



Y1761381

**PHOTOCATALYTIC TOXICITY
STUDIES ON SKIN WITH TITANIUM
DIOXIDE**

A Thesis Submitted to

Southeast University

For the Academic Degree of Master of Medicine

•

BY

ZHANG Xue-yan

Supervised by

Professor YIN Li-hong

School of Public Health

Southeast University

MAY 2010

东南大学学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得东南大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：张艳 日期：2010.6.8

东南大学学位论文使用授权声明

东南大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致。除在保密期内的保密论文外，允许论文被查阅和借阅，可以公布（包括刊登）论文的全部或部分内容。论文的公布（包括刊登）授权东南大学研究生院办理。

研究生签名：张艳 导师签名：张艳 日期：2010.6.8

纳米二氧化钛光催化产物对皮肤毒性的研究

研究生： 张学艳

导师： 尹立红

东南大学公共卫生学院

中文摘要

纳米 TiO₂ 因其具有屏蔽紫外线、消色力高、遮盖力强等诸多优异性能，广泛应用于化妆品中，成为重要的无机添加剂。但是研究发现，纳米 TiO₂ 可吸收紫外辐射产生光催化活性，生成具有高度化学活性的羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)，引起脂质过氧化反应。近年来的研究表明，氧化应激可导致细胞凋亡，并能激活丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路，促进 MMP 的表达，同时抑制胶原合成，诱导 MDA 合成、细胞膜弹性下降，导致光老化皮肤特征性的改变。

为探讨纳米 TiO₂ 光催化产物可能引发的皮肤损害，本研究选用对细胞和机体确定无损伤剂量的 UVA (365nm, 细胞试验照射剂量为 5J/cm², 动物试验照射剂量为 10J/cm²) 进行照射，通过细胞和动物整体试验分析纳米 TiO₂ (10nm 锐钛矿型、25nm 锐钛矿型、25nm 金红石型) 的毒性作用，初步探讨低剂量 UVA 照射下，纳米 TiO₂ 的细胞毒性及对大鼠皮肤光老化的影响，为纳米 TiO₂ 的应用提供一定的毒理学资料。

一、不同类型纳米二氧化钛的光催化活性比较

光催化降解亚甲蓝结果显示，仅给予紫外照射时，亚甲蓝未发生显著降解；同时给予纳米 TiO₂ 处理和紫外照射，亚甲蓝可见显著降解。纳米 TiO₂ 光催化降解亚甲蓝的效果和紫外照射剂量、纳米 TiO₂ 浓度、粒径大小及晶型有关。光照剂量越大、纳米 TiO₂ 浓度越高、粒径越小，光催化作用越强；相同粒径的锐钛矿型 TiO₂ 对亚甲蓝的氧化作用大于金红石型，金红石型 TiO₂ 未见显著的光催化作用。

二、纳米二氧化钛光催化产物对小鼠胚胎成纤维细胞的毒性作用

参照国标 Balb/c3T3 中性红摄取试验设置不同的染毒剂量组 (15.6、31.2、62.5、125、250 $\mu\text{g/mL}$)，分别通过四甲基偶氮唑盐 (MTT) 法和中性红摄取光毒性试验检测纳米 TiO₂ 对 Balb/c3T3 细胞活性的影响。结果显示，纳米 TiO₂ 染毒的高剂量组对细胞的影响要大于低剂量组，而小粒径 TiO₂ 的毒性则要大于粒径较大的 TiO₂，锐钛矿型 TiO₂ 的毒性大于金红石型。光照前后相比，光照后细胞活性小于光照前。

DCFH-DA 荧光探针测定结果显示, 与对照组比较, 各实验组细胞内活性氧水平升高, 多数剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。相同染毒时间, 随着染毒剂量的增高, 纳米 TiO_2 染毒组细胞活性氧水平升高; 紫外照射组在光照处理后 4h 内细胞活性氧水平与染毒剂量呈剂量效应关系。与 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组比较, 纳米 TiO_2 组细胞内活性氧水平升高更为明显; 相同粒径的锐钛矿型与金红石型 TiO_2 相比, 锐钛矿型 TiO_2 染毒组细胞活性氧水平高于金红石型。光照前后相比, 光照处理后 2h、4h 光照组细胞内活性氧水平高于无光照组, 4h 后, 光照组细胞内活性氧水平低于无光照组。

为探讨纳米 TiO_2 致 Balb/c3T3 细胞毒作用的损伤机制, 本研究应用不同浓度 (15.6、31.2、62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 纳米 TiO_2 染毒 Balb/c3T3 细胞, 分析了不同染毒条件下 Balb/c3T3 细胞的氧化损伤相关指标、凋亡、细胞间隙通讯功能等, 结果显示, 纳米 TiO_2 可致 Balb/c3T3 细胞氧化损伤, 细胞凋亡显著升高, 细胞间隙通讯功能下降, 锐钛矿型 TiO_2 对细胞损伤程度大于金红石型。光照与纳米 TiO_2 联合暴露组氧化损伤较纳米 TiO_2 单独暴露组严重, 凋亡率升高, 细胞间隙通讯受损更加严重。

