

粒径小于3纳米的TiO₂ 对小鼠的肺部损伤*

李俊纲, 李晴暖, 李文新

(中国科学院上海应用物理研究所, 上海 201800)

摘要: 评估了粒径小于3 nm的TiO₂在滴注剂量为0.01 mg/只、0.1 mg/只和1 mg/只条件下对小鼠肺部造成的损伤。小鼠肺灌洗液生化指标和病理切片的结果表明,粒径小于3 nm的TiO₂对肺部造成的损伤呈剂量依赖性。与微米级TiO₂相比,粒径小于3 nm的TiO₂在较低滴注剂量时就会造成小鼠肺部“超载”;在滴注剂量相似时,比大粒径的纳米级TiO₂(>10 nm)更易逃脱巨噬细胞监视,进入肺泡间质,刺激肺泡上皮II型细胞增殖。

关键词: 纳米颗粒; TiO₂; 肺灌洗液; 病理损伤

Pulmonary Lesions Induced by TiO₂ with Diameter Less than 3 nm in Mice

LI Jun-gang, LI Qing-nuan, LI Wen-xin

(Shanghai Institute of Applied Physics, the Chinese Academy of Science,
Shanghai 201800, China)

Abstract: The pulmonary lesions induced by TiO₂ with diameter less than 3nm were evaluated in this study, after 0.01mg, 0.1mg, and 1mg TiO₂ were intratracheally instilled into lungs of mice, respectively. On based of the analysis of biochemical assays in bronchoalveolar lavage fluid and pathological examination, it can be concluded that, the lesions in lungs of mice induced by TiO₂ with diameter less than 3nm were dose-depended. Compared to the fine TiO₂, the TiO₂ with diameter less than 3nm could lead to the lungs overload more easily in mice with lower instilled doses; When compared to the nanometer TiO₂ (diameter >10nm), with similar instilled doses, they more easily escaped the surveillance of alveolar macrophages, transferred into the alveolar interstitium, and stimulated alveolar epithelial type II cells to proliferate.

Keywords: nanoparticles; TiO₂; bronchoalveolar lavage fluid; pathological lesions

中图分类号: R36

文献标识码: B

文章编号: 1812-1918(2006)06-0017-05

0 引言

TiO₂被认为是一种生物惰性物质,广泛应用于涂料、医药和化妆品工业。由于其毒性低,在毒

性实验中常被用做阴性对照^[1]。以往的研究表明,给每只大鼠一次性滴注5 mg^[2]TiO₂或滴注剂量为50 mg/kg^[3],或使其暴露在浓度为10 mg/m³的TiO₂气溶胶中4周^[4]或2年^[4],大鼠肺部不会出现明显的毒性反应。但是滴注剂量为100 mg/kg^[5]或暴露在浓度为250 mg/m³TiO₂气溶胶中4周^[6]或2年^[4],TiO₂不仅会导致大鼠肺部出现慢性炎症,甚至会出现肺部肿瘤。TiO₂在较高暴露水平条件下表现

收稿日期: 2006-08-31

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(项目编号: 2006CB705600); 上海市纳米专项基金资助项目(项目编号: 0552nm033)

出来的肺部毒性与暴露剂量超出肺的承载能力有关^[7]。上述研究中所涉及到的 TiO₂ 粒径都在微米尺度范围内。

上世纪末,纳米科技得到迅速发展,随着纳米级 TiO₂ 在国民经济和人们日常生活中越来越广泛的得到应用,其安全性受到人们的极大关注。人们发现,尺寸是 TiO₂ 产生毒性的一个重要因素。随着 TiO₂ 粒径减小,其理化性质发生了很大的变化,如单位质量表面积急剧增加,在表面产生自由基的可能性大大增加。与此同时,TiO₂ 粒径减小时,其在组织内的转运能力也增加。因此在相同质量浓度的条件下,相同组分材料在纳米级比在微米级会诱发更加严重的炎症反应^[8-13]。

