

纳米二氧化钛致小鼠肝组织DNA氧化损伤的研究

宋明芬¹, 王玉文¹, 王翀², 章隆¹, 彭开良³, 吕雅英¹

摘要: [目的] 探讨纳米二氧化钛对小鼠DNA的氧化损伤作用。[方法] 将20只雌性小鼠随机分成对照组和低、中、高3个染毒组, 每组5只动物, 采用尾静脉注射染毒; 各组纳米二氧化钛染毒剂量分别为0、100、200、400 mg/kg体重; 动物染毒后24 h处死, 碘化钠法提取小鼠肝、肺、肾、骨髓、大脑组织中的DNA, 采用高效液相色谱-ECD(HPLC-ECD)法测定各组织中的8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG), 观察纳米二氧化钛对不同组织DNA的氧化损伤情况。[结果] 低、中、高3个染毒组的肝脏DNA水平分别是每10⁶个脱氧鸟苷(dG)中含8-OHdG个数(1.07±0.11)、(1.49±0.13)、(1.39±0.18), 高于对照组(0.82±0.06), 差异有统计学意义($P<0.01$); 各染毒组其他脏器组织中8-OHdG水平与对照组比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。[结论] 纳米二氧化钛可导致小鼠肝脏DNA氧化损伤增加, 对肺、肾、骨髓、大脑中的DNA氧化损伤未见影响。

关键词: 二氧化钛; 纳米; DNA氧化损伤; 小鼠; 肝脏

Oxidative DNA Damage in Liver of Mice Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles SONG Ming-fen¹, WANG Yu-wen¹, WANG Chong², ZHANG Long¹, PENG Kai-liang³, LÜ Ya-ying¹ (1. Hangzhou Seventh People's Hospital, Zhejiang 310013, China; 2. Institute for Environmental Health and Related Product Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China; 3. Department of Occupational Health and Environmental Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei 430030, China). Address correspondence to LÜ Ya-ying, E-mail: lucia_lyy@hotmail.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the oxidative DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles in mice. [Methods] Twenty female mice were randomly divided into four groups and administered with titanium dioxide nanoparticles (0, 100, 200, 400 mg/kg body weight) by intravenous injection. All the mice were sacrificed at the 24 h and samples of liver, lung, kidney, bone marrow, and brain were harvested for 8-hydroxyguanosine (8-OHdG) detection. [Results] The counts of 8-OHdG per 10⁶ dG in liver DNA of three titanium dioxide nanoparticle-treated groups (1.07±0.11, 1.49±0.13, and 1.39±0.18) were obviously higher as compared with the counts of the control group (0.82±0.06) ($P<0.01$). No change of 8-OHdG level was observed in the other tested tissues ($P>0.05$). [Conclusion] Titanium dioxide nanoparticles could elevate the oxidative DNA damage in mice liver but not in lung, kidney, bone marrow, and brain.

Key Words: titanium dioxide; nano; oxidative DNA damage; mouse; liver

纳米二氧化钛(titanium dioxide nanoparticles, TiO₂)因其粒子小、表面积大, 且具有抗紫外线、抗菌、自洁净等功效, 被广泛应用于化妆品、食品添加剂、制药等领域, 成为人们日常生活以及工业生产中最为

常见的纳米粒子之一^[1-2]。随着纳米材料的应用越来越广泛, 其毒理学作用也越来越受到国内外学者的重视。有研究报道, 纳米TiO₂不具有基因毒性, 不具有致癌性, 而且可以有效杀死HeLa癌细胞系细胞, 降低癌症复发的可能^[3-4]。但也有研究者持相反意见, 2006年2月, 国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)把TiO₂划分为人类可能的致癌物(2B类)^[5]。有研究者发现, 纳米TiO₂可导致细胞萎缩、凋亡、死亡^[6], 并具有增加癌症风险的可能^[7], 其毒作用机制之一是增加细胞内活性氧自由基(ROS), 消耗内源性抗氧化物, 从而造成机体脂质、DNA等生物大分子的氧化损伤^[8-11]。8-羟基脱氧