本研究进一步分析了不同粒径、剂量和晶型的纳米 TiO_2 染毒条件下 Balb/c3T3 细胞的胶原含量、基质金属蛋白酶含量及细胞因子等指标的水平, 以探讨纳米 TiO_2 对 Balb/c3T3 细胞分泌功能的影响。结果显示纳米 TiO_2 作用于细胞后, 细胞分泌胶原的能力降低, MMP-1、MMP-3 的分泌水平上升, IL-1 水平表达升高, TNF- α 、IL-6 在纳米 TiO_2 剂量较大时分泌量亦增高; 光照后细胞培养上清胶原含量明显少于未光照组, MMP-1、MMP-3 含量高于未光照组。细胞因子含量光照前后相比, 不同纳米 TiO_2 类型及剂量变化不一, 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组光照后细胞培养上清 IL-1 含量上升, IL-6 含量下降, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组光照后细胞培养上清 IL-1 含量下降, IL-6 含量上升, TNF- α 光照前后差别无统计学意义。

三、纳米二氧化钛光催化产物对 SD 大鼠的皮肤毒性作用

40 只 SD 大鼠, 雌雄各半, 随机分为对照组、20% 纳米 TiO_2 涂抹组、UVA(10J/cm²) 组、20% 纳米 TiO_2 +UVA(10J/cm²) 组, 连续染毒 21 天。测定不同处理条件下大鼠皮肤病理、电镜及皮肤细胞氧化损伤和分泌功能, 初步分析纳米 TiO_2 与紫外光照联合染毒对大鼠的皮肤毒性。结果显示, 染毒结束各组大鼠皮肤无红斑及水肿, 皮肤组织病理未见异常, 透射电镜可见实验组成纤维细胞粗面内质网变宽。与对照组相比, 雄性大鼠纳米 TiO_2 +UV 组 TNF- α 、IL-1 含量上升, IL-6 含量降低, 但差异无统计学意义; UV 组及纳米 TiO_2 组 TNF- α 、IL-6 含量降低, IL-1 含量上升, 其中 UV 组 IL-6 含量与对照的差异有统计学意义 ($p<0.05$)。三个不同处理组相比, 纳米 TiO_2 +UV 组及纳米 TiO_2 组的 IL-6 含量较 UV 组显著升高

($p < 0.05$)。雌性大鼠三个处理组 TNF- α 含量较对照组显著上升, IL-6 含量降低 ($p < 0.05$)。不同处理组相比, 纳米 TiO₂+UV 组 IL-1 含量高于 UV 组 ($p < 0.05$), 纳米 TiO₂ 组 IL-6 含量低于 UV 组 ($p < 0.05$)。雌性大鼠纳米 TiO₂+UV 组 MDA 含量较 UV 组及纳米 TiO₂ 组含量上升 ($p < 0.05$)。四个实验组间 SOD、GSH-Px 差异无统计学意义。

以上研究结果表明, 纳米 TiO₂ 经紫外照射后可产生羟自由基, 产生羟自由基的量与纳米 TiO₂ 的浓度、粒径、晶型及紫外照射剂量有关。高水平的纳米 TiO₂ 光催化产物有显著细胞毒性, 可抑制细胞增殖, 导致细胞氧化损伤, 引起细胞凋亡和细胞间隙通讯功能障碍, 并可影响细胞分泌功能, 导致细胞光老化的发生及促进炎症反应的发生。动物实验表明, 在实验所选择的受试时间和光照剂量下, 虽未见大鼠皮肤光老化的发生, 但是纳米 TiO₂ 可诱发皮肤脂质过氧化损伤, 并诱导皮肤细胞分泌过量的炎性因子参与炎症反应。

综上所述, 纳米 TiO₂ 细胞及动物毒理学实验研究表明, 纳米 TiO₂ 的皮肤毒性与粒径、晶型及紫外照射有关, 纳米 TiO₂ 粒径越小其皮肤毒性越高, 锐钛矿型 TiO₂ 毒性显著高于金红石型, 在低剂量紫外光照下纳米 TiO₂ 即可产生较高水平的羟自由基, 从而加重细胞及皮肤组织的损伤程度。

关键词: 纳米 TiO₂; 紫外光照; 光催化活性; 羟自由基; 细胞毒性; 皮肤毒性

THE SKIN TOXICITY OF PHOTOCATALYTIC TITANIUM DIOXID NANOPARTICLES

ZHANG Xue-yan Supervised by Professor YIN Li-hong
School of Public Health Southeast University

ABSTRACT

Titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles have been used in cosmetics as an important inorganic additives. More and more studies have suggested that, with UV irradiation, TiO_2 nanoparticles show high photocatalytic activity, and generate hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) which is the main active material inducing lipid peroxidation. Recent studies demonstrated that oxidative stress could induce cell apoptosis, activate mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways, and promote the overexpression of MMP. It can also inhibit collagen synthesis, induce MDA generation, decrease the membrane flexibility, and cause the photoaging-characteristic changes in skin.

To further understand the effects of photocatalytic products of TiO_2 nanoparticles on the skin, the cytotoxicity and skin toxicity of TiO_2 nanoparticles (10-nm anatase, 25-nm anatase, 25-nm rutile, and 200-nm anatase) were carried out on mouse embryonic fibroblast cells and rats respectively under the UVA irradiation in combination in this study.

1. The photocatalytic activity of different sizes and crystal structures of titanium dioxide nanoparticles

The photocatalytic activity of TiO_2 nanoparticles particles was evaluated by degradation of methylene blue. The results showed that, compared with UVA irradiation only, the degradation rate of methylene blue significantly increased when treated both TiO_2 particles and UVA. There were significant association between the degradation rate of methylene blue and the exposure dose, sizes, and crystal structure of TiO_2 particles and the dose of UVA irradiation.

