

# 纳米二氧化钛短期经口染毒对幼年大鼠骨髓细胞的遗传损伤作用

王云 陈章健 巴特 濮吉 顾永恩 郭健 贾光

**【摘要】** 目的 探讨纳米二氧化钛灌胃染毒对幼年大鼠骨髓细胞的遗传损伤作用。方法 将 28 只清洁级雄性 SD 幼年大鼠(4 周龄),按体重以随机数字表法分为 4 组(每组 7 只),每天 1 次灌胃,分别给予 0、10、50、200 mg/kg 纳米二氧化钛[(75 ± 15) nm,锐钛矿],染毒 30 d 后取骨髓细胞涂片,进行微核试验和  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 免疫荧光检测。结果 50 mg/kg 纳米二氧化钛染毒组大鼠的  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点阳性细胞率[(37.4 ± 10.0)%],明显高于对照组[(19.8 ± 3.1)%],差异有统计学意义( $t = -17.59, P < 0.01$ )。各染毒组大鼠与对照组相比,骨髓嗜多染红细胞与正染红细胞的比值(PCE/NCE)和嗜多染红细胞微核率无明显变化。结论 短期经口摄入纳米二氧化钛,可导致幼年大鼠骨髓细胞 DNA 双链断裂增加,但对骨髓细胞微核无明显影响。

**【关键词】** 纳米粒; 钛; 大鼠; DNA 损伤; 安全

**Genotoxic effects of oral-exposed TiO<sub>2</sub> nanoparticles on bone marrow cells in young rats** Wang Yun, Chen Zhangjian, Ba Te, Pu Ji, Gu Yongen, Guo Jian, Jia Guang. Department of Occupational and Environmental Health Sciences, School of Public Health, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China

Corresponding author: Jia Guang, Email:jiaguangjia@bjmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the genotoxic effects of oral-exposed TiO<sub>2</sub> nanoparticles on bone marrow cells in young rats. **Methods** Twenty-eight SD male young rats (4 weeks old) were randomly divided into 4 groups, which were exposed to TiO<sub>2</sub> nanoparticles ((75 ± 15) nm, anatase) through intragastric administration at 0, 10, 50 and 200 mg/kg body weight (bw) every day for 30 days. The bone marrow cells were collected for micronuclei and  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX immunofluorescence analysis. **Results** The percentage of  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci-positive cells (37.4 ± 10.0)% in the 50 mg/kg bw dose group were significantly higher than that in the control group (19.8 ± 3.1)% ( $t$  value was -17.59,  $P < 0.01$ ). No significantly difference was found in polychromatic erythrocyte/normochromatic erythrocyte (PCE/NCE) ratio and PCE micronucleus rate between three experimental groups and control group. **Conclusion** TiO<sub>2</sub> nanoparticles can increase the frequency of DNA double-strand breaks in bone marrow cells, but has no effect on micronucleus of bone marrow cells in young rats.

**【Key words】** Nanoparticles; Titanium; Rats; DNA damage; Safety

二氧化钛(E171)作为白色素在食品添加剂领域具有广泛用途,其中尤以糖果类食品中用量最多,故喜爱甜食的儿童成为高暴露人群<sup>[1-2]</sup>。虽然我国对食用二氧化钛材料的理化性质(GB 25577-2010)和食品中最大使用量(GB 2760-2011)做出了明确规

定,但并未规定颗粒粒径大小。近期研究显示,食品级二氧化钛(E171)原料中有 36% 的颗粒处于纳米尺度<sup>[2]</sup>,从口香糖中提取的二氧化钛,粒径处于纳米尺度的颗粒占 93%<sup>[3]</sup>。纳米二氧化钛的小尺寸、高遮盖力和良好光泽度等特点,起到了明显改善食品口感和提升食品质量的作用,在食品添加剂领域表现出广阔的应用前景<sup>[4]</sup>。随着纳米材料安全性研究的不断深入,纳米特性所导致的独特生物学作用引起人们极大关注,常规材料的安全性数据可能不适用于纳米材料,有必要对纳米二氧化钛的食用安全性进行重新评价<sup>[5]</sup>。鉴于癌症研究国际机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.09.014

基金项目:国家重点基础研究发展计划(2011CB933402);北京市自然科学基金(7132117);高等学校博士学科点专项科研基金(20110001120027)

作者单位:100191 北京大学医学部公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系

通信作者:贾光,Email:jiaguangjia@bjmu.edu.cn

将二氧化钛归类为 2B 类可疑致癌物质,本研究拟从骨髓细胞染色体损伤和 DNA 损伤入手,揭示纳米二氧化钛经口染毒对幼年大鼠的遗传损伤作用,为进一步完善纳米二氧化钛的安全性数据库提供资料数据,并为纳米二氧化钛的有效管理与安全应用提供依据。

