

Multiscale Nano-TiO₂ on Oxidative Damage in the Liver, Kidney and Spleen of Mice

Kai HUANG¹, Kuang-fei LIN *, Wei ZHANG, Ai-hua SU, Qiang LU, Min-bo Lan

School of Resources and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, State Environmental Protection Key Laboratory of Environmental Risk Assessment and Control on Chemical Process, Shanghai, China, 200237

Email: huangvictory@sohu.com

Abstract: To investigate the oxidative stress of nano-TiO₂ in vivo, mice were intravenously injected with 25 nm, 100 nm and fine TiO₂ suspension. After 72 hours, the superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX) and malondialdehyde (MDA) of the liver, kidney and spleen in the mice were measured. The results showed that the liver was affected most significantly, while MDA was the most sensitive indicators in antioxidant enzyme system. And it was conducted that nano-TiO₂ showed dimension effects which indicated that 25 nm group signified much more difference than 100nm group in our experiment. Therefore, it was concluded that nano TiO₂ possessed the deleterious effects on antioxidant enzymes and caused the increase of lipid peroxidation level at different degree between different organs.

Keywords: nano TiO₂; SOD; GSH-PX; MDA; mice

多尺度纳米 TiO₂ 对小鼠肝、肾和脾的氧化损伤

黄凯,林匡飞*,张卫,苏爱华,陆强,蓝闽波

华东理工大学资源与环境工程学院,国家环境保护化工过程环境风险评价与控制重点实验室,上海, 200237

Email: huangvictory@sohu.com

摘要:为研究纳米 TiO₂ 摄入后对机体造成的急性氧化损伤,将 25 nm、100 nm TiO₂ 和常规 TiO₂ 悬浮液经尾静脉注射进入小鼠体内,72 h 后检测小鼠肝、肾、脾脏中的超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和脂质过氧化产物丙二醛(MDA)的含量。结果表明:纳米 TiO₂ 对小鼠不同脏器表现出一定的氧化损伤,脂质过氧化水平有不同程度提高,其中肝脏受到的损伤最大,而 MDA 是最敏感指标,且 25 nm 组比 100 nm 组影响显著,表现出尺度效应。

关键词: 纳米 TiO₂; SOD; GSH-PX; MDA; 小鼠

1 引言

随着纳米科技的快速发展,人们接触纳米材料的机会日益增多,纳米颗粒的生物学效应正引起人们广泛关注^[1]。2000年11月以来,Science、Nature 和 Environmental Science & Technology 等杂志已先后多次发表文章,探讨纳米技术的安全性和 MNMs 的生物效应以及对健康、环境的不利影响^[2-4]。美国、欧盟和英国等分别设立研究基金支持有关纳米技术和 MNMs 对环境和健康风

基金项目: 国家自然科学基金项目(40871223, 40901148); 上海市科委纳米专项(0752nm025); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(WB0911011)

作者简介: 黄凯(1986~),男,在读博士,主要从事新型化学物质生态毒理效应及其环境风险评价方面的研究。

通讯作者: 林匡飞 Email: kflin@ecust.edu.cn

险评价的课题^[5-7]。国内在 2004 年也召开了第一次以“纳米尺度物质的生物效应”为主题的第 243 次香山科学会议,国内这方面的研究已经起步。

由于纳米 TiO₂ 具有高的化学稳定性、抗腐蚀性以及光催化活性,使其在化妆品、印刷、杀菌陶瓷纤维、塑料、去污剂、涂料、食品添加剂等众多消费领域都有着广泛应用。纳米 TiO₂ 的生物毒性的研究在国内外已得到了广泛的开展,众多研究人员采用了支气管注入法研究了纳米 TiO₂ 对动物(小鼠或大鼠)的肺部病变的影响。基本认为纳米 TiO₂ 会使肺组织间质化、诱发炎症、抗氧化酶活性升高、肺巨噬细胞吞噬能力下降,并表现出尺寸效应^[8-11],但 Warheit D B^[12] 研究不同纳米尺度 TiO₂ 与常规尺度 TiO₂ 在经支气管吸入后

对肺部诱发炎症和细胞损伤的影响,结果显示纳米TiO₂不表现出尺寸效应,同样 Jiangxue Wang^[13]等研究了不同纳米尺度TiO₂与常规尺度TiO₂经口染毒后,小鼠的急性毒性反应以及在体内的分布,结果表明纳米TiO₂对小鼠的急性毒性也并不表现出尺寸效应。