According to the exposure dose of UVA and TiO_2 particles increasing and the sizes of TiO_2 particles decreasing, the degradation rate of methylene blue increased rapidly ($p < 0.05$). And the photocatalytic effect of anatase-type was higher than that of rutile-type ($p < 0.05$), while there was no statistic significance when exposed to rutile-type compared with control group.

2. Cytotoxicity of photocatalytic products of TiO_2 nanoparticles on Balb/c Swiss mouse embryo fibroblasts (Balb/c3T3) cells

To evaluate the cytotoxicity of photocatalytic products of TiO₂ nanoparticles on Balb/c3T3 cells, MTT assay and neutral red dye uptake assay were determined with the exposure dose of 15.6, 31.2, 62.5, 125, and 250 µg/ml. The results showed that there was a significant difference of cell activity between the high-dose group and the low- or moderate-dose groups with exposure of TiO₂ nanoparticles. 10-nm anatase-type TiO₂ particles could induced significantly decreased Balb/c3T3 cells activity compared with 25-nm anatase-type TiO₂ particles ($P<0.05$), while 25-nm rutile-type TiO₂ particles showed a slight cytotoxicity. Balb/c3T3 cells activity reduced significantly when were exposed both TiO₂ particles and UVA irradiation.

Reactive oxygen species in the Balb/c3T3 cells were detected with DCFH-DA fluorescence probe. Compared with control groups, the level of reactive oxygen species in the treatment groups were significantly increased. The combined TiO₂ particles and UVA exposure induced reactive oxygen species in a dose-dependent manner within 4 hours after UVA irradiation. There were significant association between the level of reactive oxygen species and sizes or crystal structure of TiO₂ particles.

The mechanism of cytotoxicity induced by TiO₂ nanoparticles was explored with the assay of oxidative damage, apoptosis, and gap junctional intercellular communication (GJIC). The results showed that Balb/c3T3 cells exposed with TiO₂ particles and UVA respectively were induced higher level of oxidative damage and apoptosis as well as reduced function of GJIC compared with control groups. Moreover, a synergetic effect between TiO₂ particles and UVA exposure was observed ($p<0.05$).

To explore the effect of TiO₂ nanoparticles on secretory function of Balb/c3T3 cells, the cells exposed to different sizes and crystal structure of TiO₂ particles at different doses were evaluated for the assay of collagen content, matrix metalloproteinases (MMP), and cytokines. The results showed that TiO₂ nanoparticles significantly reduced the expression of collagen and induced the secretion of MMP-1 and MMP-3 by Balb/c3T3 cells. IL-1 level of Balb/c3T3 cells significantly increased when exposed to TiO₂ particles. Significant differences in TNF- α and IL-6 were observed between the high-dose group and the low- or moderate-dose groups with exposure of TiO₂ particles. Collagen content and matrix metalloproteinases of Balb/c3T3 cells changed significantly when exposed with TiO₂ particles and UVA irradiation in combination. The result of cytokines assay indicated that when combined with UVA irradiation, 200-nm TiO₂ particles could induce significantly increased IL-1 level and decreased IL-6 level in the supernatant of Balb/c3T3 cells,

while 10-nm TiO₂ particles induced the statistically decreased level of IL-1 and increased level of IL-6. There was no significant difference in the level of TNF- α between the combined TiO₂ particles and UVA exposure group and TiO₂ exposure group.

3. Skin toxicity of photocatalytic products of TiO₂ nanoparticles on Sprague–Dawley (SD) rats

40 SD rats of half gender were randomly divided into four groups as follows: control group, 20% TiO₂ treatment group, UVA irradiation group with the dose of 10J/cm² and combined 20% TiO₂ and UVA-irradiation (with the dose of 10J/cm²) group. The rats of all treatment groups were administered daily for 21 days. Toxic effects were determined with histopathology, transmission electron microscopy (TEM), and oxidative damage and the secretory function of the skin cells. The results showed that no erythema or edema was observed on the skin and histopathologic evaluation of skin tissues showed no pathologic lesions. Ultrastructural analysis indicated rough endoplasmic reticulum of the fibroblasts expanded. A synergetic effect between TiO₂ particles and UVA exposure on lipid peroxidation was observed only in female rats ($p < 0.05$). Compared with control group, the levels of TNF- α and IL-1 were increased and the level of IL-6 was reduced in the combined TiO₂ and UVA treatment group, while the levels of TNF- α and IL-6 were reduced and the level of IL-1 was increased in the TiO₂ or UVA treatment group in the male rats (though these changes were not statistically significant). The increased levels of TNF- α and IL-1 and the decreased level of IL-6 were observed among all the treatment groups compared with control in the female rats ($p < 0.05$). Moreover, the level of IL-1 in the combined TiO₂ and UVA treatment group was significantly higher than that in UVA irradiation group ($p < 0.05$), and the level of IL-6 in the TiO₂ treatment group showed significantly reduced compared with UVA irradiation group ($p < 0.05$).

The results suggested that, with UV irradiation, TiO₂ nanoparticles could generate high level of hydroxyl radical that be associated with the exposure dose, sizes, and crystal structure of TiO₂ particles and the dose of UVA irradiation. Photocatalytic products of TiO₂ nanoparticles could suppress cell proliferation, induce cell oxidative damage, cause cell apoptosis and dysfunction of GJIC, and affect cell secretory function and photoaging emergence and inflammation response. The result of animal experiments showed that TiO₂ nanoparticles could induce lipid peroxidation and overexpression of inflammatory factors of rats skin.