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2015.14411

[基金项目] 日本产业医科大学博士研究生科研促进基金

[作者简介] 宋明芬(1979—), 女, 博士, 主管医师; 研究方向: 环境医学; E-mail: songmingfen2005@163.com

[通信作者] 吕雅英, E-mail: lucia_lyy@hotmail.com

[作者单位] 1. 杭州市第七人民医院, 浙江 310013; 2. 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所, 北京 100021; 3. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 湖北 430030

鸟苷(8-OHdG)是DNA氧化损伤的主要产物,是氧化应激生物标志之一,被国内外学者广泛用在癌症、生活相关疾病(如心脑血管疾病、糖尿病、肥胖等)研究中^[12]。基于目前对纳米TiO₂毒作用研究结果的不一致性,本次实验通过测定8-OHdG,评价纳米TiO₂对小鼠DNA氧化损伤的能力,探讨其毒性作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

纳米TiO₂(北京德科岛金科技有限公司),锐钛型,动态光散射法测定粒子平均直径为10 nm,比表面积50~220 m²/g,纯度>99.9%,铁≤5 mg/kg,砷≤2 mg/kg,铅≤10 mg/kg。NaCl(上海试剂四赫维化工有限公司),EDTA-2 Na(广东光华化学厂有限公司),甲醇、NaH₂PO₄、Na₂HPO₄、表面活性剂Tween 80、NaOAc、乙腈(湖州湖试化学试剂有限公司),98%硫酸(成都市科龙化工试剂厂),碘化钠法DNA抽提试剂盒(日本和光纯药工业公司),核酸P1酶(美国sigma公司),碱性磷酸酶(德国Roche公司),超声波仪(宁波新芝科技股份有限公司,频率20 kHz,功率200~1 200 W连续可调),高效液相色谱(HPLC)柱(日本,Shiseido fine chemicals公司),UV-8020检测器(日本,东曹公司),ECD-300检测器(日本,Eicom公司)。

1.2 动物染毒

根据预实验(100 mg/kg纳米TiO₂单剂量染毒)结果显示,只有肝组织8-OHdG水平显著高于对照组,而肺、肾、骨髓及大脑组织中8-OHdG水平均未见明显改变。为了明确肺、肾、骨髓及大脑组织在更高剂量下是否会产生DNA氧化损伤,正式实验选择了100、200、400 mg/kg 3个剂量纳米TiO₂染毒组进行研究。纳米TiO₂加入含0.05% Tween 80(有助于制成稳定且分散度好的纳米粒子悬浮液^[13-14])的生理盐水中,并在冰浴中超声(20 kHz,200 W)分散30 min,制成浓度分别为20、40、80 g/L的稳定悬浮液,现配现用。悬浮液中的纳米TiO₂经电镜分析,平均粒径为(34.94±24.09) nm。无特定病原体(SPF)级6周龄雌性ICR小鼠20只,购自浙江省医学科学院,动物合格证号:SCXK(浙)2008-0033,体重约20 g。饲养室温度(23±1)℃,相对湿度(55±5)%,每天12 h明亮(8:00—20:00)、12 h黑暗(20:00—8:00),自由摄食饮

水。小鼠随机分成对照组(0 mg/kg体重)与100、200、400 mg/kg体重纳米TiO₂染毒组,每组5只。为了消除灌胃、腹腔注射等途径染毒因吸收率不同而造成纳米TiO₂进入体内剂量的差异,本次实验采用尾静脉注射方式染毒。分别向3个剂量染毒组小鼠尾静脉一次性注射0.1 mL相应剂量的纳米TiO₂,对照组小鼠注射含0.05% Tween 80、相同体积的生理盐水。

