

· 论 著 ·

TiO₂、SiO₂、Fe 纳米及微米粉体对红细胞毒性作用的比较

范轶欧, 张颖花, 刘冰, 谭成森, 麻懿馨, 金一和*

(中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 应用体外实验, 比较纳米级二氧化钛 (nm-TiO₂)、二氧化硅 (nm-SiO₂)、铁 (nm-Fe) 及其微米粉体悬液与大鼠红细胞接触后其脂质过氧化和溶血作用变化情况。方法 将不同浓度的 nm-TiO₂、nm-SiO₂、nm-Fe 及其微米粉体悬液与大鼠红细胞温育后, 测定上清液中 MDA 含量和相对溶血率。结果 在本实验所用浓度范围内, nm-SiO₂、 $\mu\text{m-SiO}_2$ 和 nm-Fe 均能诱导红细胞氧化溶血, 使 MDA 含量和相对溶血率明显升高, 并呈量效关系, 其中 nm-SiO₂ 的细胞毒性作用最强; nm-TiO₂、 $\mu\text{m-TiO}_2$ 和 $\mu\text{m-Fe}$ 诱导红细胞 MDA 含量和相对溶血率虽也有剂量依赖趋势, 但均低于 5% 的国家标准, 可视为无溶血反应; 浓度相同时, SiO₂ 和 Fe 纳米粉体组 MDA 含量和相对溶血率比微米粉体组高 ($P < 0.05$), 而 TiO₂ 则是微米粉体组高于纳米粉体组 ($P < 0.05$)。结论 同一材料不同粒径粉体之间和不同纳米粉体物质之间的红细胞毒性作用存在差异。

关键词: 纳米级; 二氧化钛; 二氧化硅; 铁; 溶血作用; 丙二醛

中图分类号: O614.411; O613.72; O614.811 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)02-0067-03

Comparative study on the cytotoxicity of nano-sized and micro-sized powders of titanium dioxide, silicon dioxide and iron on erythrocytes

FAN Yi-ou, ZHANG Ying-hua, LIU Bing, TAN Cheng-sen, MA Yi-xin, JIN Yi-he

(School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To compare the changes of hemolysis and malondialdehyde (MDA) generation in rat erythrocytes respectively treated with nano-sized and micro-sized powders of titanium dioxide, silicon dioxide and iron in vitro. **Method** The erythrocytes of rats were incubated with different concentration powders of those nano-sized and micro-sized substances mentioned above, then determined the changes of hemolysis rates and MDA levels in culture media. **Result** In the concentration ranges used by this study, nm-SiO₂, $\mu\text{m-SiO}_2$ and nm-Fe all could induce the increase of hemolytic rates and MDA levels which had some dose-response relationship. Among these chemicals, nm-SiO₂ showed the most strong cytotoxicity, nm-TiO₂, $\mu\text{m-TiO}_2$ and $\mu\text{m-Fe}$ also had some effect on inducing MDA generation, but the increases of hemolytic rates were still less than 5%, suggesting a negative effect on hemolysis. The results also showed that the MDA levels and hemolytic rates in nm-SiO₂ and nm-Fe treated groups were significantly higher than those of micro-sized powders under the same dose levels ($P < 0.05$), while MDA generations and hemolytic rates in nm-TiO₂ treated group were less than those $\mu\text{m-TiO}_2$ treated group ($P < 0.05$). **Conclusion** There are some differences in the cytotoxicity between nano-sized and micro-sized powders even the same chemicals mentioned above.

Key words: Nano-sized; Titanium dioxide; Silicon dioxide; Iron; Hemolysis; Malondialdehyde (MDA)

随着纳米技术的进步和发展, 纳米材料在医学和其他领域作为传统材料的替代品将具有巨大潜力。纳米级二氧化钛和二氧化硅是医学复合生物活性材料的重要组分, 广泛应用于人工骨、人工齿、介入导管和药物控释体系载体的制造; 纳米铁则可用于分离肿瘤细胞, 做磁共振成像造影剂和磁性导向治疗^[1], 这些材料都可以直接或间接地进入人体, 因此对纳米材料

的生物相容性及其可能存在的负面效应的研究十分必要。本实验探讨了纳米级二氧化钛、二氧化硅和铁及其微米粉体对红细胞的脂质过氧化作用和溶血作用, 拟为纳米材料的安全性积累新的资料, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料来源及粉体悬液制备