目前,就我们所知,在纳米级 TiO₂ 安全性的研究中所用的 TiO₂ 粒径一般在 10~100 nm^[14-17],对粒径 10 nm 以下的 TiO₂ 的肺部毒性研究还未见报道。本文通过肺灌洗液生化指标测定和肺部病理切片观测评估了粒径小于 3 nm 的 TiO₂ 在不同滴注剂量条件下对小鼠肺部产生的损伤。

1 实验方法

1.1 动物和材料

所用的 TiO₂ 参照文献[18]合成,经原子力显微镜(DI,美国)检测,粒径小于 3 nm(图 1)。用 Millipor 超纯水制成低(0.1 mg/mL)、中(1 mg/mL)、高(10 mg/mL)三种不同浓度的悬液,悬液经超声(15 min)灭菌后用于动物实验。悬液具有很好的稳定性,长时间放置(大于 1 年)或 15 min 的超声都不会使其团聚或沉降。实验动物购自上海 Slack 实验动物中心,雄性,体重约 25 g, Kunming 品系。



图 1 TiO₂ 颗粒的原子力显微镜成像

1.2 气管滴注

40 只小鼠被随机分为 5 组,分别为正常对照组,Millipor 超纯水对照组,0.01 mg 组,0.1 mg 组和 1 mg 组,每组 8 只小鼠。每只小鼠腹腔注射约 0.2 mL 的 0.5% 苯巴比妥酸钠麻醉,然后用气管滴注法给 Millipor 超纯水对照组每只小鼠滴注 0.1 mL 的 Millipor 超纯水,给三个实验组每只小鼠滴注 0.1 mL 不同浓度的悬液,相应的 TiO₂ 的滴注量分别为 0.01 mg、0.1 mg 和 1 mg。

1.3 肺灌洗

在每组小鼠滴注 TiO₂ 3 天后,腹腔注射 0.3 mL 的 0.5% 苯巴比妥酸钠,麻醉后,腹腔主动脉抽血。从每组 8 只小鼠中随机选 5 只,打开颈腹面,暴露气管,用 1 mL 的生理盐水(37℃)灌洗肺两次,收集灌洗液(约 1.5 mL),4℃保存。测定肺灌洗液生化指标时,用 4℃ 冷冻离心机离心 10 min(1000 rpm)。上清液用于测定灌洗液中总蛋白、白蛋白、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)和乳酸脱氢酶(LDH)的浓度。总蛋白用考马斯亮兰法测定,白蛋白用溴甲酚绿比色法测定,灌洗液中总蛋白和白蛋白的浓度变化反映了气血屏障渗透性的改变。ACP 和 ALP 用 4-氨基安替吡啉法测定,ACP 主要反映吞噬细胞的功能,其浓度升高,往往说明吞噬细胞溶解或被激活,ALP 是肺泡上皮 II 型细胞膜的结合酶,其浓度升高,表示肺泡上皮 II 型细胞的活性程度增强。LDH 用 2,4-二硝基苯肼法测定,LDH 为胞浆酶,当细胞膜通透性增加或细胞死亡溶解时,LDH 大量释放,使细胞外液中 LDH 浓度增加。测定上述 5 项生化指标所用的试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.4 组织病理学观察

对每组剩下的 3 只小鼠,麻醉和腹腔主动脉抽血后,打开其胸腔取出肺组织,用 4% 的福尔马林固定,再用石蜡包埋,切片,然后固定在载薄片上。切片均用苏木精-伊红染色,光学显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 肺灌洗液内生生化指标的测定