It is concluded that skin toxicity of TiO₂ nanoparticles is associated with sizes and crystal

structure of TiO₂ nanoparticles and the dose of combined UVA irradiation. According to the size of TiO₂ nanoparticles diminishing, skin toxicity induced by TiO₂ nanoparticles increases significantly. With the same size of TiO₂, the toxicity induced by anatase-type is significantly more serious than that induced by rutile-type. Combined with low dose of UVA irradiation, TiO₂ nanoparticles could generate high level of hydroxyl radical which may result in the injury of cells and skin.

key words: Titanium dioxide nanoparticles; Ultraviolet irradiation; Photocatalytic activity; Hydroxyl radical; Cytotoxicity; Skin toxicity

主要缩略词表

ABBREVIATION

英文缩写	英文全称	中文全称
Balb/c3T3	Balb/c Swiss mouse embryo fibroblasts cells	小鼠胚胎成纤维细胞
TiO ₂	Titanium Dioxide	二氧化钛
DMEM	dulbecco's modified eagle medium	培养基
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
SEM	Scanning Electron Microscopy	扫描电镜
TEM	Transmission Electron Microscopy	透射电镜
XRD	X-Ray Diffractometer	X 射线衍射分析仪
·OH	Hydroxyl Radicals	羟基自由基
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide	四甲基氮唑蓝
LDH	Lactate Dehydrogenase	乳酸脱氢酶
MDA	Malondialdehyde	丙二醛
SOD	Superoxide Dismutase	超氧化物歧化酶
GSH-Px	alkaline phosphatase	谷胱甘肽过氧化物酶
Hyp	Hydroxyproline	羟脯氨酸
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
MMP-1	Matrix Metalloproteinase-1	基质金属蛋白酶-1
MMP-3	Matrix Metalloproteinase-3	基质金属蛋白酶-3
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
IL-1	Interleukin-1	白细胞介素-1
IL-6	Interleukin-6	白细胞介素-6

目 录

INDEX

中文摘要	I
英文摘要	IV
主要缩略词表	VIII
前 言	1
第一章 不同类型纳米二氧化钛的光催化活性比较.....	4
第一节 纳米二氧化钛的表征.....	4
第二节 不同类型纳米二氧化钛的光催化活性比较.....	8
第二章 纳米二氧化钛光催化产物对小鼠胚胎成纤维细胞的毒性作用.....	11
第一节 纳米二氧化钛光催化产物的一般细胞毒性.....	11
第二节 纳米二氧化钛光催化产物的细胞氧化损伤.....	22
第三节 纳米二氧化钛光催化产物对细胞凋亡及细胞间隙通讯的影响.....	29
第四节 纳米二氧化钛光催化产物对细胞分泌功能的影响.....	36
第三章 纳米二氧化钛光催化产物对SD大鼠的皮肤毒性作用.....	46
第一节 纳米二氧化钛光催化产物对大鼠皮肤的光老化作用.....	46
第二节 纳米二氧化钛光催化产物对大鼠皮肤的氧化损伤作用.....	52
总 结	55
参考文献	56
综 述	61
作者简介	68
致 谢	69

前 言

INTRODUCTION

纳米材料粒径小(1~100 nm),比表面积大,表面活性高,具有巨大的表面效应、量子效应、界面效应,可以产生异常吸附能力、化学反应能力和光催化能力等。因此,被广泛应用于光电子、磁力、医学影像、化妆品、涂料、催化剂和材料工业中^[1-3],使人们在日常工作和生活中接触到纳米材料的机会越来越多。由于纳米材料具有的特殊性能,使其可能产生与普通物质不同的生物学效应^[4]。流行病学研究已提示大气中纳米级颗粒的浓度与敏感个体健康损害密切相关^[5]。美国、欧盟、日本已投入巨资展开纳米材料的生物安全性研究,我国也将其列入国家“973”重点基础研究规划项目。科学、客观地评价纳米材料的生物安全性已迫在眉睫。