1.3 8-OHdG测定

染毒24 h后,处死小鼠,收集肝、肺、肾、两股骨骨髓及大脑组织,取肝、肺、肾、大脑组织匀浆各约100 mg及全部股骨骨髓,用DNA抽提试剂盒(碘化钠法)提取组织DNA,具体步骤按照试剂盒说明书进行。分离出的DNA经核酸P1酶和碱性磷酸酶消化成单脱氧核苷后,注入HPLC柱[Capcell Pak C18 MG, 3 μm, 4.6 mm×250(100+150) mm],柱温32℃。流动相为含8%甲醇和0.13 mmol/L EDTA-2Na的10 mmol/L NaH₂PO₄,流速0.7 mL/min。信号经UV和ECD(电压550 mV)检测,即可计算出DNA中8-OHdG水平(8-OHdG/10⁶ dG)。

1.4 统计学分析

本实验采用SPSS 19.0统计软件进行统计学分析。应用方差分析,分别对肝、肺、肾、骨髓、大脑组织DNA中的8-OHdG水平,在3个染毒组和对照组之间进行比较;因染毒剂量不呈正态分布,使用Spearman偏相关分析,对染毒剂量与肝组织DNA中8-OHdG水平进行相关分析。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 纳米TiO₂对肝组织DNA损伤的研究

纳米TiO₂染毒后,3个染毒组肝组织DNA,每10⁶个dG中含8-OHdG数分别为(1.07±0.11)、(1.49±0.13)和(1.39±0.18),分别是对照组(0.82±0.06)的1.3、1.8和1.7倍;与对照组比较,3个染毒组均显著升高,差异有统计学意义(P<0.01)。同时,通过Spearman偏相关分析,肝组织DNA中的8-OHdG水平与纳米TiO₂染毒剂量呈正相关关系(r=0.811, P<0.001)。见表1。

2.2 纳米TiO₂对肺、肾、骨髓及大脑DNA损伤的研究

与对照组比较,本次实验未观察到纳米TiO₂染毒对小鼠肺、肾、骨髓及大脑DNA中8-OHdG有所影响。表1。

表1 小鼠肝、肾、肺、骨髓、大脑组织DNA中8-OHdG水平
($\bar{x} \pm s$)

剂量组别 (mg/kg)	肝	肺	肾	骨髓	大脑
0	0.82 ± 0.06	1.68 ± 0.21	0.78 ± 0.06	1.17 ± 0.42	1.89 ± 0.52
100	1.07 ± 0.11*	1.63 ± 0.30	0.80 ± 0.12	1.22 ± 0.29	1.81 ± 0.41
200	1.49 ± 0.13*	1.76 ± 0.29	0.83 ± 0.05	1.52 ± 0.15	1.74 ± 0.41
400	1.39 ± 0.18*	1.56 ± 0.49	0.83 ± 0.07	1.45 ± 0.23	2.07 ± 0.61
F	28.67	0.48	0.93	0.73	0.42
P	<0.01	0.70	0.45	0.55	0.74

[注]*: 与对照组比较, $P < 0.01$ 。单位为每 10^6 个dG中含8-OHdG的个数。

3 讨论

纳米TiO₂, 亦称纳米钛白粉, 具有很高的化学稳定性、热稳定性、超亲水性, 被广泛应用于日常生活用品及工业产品中, 成为人们广泛接触的纳米粒子之一, 但是其毒作用尚不完全清楚。