### 材料与方 法

1. 纳米材料:纳米二氧化钛购于上海晶纯实业有限公司(阿拉丁试剂),材料纯度为 99.9%,晶体结构为锐钛矿型,近球形颗粒,粒径为(75 ± 15) nm;将纳米二氧化钛悬浮于蒸馏水中(终浓度 1 mg/ml),40 kHz 超声波分散 15 min 后涡旋混匀,其水合粒径和 Zeta 电位值分别为 473.6 nm 和 -33.46 mV,详见文献[6-7]。材料符合食品安全国家标准(GB 25577-2010)要求,可作为食品添加剂使用。

2. 实验动物:28 只清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠(3 周龄,体重 50 ~ 60 g),购买并饲养于北京大学医学部实验动物科学部[许可证号:SCXK(京)2011-0012,SYXK(京)2011-0039]。适应性饲养 1 周后,按体重以随机数字表法分为 4 组,每组 7 只。

3. 大鼠灌胃染毒:调查显示,成人平均每天经食品摄入二氧化钛量为 5 mg 左右(约 0.1 mg/kg)<sup>[8]</sup>。参照《食品安全性毒理学评价程序》(GB15193.1-2003),采用人体摄入量的 100 倍,即 10 mg/kg,作为最低暴露剂量。将纳米二氧化钛悬浮于蒸馏水中,使用前 40 kHz 超声波分散 15 min 并涡旋混匀。根据动物体重,4 组实验大鼠分别以 0、10、50、200 mg/kg 剂量给予纳米二氧化钛悬液灌胃(灌胃体积为 1 ml/只),每天 1 次,持续 30 d,隔日更换新鲜配制的纳米二氧化钛染毒液。每日观察动物一般情况,每周称重。染毒期间,未见动物明显异常表现,各实验组动物体重无明显差异<sup>[6-7]</sup>。

4. 骨髓涂片:染毒 30 d 后处死大鼠,取两侧股骨。250 μl 小牛血清冲洗股骨骨髓腔,制成细胞悬液,细胞均匀涂布于洁净玻璃片上。待涂片自然干燥后放入甲醇中固定 5 ~ 10 min,晾干置于切片盒内保存。

5. 微核试验:骨髓细胞涂片放入 Giemsa 应用中液中染色 10 ~ 15 min,蒸馏水冲洗晾干后,显微镜下读片。每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞(polychromatic erythrocyte, PCE),观察含有微核(micronucleus, MN)的嗜多染红细胞(MNPCE)数,计算微核率(MNPCE/PCE)。同时观察 200 个红细胞中嗜多染红细胞(PCE)与正染红细胞(normochromatic erythrocyte, NCE)的比值(PCE/NCE)。

6.  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 免疫荧光检测:骨髓细胞涂片放入体积分数为 0.1% Triton X-100 破膜 15 min 后, PBS 洗 3 次;体积分数为 10% 的马血清室温封闭 1 h, 1:500 稀释的多克隆兔抗  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 抗体(美国 Abcam 公司)4 °C 过夜, PBS 洗 3 次;1:100 稀释的罗丹明标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)孵育 2 h, PBS 洗 3 次;Hoeschst 33342 染色 10 min, PBS 洗 3 次,采用体积分数 5% 甘油封片。荧光显微镜下观察,计算含有  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点的细胞比例,即  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点阳性细胞率(%)。

7. 统计学分析:采用 SPSS 12.0 软件分析。各剂量组的生物学指标数值,经单样本 K-S 检验,服从正态分布的数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。各测定指标的多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐时组间两两比较采用 Games-Howell 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 纳米二氧化钛对幼年大鼠 PCE/NCE 比值的影响:如表 1 所示,3 个纳米二氧化钛染毒组的幼年

表 1 纳米二氧化钛对幼年大鼠 PCE/NCE 比值的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

| 组别     | 剂量(mg/kg) | PCE 数量(个)    | NCE 数量(个)   | PCE/NCE     |
|--------|-----------|--------------|-------------|-------------|
| 对照组    | 0         | 120.7 ± 17.2 | 79.3 ± 17.2 | 1.71 ± 0.69 |
| 低剂量染毒组 | 10        | 110.3 ± 19.3 | 89.9 ± 19.1 | 1.33 ± 0.56 |
| 中剂量染毒组 | 50        | 100.1 ± 13.9 | 99.9 ± 13.9 | 1.04 ± 0.29 |
| 高剂量染毒组 | 200       | 108.7 ± 19.0 | 91.3 ± 19.0 | 1.27 ± 0.52 |
| F 值    |           | 1.63         | 1.64        | 1.90        |
| P 值    |           | 0.209        | 0.207       | 0.158       |