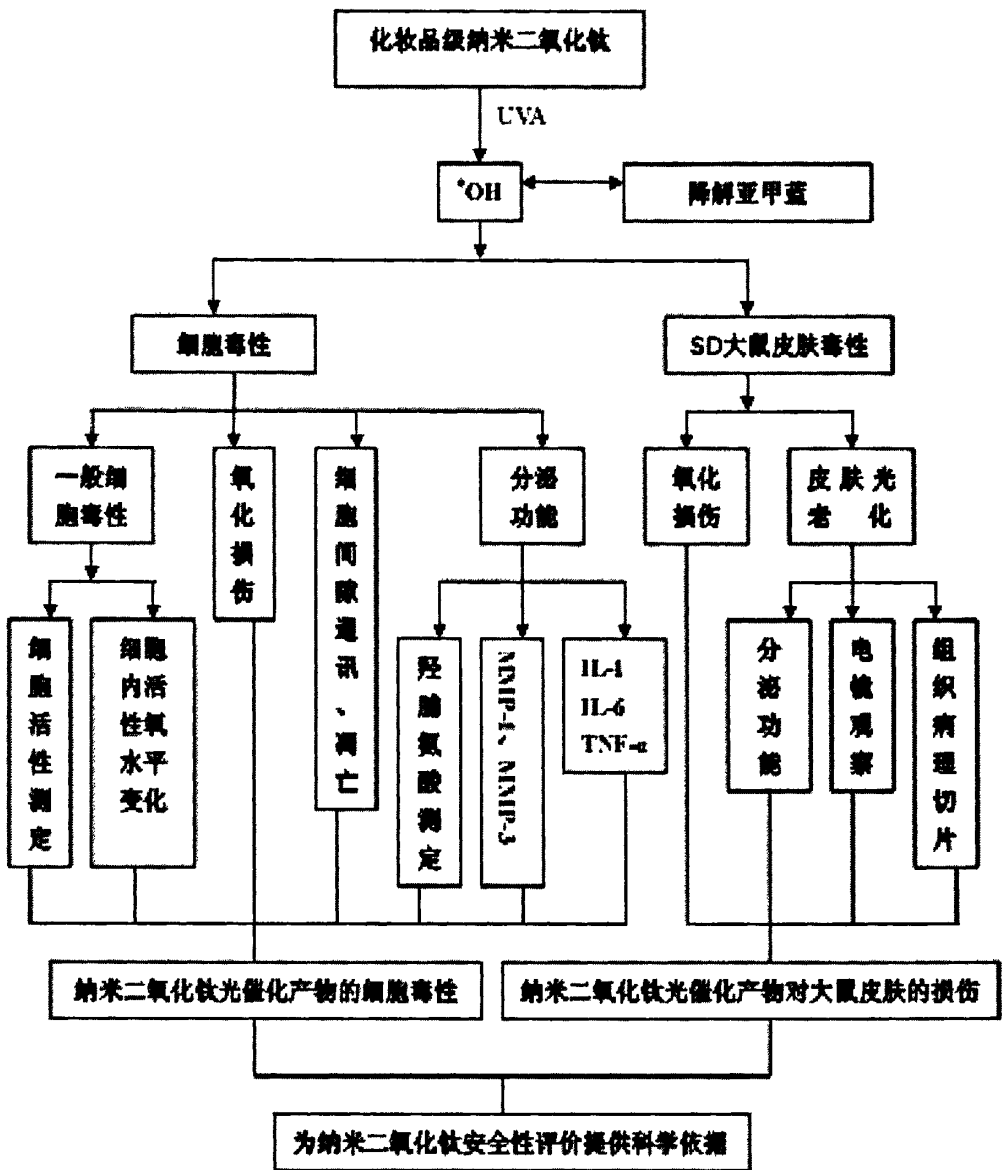
纳米 TiO₂ 在防晒化妆品中的应用广泛,其屏蔽紫外线、消色力高、遮盖力强、色相好、色谱广等诸多优异性能,已越来越受到国内外化妆品配方设计师的青睐,成为高档化妆品中最重要和用量最大的无机添加剂^[6]。理论上认为,当晶体粒径小于 100nm 时,纳米 TiO₂ 就失去对可见光的散射力,变成透明型 TiO₂。为保证足够的透明度,商品透明型 TiO₂ 原级粒径一般控制在 10-50nm^[7]。这种透明型 TiO₂ 具有能显露皮肤真面目的透明度,而且具有更强的紫外线屏蔽作用,对阳光中的长波紫外线 UVA (400-320nm)、中波紫外线 UVB (320-280nm) 和短波紫外线 UVC (280-200nm) 都有很强的屏蔽作用。

然而,越来越多的研究表明,纳米 TiO₂ 吸收紫外辐射可以产生光催化活性,生成具有高度化学活性的羟基自由基($\cdot\text{OH}$)及 H₂O₂^[8]。在整个光催化反应中, $\cdot\text{OH}$ 起着决定性的作用。 $\cdot\text{OH}$ 是一种非选择性的具有高氧化活性的自由基,它能够很容易地氧化各种有机物和无机物,氧化效率高,反应速度快^[9-10],攻击的靶点是多不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化反应。细胞 90% 以上为膜性结构,细胞膜上含有的多不饱和脂肪酸是最易受到自由基攻击的生物分子。在生命过程中,自由基通常维持在一个正常的生理水平,这种状态与人体健康密切相关,一旦氧化抗氧化系统的动态平衡发生紊乱或破坏,就会导致体内自由基浓度过高,造成生命反应异常,加速细胞衰老而诱发疾病^[11-12]。机体内自由基代谢失衡,可导致一系列的连锁反应,引起不同程度的细胞毒性,并导致瞬时的或不可逆的损伤。相关研究表明,自由基通过氧化应激可导致细胞凋亡^[13],并能激活丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路,促进 MMP 的表达,能抑制成纤维细胞胶原合成,引起 MDA 增多、细胞膜弹性下降、细胞变僵硬,导致光老化皮

肤特征性的改变^[14-15]。

为了进一步探讨纳米 TiO₂ 光催化产物可能引发的皮肤损害，针对纳米 TiO₂ 光催化产物的性质，本研究选用对细胞和机体确定无损伤剂量的 UVA（365nm，细胞试验照射剂量为 5J/cm²，动物试验照射剂量为 10 J/cm²）进行照射，对化妆品级纳米 TiO₂（10nm 锐钛矿型、25nm 锐钛矿型、25nm 金红石型）和 200nm 锐钛矿型 TiO₂，在以 Balb/c3T3 细胞为靶细胞，进行细胞毒性研究的基础上进行动物实验，初步探讨在有无 UVA 照射的情况下，纳米 TiO₂ 的细胞毒性及其对大鼠皮肤光老化的影响，为纳米 TiO₂ 的安全应用提供一定的科学依据。

技术路线:



第一章 不同类型纳米二氧化钛的光催化活性比较

Photocatalytic Activity of Different Titanium Dioxide Nanoparticles

纳米 TiO₂ 的光催化性能与本身的晶相、结晶度、粒径和分散性等密切相关，特别是纳米 TiO₂ 粒径的减小能使晶体的光吸收边蓝移和粒子的比表面积增大，这有利于光催化反应速率和效率的提高^[16]。通常认为，在多相光催化降解有机物中，羟基自由基 (·OH) 是起主要作用的活性物质之一。因此，了解纳米 TiO₂ 结构特征对其羟基自由基的生成及光催化活性的影响，是探讨纳米 TiO₂ 光催化相关生物学效应的基础和前提。本章通过亚甲蓝降解实验，对具有不同表征特点的受试纳米 TiO₂ 材料光催化降解亚甲蓝的能力进行了分析比较。

第一节 纳米二氧化钛的表征

纳米材料的生物学效应依赖于粒径、化学组成和表面积等参数。本文对10nm锐钛矿型、25nm 锐钛矿型、25nm金红石型等化妆品级纳米TiO₂和200nm锐钛矿型TiO₂相关特征参数进行了表征。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

受试纳米TiO₂材料类型有：10nm锐钛矿型、25nm 锐钛矿型、25nm金红石型、200nm锐钛矿型TiO₂，购自杭州万景新材料有限公司。材料参数见表1.1。

表1.1 不同粒径纳米TiO₂的主要技术指标

粒径	外观	组成	纯度	比表面积
10nm	白色疏松粉末	锐钛矿型	>99.0%	>210m ² /g
25nm	白色疏松粉末	锐钛矿型	>99.5%	>50m ² /g
25nm	白色疏松粉末	金红石型	>99.0%	>55m ² /g
200nm	白色疏松粉末	锐钛矿型	>98.0%	>4m ² /g

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

DMEM 高糖培养基 (美国 Gibco 公司) 将 DMEM 培养基干粉充分溶于 850mL 双蒸水 (ddH₂O) 中，加入 2mmol/L L-谷氨酰胺、100U/mL 青霉素、100μg/mL 链霉素，放置 4℃ 冰箱过夜后，用 5.6%的 NaHCO₃ 调 pH 值在 7.0-7.2 之间，双蒸水定容至 1000mL，抽滤除菌，

分装，4℃保存。临用前加入小牛血清使体积分数为10%。

国产胎牛血清(杭州四季青) -20℃冰箱保存备用。

1.2.2 主要仪器

Hitachi S-4800 场发射扫描电子显微镜 (日本日立公司);

Tecnai G2 F20 S-Twin 场发射透射电子显微镜 (美国FEI公司);

X'Pert Pro 型X射线衍射分析仪 (XRD, 荷兰PANalytical公司);

MALVERN激光粒度仪 (Nano-ZS90, 英国马尔文公司);

超声细胞粉碎机 (宁波海曙科生超声波有限公司)。

1.3 实验方法

10nm锐钛矿型、25nm 锐钛矿型、25nm金红石型及200nm锐钛矿型TiO₂用小牛血清分别配置成一定浓度，用超声细胞破碎机超声分散，功率33W，超声处理10 min，制成纳米TiO₂悬液^[17]。分散后加入DMEM培养基，使小牛血清的体积分数为10%，测定分散度。

2. 结果

2.1 形态观察

经透射电子显微镜观察，锐钛矿型纳米 TiO₂呈球形，金红石型纳米 TiO₂呈棒状，均出现一定程度的团聚现象 (图 1.1)。

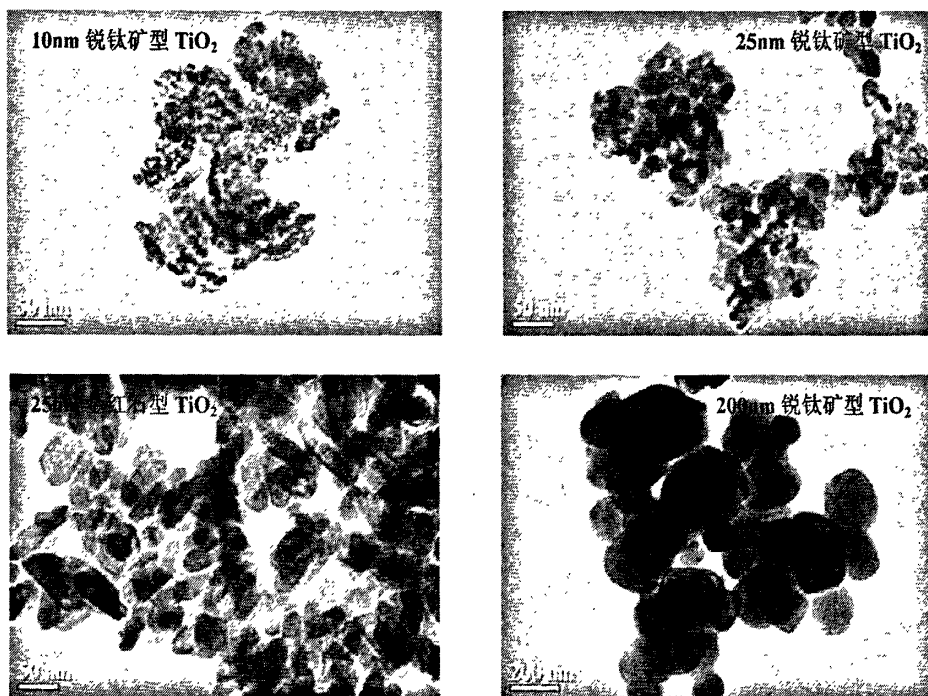


图1.1 不同类型纳米TiO₂透射电镜 (TEM) 图片 ($\times 10^4$)