肺灌洗液中生化指标的变化能反应外界毒物对肺部的损伤情况。经测定,本实验小鼠肺灌洗液

中总蛋白、白蛋白、ACP、ALP 和 LDH 的浓度变化如表 1 所示。三个试验组中的总蛋白的浓度比正常对照组总蛋白的浓度都有所增加,但浓度的增加不显著,没有随滴注剂量呈现出线性变化关系,LDH 的浓度接近正常水平。这说明气血屏障完整性可能没有显著变化,肺部细胞的破坏性损伤可能不存在或恢复。三个试验组中白蛋白(66.5 KD)的浓度随 TiO₂ 滴注剂量的增加而增加,在 1 mg 组显著增加,说明在 TiO₂ 的滴注剂量较高时,气血屏障对较小分子的渗透性发生了改变。三个试验组中的 ACP 和 ALP 的浓度也随 TiO₂ 滴注剂量的增加而增加,其中,0.1 mg 组内 ACP 和 ALP 的浓度与正常对照组相比有显著增加 ($P<0.05$),1 mg 组内 ACP 和 ALP 浓度与正常对照组相比有极显著增加 ($P<0.01$)。ACP 的变化表明,随着滴注剂量的增加,肺泡内的巨噬细胞受到了较大程度的激活;ALP 的变化表明随着滴注剂量的增加,肺泡上皮 II 型细胞被激活或增殖。

2.2 病理学观测

在 0.01 mg 组和 0.1 mg 组肺泡腔没有 TiO₂ 团聚物(图 2c 和图 2d),而在 1 mg 组肺泡腔(图 2e, 箭头所示),甚至支气管都有 TiO₂ 团聚物出现。0.1 mg 组内负载 TiO₂ 的巨噬细胞比 0.01 mg 组内的体积增大(图 2c 和图 2d),在 1 mg 组内负载 TiO₂ 的巨噬细胞聚集在一起(图 2e)。随着滴注剂量的增加,在 0.01 mg 组和 0.1 mg 组可观测到肺泡 II 型细胞增殖,并取代肺泡 I 型细胞使肺泡壁增厚,在 1 mg 组肺泡 II 型细胞过度增殖,使肺泡结构遭到严重破坏,在病灶区几乎看不到肺泡结构(图 2c、图 2d 和图 2e)。

2.3 生化指标和病理切片的结果分析

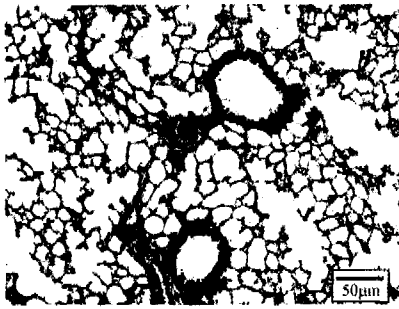
在微米级 TiO₂ 毒性的研究中,给每只大鼠一次性滴注 5 mg^[3] TiO₂ 或滴注剂量为 50 mg/kg^[3](相当于给每只小鼠滴注 0.5 mg 和 1.25 mg TiO₂),大鼠肺部不会出现明显的毒性反应。而在我们的实验中,给小鼠一次滴注 0.1 mg 的粒径小于 3 nm 的 TiO₂,就会引起肺灌洗液中 ACP 和 ALP 浓度的显著增加,肺泡巨噬细胞体积膨大,肺泡上皮 II 型细胞增殖。况且,现有的研究表明小鼠对微米级和纳米级 TiO₂ 的敏感程度没有大鼠强^{[5][9]}。可见,在粒径减小后,原本没有毒性的 TiO₂ 也会表现出毒性。另外,给小鼠一次滴注 1 mg 粒径小于 3 nm 的 TiO₂,则会引起肺灌洗液中白蛋白、ACP 和 ALP 浓度的极显著增加,负载 TiO₂ 的巨噬细胞在肺部的聚集,未被吞噬的 TiO₂ 团聚物在肺泡腔内的出现,导致肺泡 II 型细胞过度增殖以及肺泡结构的严重破坏。其中,肺泡腔内出现未被吞噬的 TiO₂ 表明所滴注的 TiO₂ 剂量已经超出了肺自身的清除能力,此时,肺灌洗液的生化指标的变化和病理学变化主要是 TiO₂ 滴注剂量超出肺的承载能力引起的,并不能真正反应 TiO₂ 的毒性。这说明在粒径减小后,巨噬细胞对它们的清除能力减弱,肺部易出现“超载”现象。在研究 TiO₂ 的毒性时,应侧重于 TiO₂ 在非“超载”情况下引起的毒性。