注:PCE:嗜多染红细胞;NCE:正染红细胞

大鼠 PCE/NCE 比值低于对照组,其中尤以 50 mg/kg 纳米二氧化钛暴露组 PCE/NCE 比值最低,但该差异并无统计学意义。提示幼年大鼠经口染毒 10、50、200 mg/kg 纳米二氧化钛 30 d 后,对骨髓红细胞系统的增殖并未产生明显抑制。

2. 纳米二氧化钛对幼年大鼠骨髓细胞微核率的影响:如表 2 所示,经口染毒 10、50、200 mg/kg 纳米二氧化钛 30 d 后,幼年大鼠骨髓嗜多染红细胞的微核率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。说明幼年大鼠经口染毒 10、50、200 mg/kg 纳米二氧化钛 30 d 后,并未导致骨髓细胞微核发生明显改变。

表 2 纳米二氧化钛对幼年大鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

| 组别     | 剂量 (mg/kg) | PCE 数 (个) | 微核率 (%)       |
|--------|------------|-----------|---------------|
| 对照组    | 0          | 7 000     | 0.206 ± 0.068 |
| 低剂量染毒组 | 10         | 7 000     | 0.229 ± 0.057 |
| 中剂量染毒组 | 50         | 7 000     | 0.254 ± 0.119 |
| 高剂量染毒组 | 200        | 7 000     | 0.225 ± 0.050 |

注:PCE:嗜多染红细胞;不同组别微核率比较: $F = 0.44, P = 0.726$

3. 纳米二氧化钛诱导幼年大鼠骨髓细胞  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点的形成:如表 3 所示,经口染毒 50 mg/kg 纳米二氧化钛 30 d,幼年大鼠骨髓细胞中含有  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点的细胞比例,高于对照组( $P < 0.01$ )。提示经口摄入纳米二氧化钛可诱导幼年大鼠骨髓细胞 DNA 双链断裂的发生。

表 3 纳米二氧化钛诱导幼年大鼠骨髓细胞  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点的形成( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别     | 剂量 (mg/kg) | $\gamma$ -H <sub>2</sub> AX 焦点阳性细胞率 (%) |
|--------|------------|---|
| 对照组    | 0          | 19.8 ± 3.1                              |
| 低剂量染毒组 | 10         | 19.2 ± 2.8                              |
| 中剂量染毒组 | 50         | 37.4 ± 10.0 <sup>a</sup>                |
| 高剂量染毒组 | 200        | 16.6 ± 2.3                              |

注:不同组别  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点阳性细胞率比较: $F = 8.92, P < 0.01$ ;

<sup>a</sup>与对照组比较, $t = -17.59, P < 0.01$

## 讨 论

骨髓细胞微核实验是一种目前广泛应用于遗传毒性检测的快速、简便方法,主要通过微核率和 PCE/NCE 比值的变化来反映化学物质的遗传毒性和细胞毒性,其中遗传毒性主要体现在化学物质对染色体或有丝分裂器(纺锤体)的损伤作用。当细胞发生 DNA 双链断裂时,可诱导组蛋白 H<sub>2</sub>AX 的磷

酸化( $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX)和簇集,在 DNA 双链断裂位点形成  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点,故  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点形成是 DNA 双链断裂的标志。研究显示,C57Bl/6J p<sup>mn</sup>/p<sup>mn</sup> 雄性小鼠连续 5 天饮水暴露纳米二氧化钛(25 nm,金红石-锐钛矿混晶型),在摄入总量为 50 mg/kg 二氧化钛水平下即可观察到小鼠骨髓细胞中  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点阳性细胞率升高<sup>[9]</sup>;CBAB6F1 雄性小鼠连续 7 天灌胃染毒纳米二氧化钛(33 nm 和 160 nm,锐钛矿型),可导致骨髓细胞彗星尾部 DNA 含量(染毒剂量为每天 40、200 mg/kg)和嗜多染红细胞微核率升高(仅 160 nm,染毒剂量为每天 1 000 mg/kg)<sup>[10]</sup>。可见,经口摄入纳米二氧化钛可导致小鼠骨髓细胞发生遗传损伤作用,通过遗传毒性试验研究,有利于更全面地评价纳米二氧化钛的食用安全性。