纳米二氧化钛 (nm-TiO₂) 由山东正元纳米材料工程有限公司提供, 粒径为 (15 ± 5) nm; 微米二氧化钛 ($\mu\text{m-TiO}_2$) 购自大连天和保健品公司, 粒径为 (3 ± 1) μm ; 纳米二氧化硅 (nm-SiO₂) 为舟山明日纳米材料有限公司产品, 粒径为 (10 ± 5) nm; 微米二氧化硅 ($\mu\text{m-SiO}_2$) 为 Sigma 公司产品, 粒径为 1 ~ 5

收稿日期: 2004-09-27; 修回日期: 2005-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 30271135)

作者简介: 范轶欧 (1978-), 女, 辽宁沈阳人, 硕士, 研究方向: 环境化合物的生殖毒性。

* 责任作者, 教授, E-mail: yihj@cmu.edu.cn

μm ; 纳米铁 (nm-Fe) 由中国科学院金属研究所提供, 粒径为 3~4 nm; 微米铁 (μm -Fe) 为东北大学材料研究所提供, 粒径 1~5 μm 。以上材料用生理盐水配成 1.25、2.5、5.0、10.0 和 20.0 g/L 粉体悬液, 高压灭菌后备用。

1.2 实验动物

健康清洁级 Wister 大鼠 24 只, 雌雄各半, 体重 (300±25) g, 由中国医科大学实验动物中心提供。

1.3 实验方法

Wister 大鼠用 0.4% (g/ml) 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉采血于肝素抗凝管中, 1500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 4 倍体积的生理盐水; 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 清洗 3 次后, 以生理盐水稀释成体积分数为 5% 的红细胞悬液。取 2 ml 红细胞悬液与 0.5 ml 粉尘悬液于离心管中, 置 37 °C 恒温水浴箱中温育 3 h, 每 15 min 反复混摇 5 次; 反应结束后, 以 1500 r/min 离心 15 min, 取上清液, 用 TBA 法于 355 nm 处测定光密度, 计算 MDA 含量。另取上清液稀释 10 倍, 445 nm 处测光密度, 同时用溶血剂和生理盐水作全溶和自溶对照, 按照下式计算溶血率:

$$\text{溶血率}(\%) = \frac{\text{样品吸光度} - \text{自溶血对照吸光度}}{\text{全溶血对照吸光度} - \text{自溶血对照吸光度}} \times 100\%$$

表 1 3 种纳米材料及其微米材料对大鼠红细胞 MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

粉体浓度 (g/L)	nm-TiO ₂	μm -TiO ₂	nm-SiO ₂	μm -SiO ₂	nm-Fe	μm -Fe
0	1.36±0.24		3.84±0.84		2.44±0.68	
1.25	1.49±0.42*	2.40±0.32#	25.20±2.94*#	4.75±1.35	4.62±0.79#	3.90±0.35*
2.5	1.94±0.42*#	2.85±0.48#	33.12±4.28*#	9.04±2.70#	5.53±0.84*#	4.16±1.17#
5.0	2.39±0.21*#	3.03±0.53*	35.60±2.89*#	13.34±4.11#	6.99±1.43*#	4.20±1.25#
10.0	2.71±0.49*#	4.41±1.01#	33.91±2.83*#	23.28±4.80#	7.23±1.24*#	4.38±1.07#
20.0	3.28±0.17*#	4.61±0.52#	35.38±3.29*#	29.73±3.17#	7.00±1.48*#	4.46±0.84#

* 纳米组与微米组比较, $P < 0.05$; # 各剂量组与对照组比较, $P < 0.05$; 纳米和微米粉体组间差异性比较用 t 检验。

将染毒浓度与 MDA 值取对数值后, 进行相关性分析。结果发现, nm-TiO₂ 组相关系数 $r = 0.970$ ($P < 0.01$), μm -TiO₂ 组相关系数 $r = 0.968$ ($P < 0.01$), nm-SiO₂ 组相关系数 $r = 0.780$ ($P < 0.01$), μm -SiO₂ 组相关系数 $r = 0.990$ ($P < 0.01$), nm-Fe 组相关系数 $r = 0.907$ ($P < 0.01$), μm -Fe 组相关系数 $r = 0.962$ ($P < 0.01$), 所有实验组染毒浓度与 MDA 值对数值之间均呈正相关。