鉴于前人对纳米TiO₂的毒性研究主要集中在经口和支气管吸入的染毒方式,本文采用尾静脉注射的染毒方式来研究纳米TiO₂对小鼠肝、肾和脾的氧化应激的影响。

2 材料和方法

2.1 材料和仪器

纳米TiO₂颗粒由杭州万景新材料有限公司提供,粒径分别为25和100nm(经动态光散射粒度散射仪测定),纯度≥99.1%,常规尺度TiO₂为AR级。一次性注射器、鼠用固定器、医用眼科手术剪刀、电子天平、微量式移液器、分光光度计、低温台式离心机、电热恒温水浴锅、漩涡混合器、微量式移液器等。

2.2 试验动物

选用SPF(Specific Pathogen Free)级ICR(Institute of Cancer Research)瑞士种小鼠,六周龄,购自上海西普尔-必凯试验动物有限公司,许可证号:SCXKC2003-0002,重量在20±2g之间,雌雄各半。所有购来小鼠在实验室动物房里观察1周,使其适应环境,记录动物的行为活动、饮食、体重及精神状况。环境条件(温度:24±1℃,湿度:55%~65%,光照12h/d)。喂以标准饲料,饲料和饮用水都经高压灭菌,自由饮食。染毒前将试验动物随机分组,所有小鼠同室分笼饲养。

2.3 检测指标与方法

染毒方式采用尾静脉注射,注射体积为0.4ml/20g体重。根据前期LD₅₀实验,以及为了比较不同尺度之间在同一剂量下不同的氧化应激反应,注射剂量采用0.8g/kg体重。染毒72h后,脱臼处死小鼠,立即解剖取出肝、脾、肾,用0.9%冰冷的生理盐水清洗干净,用试纸擦干,称量并记录重量,计算脏器系数。准确称取肝、肾、脾各0.1g,用手动组织匀浆器制成2%的组织匀浆,3000r/min低温下离心10min。取上清液置于-20℃下冷藏,用于酶活性及蛋白含量的测定。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘

肽过氧化物酶(GSH-PX)测定试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供

2.4 统计分析

采用SPSS15.0软件,用LDS方差分析对各组间数据进行统计分析,采用Excel作图。

3 结果与分析

3.1 TiO₂对小鼠脏器系数的影响

Table 1. The effects of TiO₂ on the coefficients of organisms in mice
表 1. TiO₂对小鼠各脏器系数的影响

尺度	肝	肾	脾
CK	5.411	1.154	0.648
25nm	8.227**++	1.982**++	0.876*+
100nm	7.924**++	1.440**++	0.867*+
常规	6.047	1.366	0.686

注: **与对照相比差异极其显著, *与对照相比差异显著; ++与常规相比差异极其显著, +与常规相比差异显著。

从表1可以看出,25nm组、100nm组小鼠肝、肾、脾的脏器系数与对照和常规组相比都有较大提升,差异显著,其中肝、肾影响极其显著。

3.2 TiO₂对小鼠肝、肾、脾脏中SOD的影响

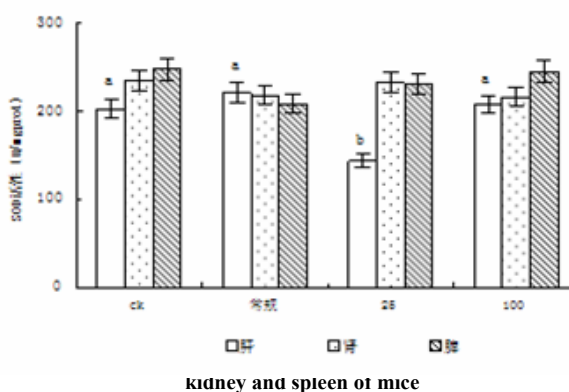


图 1. TiO₂对小鼠肝、肾、脾脏中SOD酶活性的影响

注: 不同小写字母表示各处理间在0.05水平差异显著

图1为常规和纳米TiO₂对小鼠肝、肾、脾中SOD的影响,从图中可以看出,不同器官表现出不同的差异性,不同粒径TiO₂对小鼠的肾脏和脾脏中SOD酶活性的影响不显著,且各组的肾和脾SOD酶活性差别不大。而对肝脏的影响差异显著(p<0.05),其中,25nm组与对照组相比降低了29.2%。

3.3 TiO₂ 对小鼠肝、肾、脾脏中 MDA 的影响

图 2 为 TiO₂ 对小鼠肝、肾、脾脏脂质过氧化的影响，从图中可以看出，常规 TiO₂ 和纳米 TiO₂ 对小鼠肝、肾、脾脏的脂质过氧化均影响显著，其中肝脏和脾脏的影响极显著 (p<0.01)。从对肝脏的影响可以看出，常规组和 100 nm 组与对照组相比差异不显著，而 25 nm 组与对照组相比有显著的提高，提高的比率达到 47.2%。肾脏和脾脏的变化趋势与肝脏类似。

