无明显异常。动物的外观、一般行为、对刺激的反应、分泌物、排泄物等并未发生异常,基本反应与对照组无差异。不同粒径的氧化铝颗粒滴鼻模型组小鼠中性粒细胞吞噬金黄色葡萄球菌的情况见图2。

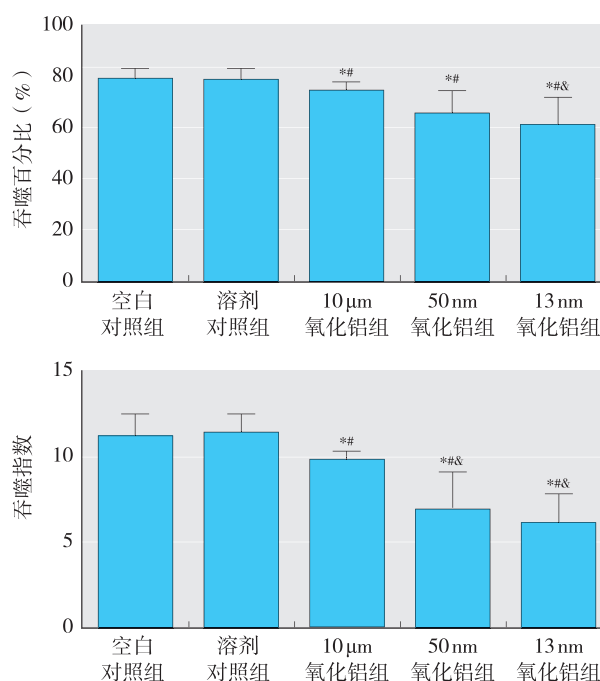


[注]A: 正常细胞; B: 空白对照组; C: 溶剂对照组; D: 10 μm 氧化铝组,视野中有杂质,但并不影响计数; E: 50 nm 氧化铝组; F: 13 nm 氧化铝组。白色箭头所指为中性粒细胞,呈分叶核;黑色箭头所指为被吞噬的金黄色葡萄球菌,呈紫色的小圆点。

图2 各组吞噬细菌的中性粒细胞

2.3 中性粒细胞吞噬百分比及吞噬指数

吞噬百分比: 3个染毒组均低于空白对照组和溶剂对照组(均 $P<0.05$);与10 μm 组比较,50 nm氧化铝组无明显变化($P=0.06$),13 nm氧化铝组降低($P=0.01$);2个纳米组间无明显差异($P=0.08$)。吞噬指数: 3个染毒组均低于空白对照组和溶剂对照组(均 $P<0.05$);与10 μm 组比较,50 nm、13 nm氧化铝组降低(均 $P<0.05$);2个纳米组间同样无明显差异($P=0.85$)。见图3。



[注]*: 与空白对照组比较, $P<0.05$ 。#: 与溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。
&: 与10 μm 氧化铝组比较, $P<0.05$ 。

图3 不同粒径的氧化铝对小鼠中性粒细胞吞噬功能的影响
($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

2.4 血常规指标

13 nm 氧化铝组白细胞数目、淋巴细胞数目、淋巴细胞数百分比均高于空白对照组和溶剂对照组(均

$P<0.05$)。中性粒细胞数目各组差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 不同粒径氧化铝染毒组小鼠血常规指标($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	白细胞数目($\times 10^9/L$)	淋巴细胞数目($\times 10^9/L$)	中性粒数目($\times 10^9/L$)	中性粒百分比(%)	淋巴细胞百分比(%)
空白对照组	4.3000 $\pm$ 1.249 00	3.133 3 $\pm$ 0.650 64	1.0000 $\pm$ 0.519 62	22.8000 $\pm$ 5.211 53	73.533 3 $\pm$ 6.146 00
溶剂对照组	5.4000 $\pm$ 0.700 00	3.933 3 $\pm$ 0.288 68	1.3000 $\pm$ 0.360 56	23.866 7 $\pm$ 3.385 75	72.833 3 $\pm$ 4.007 91
10 μ m 氧化铝组	6.2000 $\pm$ 1.951 92	4.633 3 $\pm$ 1.457 17	1.433 3 $\pm$ 0.493 29	23.2000 $\pm$ 2.971 53	74.333 3 $\pm$ 3.043 57
50 nm 氧化铝组	6.266 7 $\pm$ 0.351 19	4.6000 $\pm$ 0.700 00	1.466 7 $\pm$ 0.493 29	23.6000 $\pm$ 7.956 76	73.0000 $\pm$ 8.970 51
13 nm 氧化铝组	8.4000 $\pm$ 0.754 98**	7.033 3 $\pm$ 0.550 76**	1.166 7 $\pm$ 0.208 17	14.2000 $\pm$ 1.044 03#	83.5000 $\pm$ 1.307 67**
F	5.184	9.306	0.604	2.276	2.131
P	0.016	0.002	0.669	0.133	0.151

[注]*:与空白对照组比较, $P<0.05$ 。#:与溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

已有研究发现,纳米氧化铝颗粒能够引起全身氧化损伤和炎性反应,造成免疫系统不同程度的损伤,刺激机体免疫系统产生免疫应答,且初步认为13 nm 粒径毒性较大,微米粒径氧化铝毒性小于纳米级^[17]。王天成^[18]报道纳米氧化铝对小鼠血清生化指标的影响与微米氧化铝有所不同。在此研究基础上,一方面,本实验通过鼻腔滴注不同粒径的纳米氧化铝,对小鼠造成一定程度的免疫损伤,计算中性粒细胞吞噬百分比和吞噬指数来反映中性粒细胞的吞噬功能,进而判断不同粒径的纳米氧化铝对非特异性免疫系统的影响程度;另一方面,通过对血常规的检测,来反映免疫细胞数量的变化。