2.2 结构分析

不同粒径及晶型 TiO_2 粒子的 X 射线衍射 (X-Ray Diffraction, XRD) 图谱见图 1.2。为晶体状态, 衍射峰值窄且尖锐, 晶粒生长完全。计算结果显示, A 材料粒径约为 10nm, B、C 两个材料的粒径约为 25nm, D 材料的粒径约为 200nm, 与电镜结果相符合, 也证明了 A、B、D 为锐钛矿型 TiO_2 , C 为金红石型 TiO_2 。

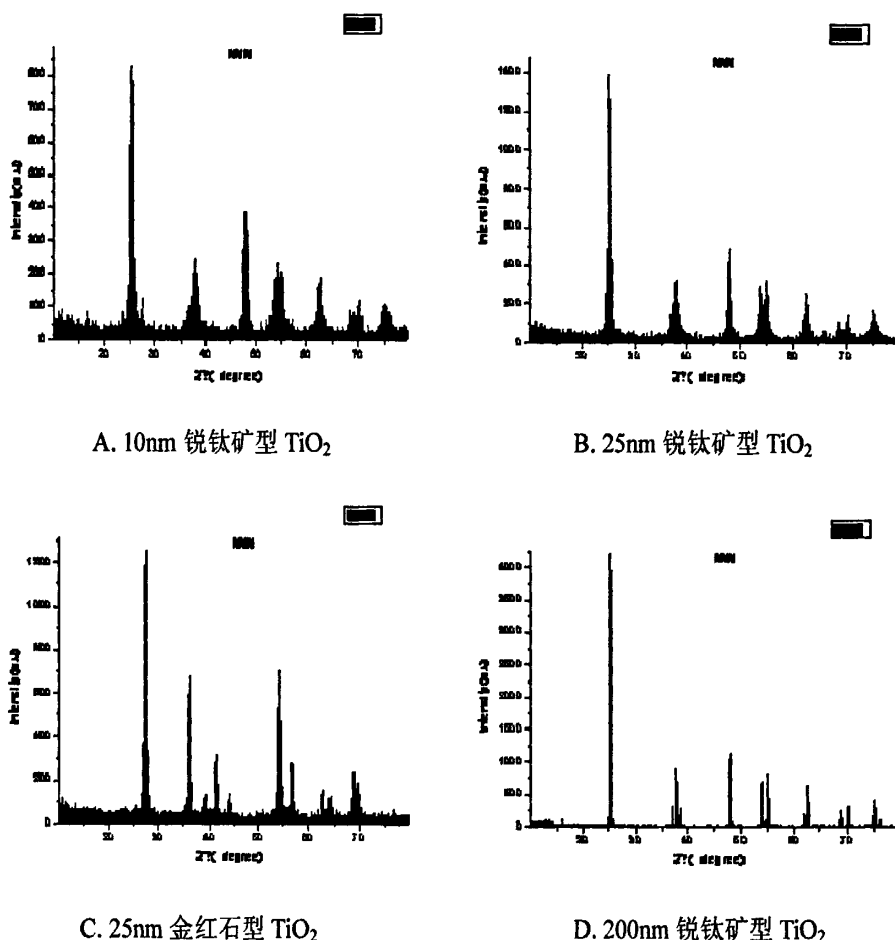
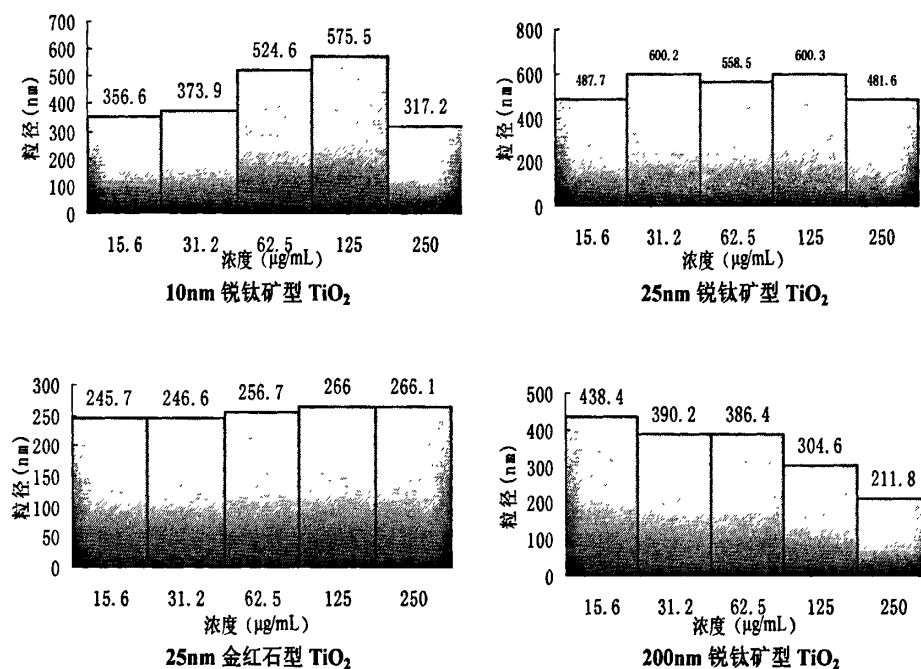