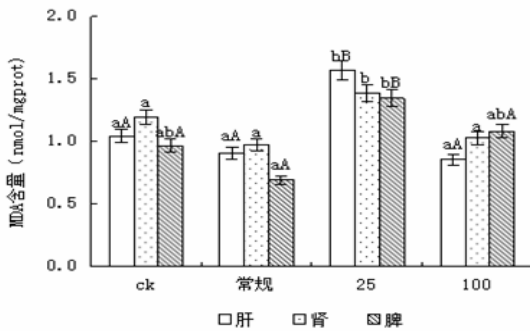


Figure 2. Effects of multiscale TiO₂ on the activity of MDA in liver, kidney and spleen of mice

图 2. TiO₂ 对小鼠肝、肾、脾脏中 MDA 含量的影响
注：不同小写字母表示各处理间在 0.05 水平差异显著
不同大写字母表示各处理间在 0.01 水平差异极显著

3.3 TiO₂ 对小鼠肝、肾、脾脏中 GSH-PX 的影响

图 3 为 TiO₂ 对小鼠肝、肾、脾脏中 GSH-PX 酶活性的影响，从图中可以看出，各脏器的 GSH-PX 酶活性的大小顺序为肾>肝>脾。对肝和脾的影响表现出显著 (p<0.05)，其中肝和脾的常规组和 100 nm 组与对照相比，差异不大，而 25 nm 组与对照相比则有较大升高，提高的比率分别为 14.4%和 14.7%。

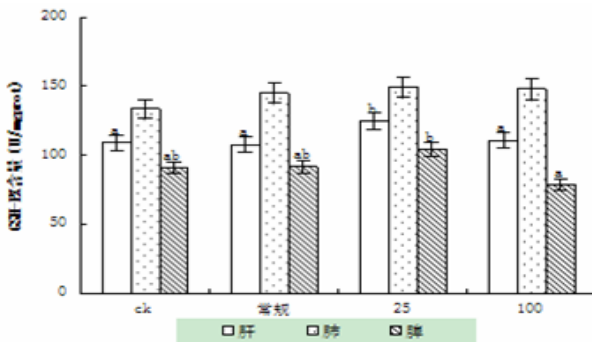


Figure 3. Effects of multiscale TiO₂ on the activity of GSH-PX in liver, kidney and spleen of mice

图 3. TiO₂ 对小鼠肝、肾、脾脏中 GSH-PX 酶活性的影响
注：不同小写字母表示各处理间在 0.05 水平差异显著

4 讨论

氧化应激已被普遍接受为是纳米颗粒物引起毒性效应的机制之一^[13,14]。在抗氧化酶体系中，超氧化物歧化酶(SOD)是催化具有高反应活性和潜在毒性的超氧自由基(O₂⁻)发生歧化反应转化为 H₂O₂，是酶促体系中最重要抗氧化酶之一。MDA 的含量反映机体脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞损伤的程度。SOD 活力的高低间接地反映了机体内清除氧自由基的能力，而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。从图 1 和图 2 的结果可以看出，SOD 只有肝脏表现除显著差异，而 MDA 对于肝、肾、脾都表现出显著差异，其中肝和脾极显著，相应的这两个指标中 25nm 组的变化趋势最明显。25nm 组肝脏中 SOD 酶与对照组相比降低了 29.2%，而相应的 MDA 则升高了 47.2%。这充分说明 25nm 组的小鼠在受到 25nm 的纳米 TiO₂ 攻击后，肝脏的抗氧化系统受到严重打乱，抗氧化能力显著下降。究其原因可能是纳米 TiO₂ 进入机体后，由于纳米 TiO₂ 主要积累在肝脏，而纳米 TiO₂ 表面容易产生大量自由基，使得肝脏受到的脂质过氧化的程度最大。这也与表 1 对脏器系数的变化趋势很吻合，这可能是当细胞的脂质过氧化水平提高时，细胞间质会产生许多空泡，使得器官的重量增加。

GSH-PX 可通过去除超氧阴离子和羟自由基以减轻和阻断脂质过氧化作用的一级引发作用，还可通过还原过氧化物来减轻和阻止二级引发作用。GSH-PX 是细胞内抗脂质过氧化酶保护系统的主要成分，是反映机体抗氧化能力的重要指标之一。从图 3 可以看出肝脏和脾脏的影响显著，其中 25nm 组与对照相比显著增加。这可能是 25nm 的纳米 TiO₂ 在小鼠体内经过 72h 后在肝脏和脾脏还保持了较高的含量^[14]，使肝脏和脾脏出于较高的氧化应激状态，GSH-PX 酶可能就是参与了 25nm 的纳米 TiO₂ 在肝脏和脾脏诱发氧化应激的防御反应。这表明受到 TiO₂ 纳米颗粒作用后，尽管细胞启动自我保护机制诱导了抗氧化酶的生成，却未能消除 TiO₂ 纳米颗粒产生的毒副作用。