在我们的实验中,0.01 mg 组和 0.1 mg 组中 TiO₂ 的滴注剂量没有引起小鼠肺部“超载”,这两个实验组中肺灌洗液生化指标和病理损伤的变化能反映 TiO₂ 颗粒的真实毒性。在 TiO₂ 滴注 3 天后,0.01 mg 组和 0.1 mg 组中总蛋白的浓度都没有显著增加,LDH 接近正常水平,这也可能是气血屏

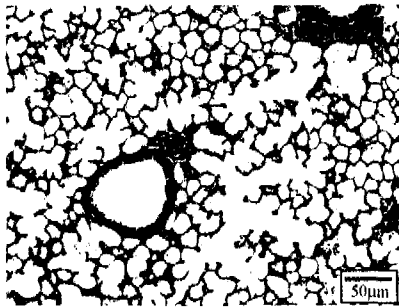
表 1 不同滴注剂量的 TiO₂ 对肺灌洗液中生化指标的影响

	总蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)	酸性磷酸酶 (U/100mL)	碱性磷酸酶(KAU/ 100mL)	乳酸脱氢酶(U/L)
正常 对照组	17.914±4.674	0.197±0.010	0.892±0.068	0.098±0.026	955.4±169.3
Millipor 对照组	25.407±7.071	0.224±0.053	0.927±0.056	0.087±0.027	1364.7±300.3
0.01 mg 组	29.295±9.979	0.309±0.114	0.998±0.060	0.128±0.039	1007.2±316.5
0.1 mg 组	26.197±4.254	0.567±0.262	1.157±0.101*	0.155±0.012*	1153.7±249.7
1 mg 组	31.477±11.369	0.848±0.266**	1.231±0.075**	0.379±0.065**	1000.0±223.9

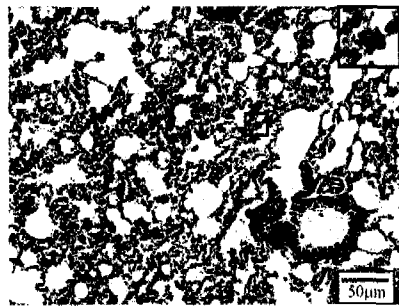
注: *表示在 $P<0.05$ 水平有显著差异; **表示在 $P<0.01$ 水平有显著差异