有报道, 动物染毒纳米TiO₂后, 其肝细胞发生水肿变性、混浊肿胀、点状坏死以及炎性细胞浸润等肝损害, 乳酸脱氢酶、天门冬氨酸氨基转移酶、丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶等活性发生改变^[6, 15-17]。目前普遍认为, 纳米TiO₂造成肝损伤的机制可能是其通过氧化应激, 从而干扰机体的抗氧化防御功能^[10, 16-17]。8-OHdG是DNA氧化损伤的重要产物, 其水平的高低能特异性反映出DNA氧化损伤的严重程度, 因而被广泛用做此类损伤的生物标志^[12]。本实验测定了纳米TiO₂染毒后, 小鼠肝、肺、肾、骨髓、大脑DNA中8-OHdG的变化来反映纳米TiO₂对DNA的氧化损伤能力。结果显示, TiO₂各染毒组小鼠的肝脏DNA, 每 10^6 个dG中含8-OHdG的个数分别为(1.07 ± 0.11, 1.49 ± 0.13, 1.39 ± 0.18), 与对照组(0.82 ± 0.06)比较, 明显升高, 提示纳米TiO₂对肝脏DNA具有氧化损伤作用。该结果与以往的研究报道一致, Trouiller等^[18]通过饮水方式使小鼠摄入纳米TiO₂, 发现500mg/kg染毒组肝脏DNA中8-OHdG水平比对照组升高了1.5倍。Jugan等^[19]通过检测DNA修复能力, 来评价纳米TiO₂的DNA氧化损伤性, 结果表明纳米TiO₂可导致DNA修复功能下降, 该功能的下降可导致8-OHdG的升高。

有研究显示, 纳米TiO₂可导致肺纤维化, 甚至肺癌的发生^[20]; 肾功能出现异常, 引起尿素氮、肌酐升高^[15, 21]; 纳米TiO₂染毒的小鼠还出现大脑、脾脏等损伤^[22]。但是, 本次实验中未见染毒组小鼠肺、肾、骨髓、大脑中8-OHdG发生明显变化。Sycheva等^[1]亦研究了纳米TiO₂对DNA损伤的组织差异性, 他们通

过彗星试验, 观察到了肝组织和骨髓DNA的损伤, 而大脑DNA未见影响。纳米TiO₂致DNA氧化损伤表现出的组织差异性原因可能有以下几个方面: ①纳米TiO₂在不同组织中的浓度不同, 纳米TiO₂进入机体后, 其浓度在肝脏中最高, 其次为肺, 然后是肾等器官^[15, 23], 纳米TiO₂在不同组织的不同分布, 导致了其毒性差异; ②不同组织的DNA损伤修复功能不同, 纳米TiO₂的聚集具有降低DNA修复功能作用^[19]; ③纳米TiO₂对肺、肾、大脑、骨髓等的损伤不通过氧化应激机制。以上三种可能性有待进一步深入研究证实。

另外, 研究表明, 普通粒径的TiO₂亦能损伤细胞DNA^[24], 但另有研究却认为无DNA损伤作用^[1, 25], 本次研究未考虑常规粒径TiO₂, 今后研究中应增设常规粒径组, 以明确DNA损伤作用是由于纳米尺寸产生还是由于TiO₂本身引起。

纳米TiO₂导致肝组织DNA中8-OHdG生产增多, 而肺、肾、骨髓、大脑组织则未见其升高, 提示肝脏可能是纳米TiO₂致氧化应激的靶器官。本次研究未对这些组织的损伤类型和除氧化应激外的其他机制进行探讨, 因此, 今后进一步研究纳米TiO₂对各组织器官的毒作用及其机制时应考虑上述因素。

(志谢: 感谢日本产业医科大学环境生态研究所明星敏彦教授及其团队对纳米TiO₂悬浮液中粒子粒径的检测)

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] Sycheva LP, Zhurkov VS, Iurchenko VV, et al. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice in vivo[J]. Mutat Res, 2011, 726(1): 8-14.
- [2] Li Y, Zhang W, Niu J, et al. Mechanism of photogenerated reactive oxygen species and correlation with the antibacterial properties of engineered metal-oxide nanoparticles[J]. ACS Nano, 2012, 6(6): 5164-5173.
- [3] Furukawa F, Doi Y, Suguro M, et al. Lack of skin carcinogenicity of topically applied titanium dioxide nanoparticles in the mouse[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(4): 744-749.
- [4] Sha B, Gao W, Han Y, et al. Potential application of titanium dioxide nanoparticles in the prevention of osteosarcoma and chondrosarcoma recurrence[J]. J Nanosci Nanotechnol,