2.2 溶血率

在温育过程中, 加入 nm-SiO₂ 的离心管均在 15

min 内发生完全溶血, μm -SiO₂ 和 nm-Fe 高剂量组在温育 1 h 后发生部分溶血, 其余各管没有溶血现象发生。nm-TiO₂ 剂量大于 5.0 g/L 的实验组的溶血率比 μm -TiO₂ 低 ($P < 0.05$); 在本实验设定的剂量范围内, nm-SiO₂ 导致的红细胞溶血率显著高于 μm -SiO₂ ($P < 0.05$); nm-Fe 剂量大于 2.5 g/L 的实验组的红细胞溶血率比 μm -Fe 高 ($P < 0.05$), 各剂量组溶血率随着浓度增加有升高的趋势, 并且差异有显著性 ($P < 0.05$)。这几种物质相比较, nm-SiO₂ 诱导的红细胞溶血反应最强烈, 较高浓度时几乎达到完全溶血 (表 2)。

1.4 统计分析

所有结果用均值 ± 标准差表示, 同一物质不同剂量组之间比较用方差分析, 纳米和微米粉体组间差异性比较用 t 检验和秩和检验。

2 结果

2.1 红细胞 MDA

同一种粉体所有实验组 MDA 水平都随着浓度增加而升高, 并且差异有显著性 ($P < 0.05$)。当 nm-TiO₂ 和 μm -TiO₂ 粉体悬液浓度分别大于 2.5 g/L 和 1.25 g/L 时, 红细胞 MDA 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); nm-SiO₂ 和 μm -SiO₂ 粉体悬液浓度均大于 1.25 g/L 和 2.5 g/L 时, MDA 水平显著高于对照组 ($P < 0.05$); nm-Fe 和 μm -Fe 粉体悬液浓度都在大于 2.5 g/L 时, MDA 水平高于对照组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。在相同浓度条件下, 纳米粉体和微米粉体致红细胞产生 MDA 作用比较, nm-TiO₂ 小于 μm -TiO₂ ($P < 0.05$), nm-SiO₂ 大于 μm -SiO₂ ($P < 0.05$)。反应体系中 Fe 浓度大于 2.5 g/L 时, nm-Fe 致红细胞产生 MDA 作用大于 μm -Fe ($P < 0.05$)。3 种物质比较, 以 SiO₂ 最易诱导红细胞产生 MDA, 其中 nm-SiO₂ 的作用最强 (表 1)。

表 2 3 种纳米材料及其微米材料对大鼠红细胞溶血率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

粉体浓度 (g/L)	nm-TiO ₂	μ m-TiO ₂	nm-SiO ₂	μ m-SiO ₂	nm-Fe	μ m-Fe
自溶对照	0	0	0	0	0	0
全溶对照	100	100	100	100	100	100
1.25	1.30 ± 0.31	1.47 ± 0.31	73.85 ± 9.11*	1.22 ± 0.24 ^a	0.63 ± 0.16	0.67 ± 0.17
2.5	1.50 ± 0.25	1.84 ± 0.26	80.20 ± 8.66*	7.81 ± 1.85 ^{#a}	3.09 ± 0.44* [#]	0.67 ± 0.12 ^a
5.0	1.70 ± 0.22*	2.52 ± 0.28 [#]	92.20 ± 4.45* [#]	16.96 ± 3.88 [#]	3.82 ± 0.77* [#]	1.28 ± 0.26 ^{#a}
10.0	1.87 ± 0.25* [#]	3.23 ± 0.73 [#]	96.98 ± 3.01* [#]	38.96 ± 4.98 [#]	4.69 ± 0.83* [#]	1.83 ± 0.62 [#]
20.0	3.42 ± 0.29* [#]	4.61 ± 0.21 [#]	97.33 ± 3.67* [#]	62.15 ± 5.01 [#]	12.21 ± 5.73* [#]	1.85 ± 0.44 [#]

* 纳米组与微米组比较, $P < 0.05$; # 各剂量组与对照组比较, $P < 0.05$; a: 纳米组与微米组之间比较用秩和检验, 其余均用 t 检验。

染毒浓度和溶血率进行相关性分析: nm-TiO₂ 组相关系数 $r = 0.872$ ($P < 0.01$), μ m-TiO₂ 组相关系数 $r = 0.990$ ($P < 0.01$), nm-SiO₂ 组相关系数 $r = 0.795$ ($P < 0.01$), μ m-SiO₂ 组相关系数 $r = 0.988$ ($P < 0.01$), nm-Fe 组相关系数 $r = 0.972$ ($P < 0.01$), μ m-Fe 组相关系数 $r = 0.862$ ($P < 0.01$), 所有实验组染毒浓度与溶血率之间均呈正相关。