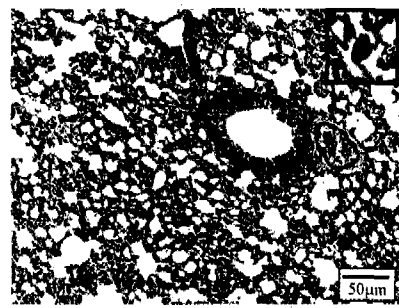
(a) 正常对照组肺病理切片



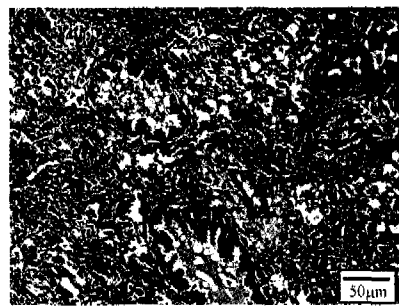
(b) Millipor 对照组肺病理切片



(c) 0.01 mg 组肺病理切片



(d) 0.1 mg 组肺病理切片



(e) 1 mg 组肺病理切片

图2 不同滴注剂量 TiO₂ 肺病理切片

障完整性和肺部细胞的破坏性损伤得到快速修复的结果。以前的研究表明纳米级 TiO₂ 对肺部造成的损伤如果不是特别严重, 较易恢复^[9]。例如, Osier 等使大鼠吸入粒径 21 nm 的 TiO₂ 颗粒, 发现 24 h 后灌洗液中总蛋白浓度显著增加, 但在 3 天后恢复到接近正常的水平^[14]。Warheit 等把粒径 10 纳米的 TiO₂ 滴注(滴注剂量为 1 mg/kg 和 5 mg/kg, 相当于每只小鼠滴注 0.025 mg 和 0.125 mg) 到大鼠肺部, 肺灌洗液中微蛋白(microprotein)和 LDH 的浓度在 24 h 后有略微升高, 但不显著, 在以后的时间点(1 周, 1 月和 3 月)恢复正常^[17]。在 Warheit 等的研究中 ALP 的浓度在任何时间点都没有显著增加, TiO₂ 对大鼠肺部没有明显的病理损伤^[17]。在我们实验中, 0.01 mg 组和 0.1 mg 组中 TiO₂ 的滴注剂量与 Warheit 等报道的 1 mg/kg 和 5 mg/kg 的滴注剂量相当, 但是两个实验组中 ALP 的浓度随滴注剂量的增加而增加, 尤其是在 0.1 mg 组, ALP 的浓度显著增加, 与这两个实验组病理切片中观察到的肺泡上皮 II 型细胞增殖结果相一致。这说明粒径小于 3 nm 的 TiO₂ 可能比粒径大于 10 nm 的 TiO₂ 更容易逃脱巨噬细胞的监视, 进入肺泡间质。在这两个实验组中, 另一个病理变化是团聚的 TiO₂ 被肺泡巨噬细胞吞噬, 引起肺泡巨噬细胞体积膨大, 这一病理变化与肺灌洗液中 ACP 的浓度变化相一致。先前的研究和报道认为, 纳米颗粒在肺部沉降后, 部分会逃出肺泡巨噬细胞的监视, 有更多机会从肺泡腔转运到肺间质, 并推测这是纳米颗粒产生毒性的一个重要机制^{[11][13][20]}。粒径小于 3 nm 的 TiO₂ 在诱发肺部毒性时, 这种机制表现得更加明显。

3 结语

1) 实验组肺灌洗液生化指标(白蛋白、ACP 和 ALP)和病理损伤(肺泡上皮 II 型细胞增殖, 肺泡壁增厚, 肺泡结构的破坏程度)随滴注剂量的变化情况, 表明粒径小于 3 nm 的 TiO₂ 对肺部造成的损伤呈剂量依赖性。

2) 粒径小于 3 nm 的 TiO₂ 更易在肺部造成“超载”, 致使肺部出现严重的病理损伤, 如肺泡结构的严重破坏, 气血屏障对较小蛋白分子渗透性的改变。

3)与有关文献报道的较大粒径 TiO_2 (>10 nm) 诱发的肺部毒性相比较,在相似的滴注剂量下,粒径小于 3 nm TiO_2 更易逃脱巨噬细胞监视,进入肺泡间质,刺激肺泡上皮 II 型细胞增殖。