- 2013, 13(2): 1208-1211.
- [5] Baan R A. Carcinogenic hazards from inhaled carbon black, titanium dioxide, and talc not containing asbestos or asbestiform fibers: recent evaluations by an IARC Monographs Working Group[J]. *Inhal Toxicol*, 2007, 19 Suppl 1: 213-228.
- [6] Alarifi S, Ali D, Al-Doaiss A A, et al. Histologic and apoptotic changes induced by titanium dioxide nanoparticles in the livers of rats[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8: 3937-3943.
- [7] Petkovic J, Zegura B, Stevanovic M, et al. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells[J]. *Nanotoxicology*, 2011, 5(3): 341-353.
- [8] Sun Q, Tan D, Ze Y, et al. Pulmotoxicological effects caused by long-term titanium dioxide nanoparticles exposure in mice[J]. *J Hazard Mater*, 2012, 235-236: 47-53.
- [9] Magdolenova Z, Bilanicova D, Pojana G, et al. Impact of agglomeration and different dispersions of titanium dioxide nanoparticles on the human related in vitro cytotoxicity and genotoxicity[J]. *J Environ Monit*, 2012, 14(2): 455-464.
- [10] Reeves J F, Davies S J, Dodd N J, et al. Hydroxyl radicals (*OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells[J]. *Mutat Res*, 2008, 640(1/2): 113-122.
- [11] Gurr J R, Wang A S, Chen C H, et al. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells[J]. *Toxicology*, 2005, 213(1/2): 66-73.
- [12] Loft S, Svoboda P, Kawai K, et al. Association between 8-oxo-7, 8-dihydroguanine excretion and risk of lung cancer in a prospective study[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 52(1): 167-172.
- [13] 侯冬枝, 谢长生, 平其能. 表面活性剂复配制备稳定的固体脂质纳米粒混悬液[J]. *中国药科大学学报*, 2005, 36(5): 417-422.
- [14] Li X, Lenhart J J, Walker H W. Aggregation kinetics and dissolution of coated silver nanoparticles[J]. *Langmuir*, 2012, 28(2): 1095-1104.
- [15] Wang J, Zhou G, Chen C, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 168(2): 176-185.
- [16] Sha B, Gao W, Wang S, et al. Oxidative stress increased hepatotoxicity induced by nano-titanium dioxide in BRL-3A cells and Sprague-Dawley rats[J]. *J Appl Toxicol*, 2014, 34(4): 345-356.
- [17] Shukla R K, Kumar A, Vallabani N V, et al. Titanium dioxide nanoparticle-induced oxidative stress triggers DNA damage and hepatic injury in mice[J]. *Nanomedicine(Lond)*, 2014, 9(9): 1423-1434.
- [18] Trouiller B, Reliene R, Westbrook A, et al. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(22): 8784-8789.
- [19] Jugan M L, Barillet S, Simon-Deckers A, et al. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells[J]. *Nanotoxicology*, 2012, 6(5): 501-513.
- [20] Wang J J, Sanderson B J, Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells[J]. *Mutat Res*, 2007, 628(2): 99-106.
- [21] 王燕, 康现江, 丁士文, 等. 纳米二氧化钛对小鼠肝肾的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2008, 25(2): 112-114.
- [22] Xu J, Shi H, Ruth M, et al. Acute toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e70618.
- [23] Fabian E, Landsiedel R, Ma-Hock L, et al. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats[J]. *Arch Toxicol*, 2008, 82(3): 151-157.
- [24] Guichard Y, Schmit J, Darne C, et al. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells[J]. *Ann Occup Hyg*, 2012, 56(5): 631-644.
- [25] 陈荷, 邹华, 邢鸣鸾, 等. 不同粒径纳米二氧化钛对大鼠氧化应激的影响[J]. *浙江预防医学*, 2012, 24(11): 1-3, 7.

(收稿日期: 2014-06-11)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 丁瑾瑜)