我们采用瑞氏染色法油镜下观察小鼠的中性粒细胞和其所吞噬的金黄色葡萄球菌,结果显示:10 μ m 氧化铝组和13 nm、50 nm 氧化铝组的中性粒细胞吞噬百分比和吞噬指数与空白和溶剂对照组比较均明显下降,提示纳米粒径的氧化铝可以抑制机体的非特异性免疫功能,具有免疫毒性。与10 μ m 组比较,13 nm 氧化铝组中性粒细胞的吞噬百分比和吞噬指数均明显降低,50 nm 氧化铝组中性粒细胞的吞噬指数明显降低,吞噬百分比无明显变化;与50 nm 组比较,13 nm 氧化铝组中性粒细胞吞噬百分比和吞噬指数均无明显变化,提示纳米氧化铝的毒性可能与其粒径的大小有关,粒径越小,毒性越大。

本研究结果提示纳米材料可以影响免疫系统,纳米级比微米级产生的毒效应更强。一方面是由于纳米级氧化铝比表面积更大,表面活性更高,就可能产生特异于微米级别的毒性;另一方面,粒径越小,越容易透过生物屏障,分散到各个组织器官,滞留在免疫

器官组织发挥毒性作用。而且,颗粒物越小,越容易逃避吞噬系统的吞噬作用而不易被消除,半衰期延长,进而延长了与生物大分子作用时间,对免疫系统的影响也就越大^[19]。

本研究血常规的指标显示,与空白对照组和溶剂对照组比较,13 nm 氧化铝组的淋巴细胞数目明显增多,提示纳米氧化铝可能会使外周血中的淋巴细胞数目增多,已有研究证明纳米材料促进混合淋巴细胞培养中淋巴细胞的增殖^[20]。在未来的研究中,除了运用传统免疫毒理学研究的方法之外,更要综合考虑纳米材料的独特性,以全面评价其免疫效应和免疫毒性。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

[1] Lidén G. The European commission tries to define nanomaterials[J]. Ann Occup Hyg, 2011, 55(1): 1-5.

[2] Nel A, Xia T, Madler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 2006, 311(5761): 622-627.

[3] Hirano S. Health effects of nanoparticles and nanomaterials(I) recent overview of health effects of nanoparticles[J]. Nihon Eiseigaku Zasshi, 2008, 63(1): 36-41.

[4] Hoet PH, Nemmar A, Nemery B. Health impact of nanomaterials[J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(1): 19.

[5] Borm PJ, Robbins D, Haubold S, et al. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC[J]. Part Fibre Toxicol, 2006, 3: 11.

[6] 姜丽娜,姚春艳. IL-2对中性粒细胞吞噬功能的影响[J]. 山西医科大学报, 2007, 38(3): 200-201.

[7] 傅瑞全,韦鹏涯,李洁,等. 免疫口服液对小鼠中性粒细胞

- 免疫功能的影响[J].右江民族医学院学报, 2005, 27(4): 439-441.
- [8] Wang Z, Li J, Cho J, et al. Prevention of vascular inflammation by nanoparticle targeting of adherent neutrophils[J]. Nat Nanotechnol, 2014, 9(3): 204-210.
- [9] Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, et al. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotube in rats[J]. Toxicol Sci, 2004, 77(1): 117-125.
- [10] Lam CW, James JT, McCluskey R, et al. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation[J]. Toxicol Sci, 2004, 77(1): 126-134.
- [11] Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, et al. Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells[J]. Nano Lett, 2006, 6(7): 1522-1528.
- [12] Bottini M, Bruckner S, Nika K, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis[J]. Toxicol Lett, 2006, 160(2): 121-126.
- [13] 贾丽娜, 王志武, 郭卫伟, 等. 纳米氧化铝急性染毒对小鼠学习记忆能力的影响[J]. 职业与健康, 2013, 29(6): 644-647.
- [14] 吉俊伟, 张勤丽, 高福平, 等. 纳米氧化铝致小鼠脏器毒性的基本病理变化[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(6): 442-446.
- [15] 吉俊伟, 唐仕川, 白茹, 等. 纳米氧化铝对小鼠血脑屏障通透性的影响[J]. 毒理学杂志, 2012, 26(5): 321-325.
- [16] 李霞, 刘映倩. 微生物比浊法测定口服阿奇霉素的效价含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2008(8): 321-322.
- [17] 李欢, 丁勇, 吴晓宏, 等. 纳米氧化铝颗粒对小鼠免疫指标变化的影响[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(2): 114-118.
- [18] 王天成, 孙红芳, 贾芳, 等. 纳米氧化铝颗粒对血清生化指标的影响[J]. 中国职业医学, 2006, 33(3): 171-173.
- [19] 王婷婷. 壳寡糖硬脂酸嫁接物纳米材料的免疫毒性研究[D]. 浙江: 浙江大学, 2013.
- [20] 张博, 王洪波, 龙刚, 等. 氧化锌纳米材料对小鼠混合培养的脾淋巴细胞的的影响[J]. 当代医学, 2009, 15(15): 99-100.
- (收稿日期: 2015-03-16)
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 郑轻舟)

【告知栏】

《环境与职业医学》杂志唯一投稿方式系登陆主页

<http://jeom.scdc.sh.cn:8081>

近来,本刊陆续收到作者反映,有多家网站冒用本刊名义收稿并收取高额审稿费。对此,本刊郑重声明如下:我们从未委托任何机构或个人征文,本刊唯一投稿方式是通过登录《环境与职业医学》主页 <http://jeom.scdc.sh.cn:8081>,望广大作者特别小心,谨防受骗。

《环境与职业医学》杂志编辑部