参考文献

- [1] Henderson R, Driscoll K, Harkema J, et al. A Comparison of the Inflammatory Response of the Lung to Inhaled Versus Instilled Particles in F344 [J]. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1995,(24): 183-197.
- [2] Ferin J, Oberdorster G. Biological Effects and Toxicity Assessment of Titanium Dioxides: Anatase and Rutile [J]. *J. Am. Ind. Hyg. Assoc.*, 1985,(46): 69-72.
- [3] Driscoll K E, Lindenschmidt R C, Maurer JK, et al. Pulmonary Response to Silica and Titanium Dioxide: Inflammatory Cells, Alveolar Macrophage-derived Cytokines, and Histopathology [J]. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1990,(2): 381-390.
- [4] Lee K P, Trochimowicz H J, Reinhardt C F. Pulmonary Response of Rats Exposed to Titanium Dioxide (TiO_2) by Inhalation for Two Years [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1985, (79):179-192.
- [5] Driscoll K, Deyo L C, Carter J M, et al. Effects of Particle Exposure and Particle-elicited Inflammatory Cells on Mutation in Rat Alveolar Epithelial Cells [J]. *Carcinogenesis*, 1997,(18): 423-430.
- [6] Warheit D B, Hansen J F, Yuen I S, et al. Inhalation of High Concentrations of Low Toxicity Dusts in Rats Results in Impaired Pulmonary Clearance Mechanisms and Persistent Inflammation [J]. *J. Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997,(145): 10-22.
- [7] Morrow P E. Possible Mechanisms to Explain Dust Overloading of the Lungs [J]. *Fundam. Appl. Pharmacol.*, 1988, (10): 369-384.
- [8] Ferin J, Oberdorster G, Penney D P, et al. Increased Pulmonary Toxicity of Ultrafines?. I. Particle Clearance, translocation, morphology [J]. *J. Aerosol Sci* 1990 (21): 381-384.
- [9] Baggs R B, Ferin J, Oberdorster. Regression of Pulmonary Lesions Produced by Inhaled Titanium Dioxide in Rats [J]. *Vet. Pathol.*, 1997,(34):592-597.
- [10] Donaldson K, Li XY, and MacNee W. Ultrafine (nanometer) Particle Mediated Lung Injury [J]. *J. Aerosol Sci*, 1998,(29): 553-560.
- [11] Donaldson K, Stone V, Clouter A, et al. Ultrafine Particles [J]. *Occup. Environ. Med.*, 2001,(58): 211-216.
- [12] Oberdorster G. Pulmonary Effects of Inhaled Ultrafine Particles [J]. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 2001, (74): 1-8.
- [13] Oberdorster G, Oberdorster E, and Oberdorster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles [J]. *Environ. Health Perspect.*, 2005, (113): 823-839.
- [14] Osier M, and Oberdorster G. Intratracheal Inhalation vs Intratracheal Instillation: Differences in Particles Effects [J]. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1997,(40):220-227.
- [15] Bermudez E, Mangum J B, Wong B A, et al. Pulmonary Responses of Mice, Rats, and Hamsters to Subchronic Inhalation of Ultrafine Titanium Dioxide Particles [J]. *Toxicol Sci*, 2004,(77): 347-357.
- [16] Rehn B, Seiler F, Rehn S, et al. Investigation on the Inflammatory and Genotoxic Lung Effects of Two Types of Titanium Dioxide: Untreated and Surface Treated [J]. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003,(189): 84-95.
- [17] Warheit D B, Webb T R, Sayes C M, et al. Pulmonary Instillation Studies with Nanoscale TiO_2 Rods and Dots in Rats: Toxicity is not Dependent Upon Particles Size and Surface Area [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 91 (1): 227-236.
- [18] 郝彦忠, 李卫华, 何君勇, 等. 染料敏化 TiO_2 纳米晶多孔膜电极的带边移动 [J]. *化学通报*, 1998,61(7): 34-37.
- [19] Bermudez E, Mangum J B, Asgharian B, et al. Long-term Pulmonary Responses of Three Laboratory Rodent Species to Subchronic Inhalation of Pigmentary Titanium Dioxide Particles [J]. *Toxicol Sci*, 2002,(70):86-97.
- [20] Oberdorster G, Ferin J, Gelein R, et al. Role of the Alveolar Macrophage in Lung Injury: Studies with Ultrafine Particles [J]. *Environ Health Perspect.*, 1992,(97): 193-199.

作者简介

李俊纲(1975-),男,中国科学院上海应用物理研究所在读博士研究生,主要研究方向为纳米材料安全性。

李晴暖(1973-),女,中国科学院上海应用物理研究所副研究员,硕士生导师,主要研究方向为纳米的医药领域应用和生物安全性。

李文新(1943-),男,中国科学院上海应用物理研究所研究员,博士生导师,主要研究方向为纳米药物和纳米安全性。