本课题组在前期研究发现,幼年和成年 SD 雄性大鼠经灌胃染毒纳米二氧化钛,可表现出显著不同的毒性效应,其中幼年大鼠更易感,肝脏和心脏都明显受损<sup>[7]</sup>。为进一步揭示纳米二氧化钛对易感年龄对象的毒性作用,笔者采用多次灌胃染毒的方式,探讨了连续 30 d 经口摄入不同剂量(10、50、200 mg/kg)纳米二氧化钛对幼年雄性大鼠骨髓细胞的遗传损伤作用。结果显示,纳米二氧化钛可诱导  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点阳性细胞率升高,但微核率和 PCE/NCE 比值无明显变化,说明经口摄入纳米二氧化钛对幼年大鼠骨髓细胞的损伤作用主要表现为 DNA 双链断裂。但纳米二氧化钛的遗传毒性并无剂量-效应关系,仅在 50 mg/kg 中剂量暴露水平下观察到  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点阳性细胞率升高,差异有统计学意义。200 mg/kg 高剂量染毒组遗传毒性效应差异无统计学意义,其可能原因是剂量过高引起纳米二氧化钛大量团聚,进而导致其经胃肠道吸收转运量减少和对机体的损伤作用降低。结合上述 C57Bl/6J p<sup>mn</sup>/p<sup>mn</sup> 雄性小鼠和 CBAB6F1 雄性小鼠实验结果<sup>[9-10]</sup>,提示单链或双链 DNA 断裂(彗星试验、 $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX 焦点形成)是纳米二氧化钛遗传毒性的典型表现。

综上所述,短期经口摄入纳米二氧化钛,可导致幼年大鼠遗传损伤,使骨髓细胞发生 DNA 双链断裂。虽然纳米二氧化钛导致 DNA 损伤的具体机制有待进一步研究,但该研究提示我们应关注纳米二氧化钛的遗传毒性,并慎重对待纳米二氧化钛在食品领域的推广使用。为保障人民群众尤其是儿童身体健康,应加强纳米二氧化钛的毒理学研究,尽快明确纳米二氧化钛的食用安全性,以指导纳米二氧化

### 钛在食品领域中的安全应用。

志谢 感谢北京大学医学部公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系陈田、宋艳双、李久存、崔泉醒、钱琴、李阳在动物实验过程中所提供的帮助

#### 参 考 文 献

[1] 李英杰, 白明. 二氧化钛的特性及在食品中的应用[J]. 食品安全导刊, 2010(8): 58-59.

[2] Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, et al. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products[J]. Environ Sci Technol, 2012, 46(4): 2242-2250.

[3] Chen XX, Cheng B, Yang YX, et al. Characterization and preliminary toxicity assay of nano-titanium dioxide additive in sugar-coated chewing gum[J]. Small, 2013, 9(9/10): 1765-1774.

[4] Rashidi L, Khosravi-Darani K. The applications of nanotechnology in food industry [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2011, 51(8): 723-730.

[5] Card JW, Jonaitis TS, Tafazoli S, et al. An appraisal of the

published literature on the safety and toxicity of food-related nanomaterials[J]. Crit Rev Toxicol, 2011, 41(1):20-49.

[6] 王云, 巴特, 陈章健, 等. 纳米二氧化钛对胃溃疡大鼠血象的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(8): 740-744.

[7] Wang Y, Chen Z, Ba T, et al. Susceptibility of young and adult rats to the oral toxicity of titanium dioxide nanoparticles [J]. Small, 2013, 9(9/10): 1742-1752.

[8] Lomer MC, Hutchinson C, Volkert S, et al. Dietary sources of inorganic microparticles and their intake in healthy subjects and patients with Crohn's disease [J]. Br J Nutr, 2004, 92(6): 947-955.

[9] 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.

[10] 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.

(收稿日期:2013-11-21)

(本文编辑:郑湃)

### · 文献速览 ·

## 100 000 人的基因组信息将在开放性网站公布

Torjesen I. Genomes of 100 000 people will be sequenced to create an open access research resource. BMJ, 2013,347:f6690.

本周一项雄心勃勃的基因组计划在英国启动,其目标是完成 100 000 人 DNA 测序并将此信息作为免费的研究资源公开共享。

这些基因信息将与供者的医学及其他表型信息相关联,有助于研究人员识别与医疗相关的基因、研发新的治疗方法以及促进个体化医疗的发展。

Stephen Beck 是英国个体基因组计划(PGP-UK)的负责人,也是伦敦大学学院癌症研究所医学基因组学的教授。他说:“此项计划具有多重重要意义。它将在英国实践建立公开的知情同意,同时满足医学科学发展过程中对丰富数据的需要”。

作为回报,这一项目的志愿供者将收到一份关于他们基

因组信息的分析报告,指出根据现行的检测手段在他们身上的基因变体及其可能预示的疾病。

基因组测序完成之后,在数据上网公布之前参与者将有 4 周的时间研究自己的基因报告。公布的基因组数据将不会与参与者全部的健康记录相关联,参与者的医学及其他信息将通过问卷方式自行提交。

公开知情同意条款不保证参与者匿名或信息保密。由于他们具有某些基因或表形特征,研究者可能会联系他们并希望他们加入相关的试验研究。

[该文摘自《英国医学杂志(BMJ)中文版》2014 年第 17 卷第 1 期第 12-13 页]