3 讨论

溶血试验是观察体外细胞毒性试验的重要补充, 通过测定红细胞释放血红蛋白量以评价受检化合物是否对红细胞的功能或代谢造成不良影响, 在化合物的初期筛选评价中具有参考价值。本实验采用的纳米材料在实际应用中多能接触到红细胞, 因此溶血试验可反映材料的生物相容性。MDA 是脂质过氧化指标之一, 其含量可以间接反映组织和细胞的氧化损伤程度。

实验结果显示, 纳米和微米二氧化硅各剂量组的红细胞溶血率和 MDA 值均偏高, 且随剂量增加而增加, 其可能的原因是二氧化硅的针状结构对红细胞的机械破坏; 另一方面是二氧化硅在水溶液中可以产生活性氧自由基 (ROS), 如 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 、 $^1\text{O}_2$ 等, 诱发红细胞膜发生脂质过氧化, 生成 MDA, 后者可以与蛋白质的氨基发生交联作用, 使红细胞膜的成分结构发生改变, 丧失功能, 并引起溶血^[2-6]。nm-Fe 致红细胞 MDA 升高, 也可能与纳米级铁离子进入细胞, 通过 Haber-Weiss 反应产生大量 $\cdot\text{OH}$ 有关^[7], 其能使红细胞膜通透性增大, 溶血率也随之升高。在同一剂量水平, nm-SiO₂ 和 nm-Fe 导致的红细胞溶血率和 MDA 值均比其微米粉体组高, 提示在纳米数量级上粒子的数量在毒性作用中可能起关键作用, 质量浓度相同条件下, 纳米粒子的数量多。本实验中 nm-TiO₂、 μ m-TiO₂ 溶血实验为阴性, 与文献报道一致^[9,10]; nm-TiO₂ 的溶血率和 MDA 水平要比 μ m-TiO₂ 低, 也可能

与粒子的表面特性有关^[9]。nm-TiO₂, μ m-TiO₂ 和 μ m-Fe 的红细胞溶血率均低于 5%, 提示这 3 种粉体材料基本不具有溶血作用, 有良好的生物相容性; 而 nm-SiO₂ 和 nm-Fe, 作为介入体内的生物活性材料, 其安全性还有待于进一步证明。

本实验结果显示, 材料的种类以及粒径的不同, 其生物相容性也会有较大差异, 因此应通过严格的毒性测试来筛选低毒安全的生物材料, 并避免简单地套用微米材料的毒性资料来评价纳米材料。

参考文献:

- [1] 黄渝鸿, 许映霞, 万昌秀, 等. 纳米材料及其在生物医学中的应用 [J]. 化工新型材料, 2002, 30 (2): 10-12
- [2] Val Vallyathan, Xianglin Shi, Vincent Castranova. Reactive oxygen species: Their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis [J]. Environ Health Perspect, 1998, 106 (Suppl 5): 1151-1155.
- [3] James M Antonini, Christy M McCloud, Mark J Reesor. Acute silica toxicity: Attenuation by amiodarone-induced pulmonary phospholipidosis [J]. Environ Health Perspect, 1994, 102: 372-378.
- [4] Wilson MR Stone V, Cullen RT, et al. In vitro toxicology of respirable Montserrat volcanic ash [J]. Occup Environ Med, 2000, 57 (11): 727-733.
- [5] Sun MS. Effects of three kinds of inorganic dusts on lipid peroxidation of erythrocytes [J]. 中华预防医学杂志, 1990, 24 (5): 271-273.
- [6] Vallyathan V, Mega JF, Shi X, et al. Enhanced generation of free radicals from phagocytes induced by mineral dusts [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1992, 6: 404-413.
- [7] Gulumian M, van Wyk J A. Hydroxyl radical production in the presence of fibers by a fenton-type reaction [J]. Chem Biol Interact, 1987, 62: 89-97.
- [8] Vicki L Colvin. The potential environmental impact of engineered nanomaterials [J]. Nat Biotechnol, 2003, 21 (10): 1166-1170.
- [9] Chen X, Feng L, Peng R, et al. Studies on nano-particle sols of hydroxyapatite and titanium dioxide for haemo-compatibility [J]. 卫生研究, 2002, 31 (3): 197-199.
- [10] Nagaveni K, Sivalingam G, Hegde MS, et al. Photocatalytic degradation of organic compounds over combustion-synthesized nano-TiO₂ [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38 (5): 1600-1604.