纳米 TiO₂ 在经尾静脉注射进小鼠体内后，对小鼠的肝脏影响最显著，这与采用支气管注射有很大不同，但与经口的情况类似^[14]。这可能是由于肝脏是全身氧化还原机制和解毒机制最重要的器官，大部分的酶包括 SOD、GSH-PX、CAT 等都在这里合成^[15]，而这些

抗氧化酶参数在哺乳动物体内都是很有价值的生物标志物。对脾脏的影响次之，对肾脏的影响最小。纳米 TiO₂ 对小鼠抗氧化酶活性及脂质过氧化水平的影响表现出显著的尺寸效应，25nmTiO₂ 组效应最显著。这与 Jiangxue Wang, Warheit D B 的研究结果有很大差异，说明不同染毒方式对小鼠的致毒机理有很大差异。本实验的研究结果为纳米 TiO₂ 安全性评价补充不同角度的毒理学数据，有助于健全整体纳米 TiO₂ 的环境风险评价体系。

5 结论

(1) 纳米 TiO₂ 对小鼠的抗氧化系统影响最大的是肝脏，脾脏次之，肾脏最小。

(2) 纳米 TiO₂ 对小鼠的抗氧化酶和脂质过氧化的影响最大的是 MDA，GSH-PX 次之，SOD 最小。

(3) 25 nm TiO₂ 组对小鼠的抗氧化系统影响大于 100 nm 组，表现出尺寸效应。

(4) 纳米 TiO₂ 对小鼠的不同脏器表现出不同程度的氧化损伤，脂质过氧化水平有不同程度的提高。

References (参考文献)

- [1] Amato Ivan. Nanosafety checkup[J]. *Technology Review*.2004, 107(1):22-23
- [2] Vicki Colvin. The potential environmental impact of engineered nano-materials[J]. *Nature Biotechnology*.2003, 21(10):1160-1170
- [3] Service R F. Nanomaterials show signs of toxicity[J]. *Science*.2003,300(5617):243
- [4] Yang, K., Wang, X.L., Zhu, L.Z., Xing, B.S. Competitive sorption of pyrene, phenanthrene, and naphthalene on multiwalled carbon nanotubes. [J]. *Environ.Sci.Technol*.2006a.(40):5804-5810
- [5] Jon Dobson. Toxicological aspects and applications of nanoparticles in paediatric respiratory disease[J]. *Paediatric Respiratory Reviews*,2007,8 (1): 62-66
- [6] Hans C Fischer, Warren CW .Nanotoxicity: the growing need for in vivo study[J].*Current Opinion in Biotechnology*. 2007,18(6):565-571
- [7] Soto, K.F., Carrasco, A., Powell, T.G., Murr, L.E., Garza, K.M. Biological effects of nanoparticulate materials. [J].*Mater. Sci. Eng*.2006, (26): 1421-1427
- [8] Oberdörster G Finkelstein J N.Johnston C Acute pulmonary effects of ultrafine particles in rats and mice. [J].*Res Rep Health Eft Inst*.2000.96:5-4
- [9] Afaq E Abidi P.Matin R.et al.Cytotoxicity,pro-oxidant effects and antioxidant depletion in rat lung alveolar macrophages exposed to ultrafine titanium dioxide. [J].*Appl Toxicol*. 1998. 18:307-312
- [10] Oberdörster 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
- [11] Oberdörster G,Fefin J,Lehnert B E.Correlation between particle size,in vivo particle persistence and lung injury[J].*Environ Health Perspect*.1994,102(Supp1.5): 173-179
- [12] Warheit D B,Webb T R,Reed K L.Pulmonary toxicity screening studies in male rats with TiO₂ particulates substantially encapsulated with pyrogenically deposited,amorphous silica[J].*Particle and Fibre Toxicology*.2006,3(3):1-9
- [13] Jiangxue Wang, Guoqiang Zhou, Chunying Chen et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration[J].*Toxicology Letters*.2007,168:176-185
- [14] Nel A,Xia T,Madler L,Li N.Toxic potential of materials at the nanolevel[J].*Science*.2006,311(3):622-627
- [15] Moreno, I., Pichardo, S., Jos, A., Go. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally[J].*Toxicol*.2005, 45:395-402