图 1.2 不同类型纳米 TiO_2 XRD 衍射图谱

2.3 粒径分析

经粒径分析仪测定, 在 DMEM 培养基中分散后, 不同粒径及浓度的纳米 TiO_2 超声分散后粒径不同, 表现为: 25nm 锐钛矿型 TiO_2 粒径最大; 随着浓度的增加, 金红石型 TiO_2 粒径增加, 200nm 锐钛矿型 TiO_2 粒径减小。10nm、25nm 锐钛矿型 TiO_2 粒径随浓度变化无规律 (图 1.3)。

图 1.3 不同类型纳米 TiO₂ 在不同浓度下的粒径分布

3. 讨论

了解受试纳米 TiO₂ 的表征特点对进一步探讨其生物学效应十分重要。本研究结果提示，纳米 TiO₂ 的水合粒径随着其浓度的变化而变化，锐钛矿型纳米 TiO₂ 的团聚现象比金红石型严重，锐钛矿型纳米 TiO₂ 间比较，25nm 锐钛矿型 TiO₂ 团聚现象较 10nm、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 严重。因此，对受试物分散剂的选择与处理方式直接影响其分散状态，充分考虑这一点是实验结果客观可信的重要保证。本课题组的前期研究结果显示，纳米 TiO₂ 在血清中稳定性最好，不易沉降；同时经过超声波（33W，10min）处理，可达到较好的分散效果^[17]，本研究中受试纳米 TiO₂ 的分散均应用该分散条件。

第二节 不同类型纳米二氧化钛的光催化活性比较

通过亚甲蓝降解实验,初步观察纳米 TiO₂ 光催化后羟自由基产生的特点,以及纳米 TiO₂ 晶型、尺寸、光照等因素对羟自由基产生的影响,提供纳米 TiO₂ 光催化活性物质产生的客观依据,为进一步探讨纳米 TiO₂ 光催化活性的生物学效应奠定实验基础。

1. 材料与方法

1.1 实验材料 同本章第一节 1.1。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 主要试剂

亚甲蓝购自南京奥多福尼生物科技有限公司,用时将其溶于蒸馏水,使其最终浓度为 10mg/mL。

1.2.2 主要仪器

紫外分光光度计 (752 型,上海第三分析仪器厂);

电子天平 (BS210S,北京赛多利斯天平有限公司);

离心机 (LD5-2A,北京医用离心机厂);

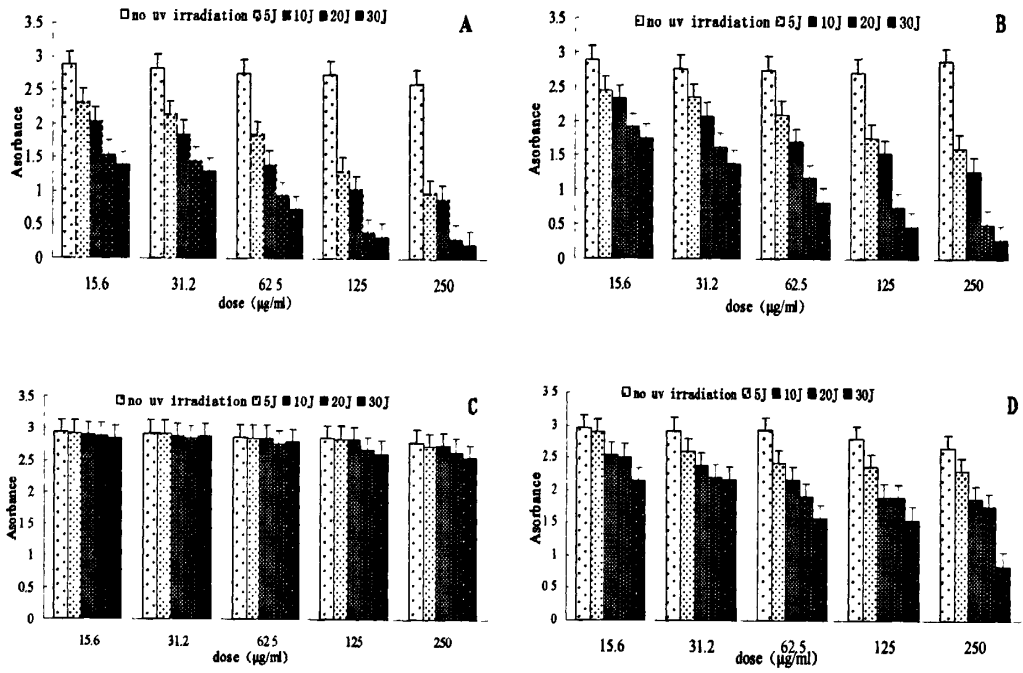
紫外辐照仪 (法国 VILBER 公司)。

1.3 实验方法

称取四种不同粒径及晶型的纳米 TiO₂ 20mg,分别将其溶于亚甲蓝溶液中,最终浓度为 15.6、31.2、62.5、125、250 μ g/mL。分别吸取 1mL 于 6 孔板中,置紫外辐照仪下照射。同时设 3% H_2O_2 为阳性对照。选取 UVA (365nm) 为光源,照射剂量分别为 0、5、10、20、30J/cm²。照射后,将液体吸出,16000r/min 离心 10 分钟,吸取上清,分光光度计测其吸光度值。

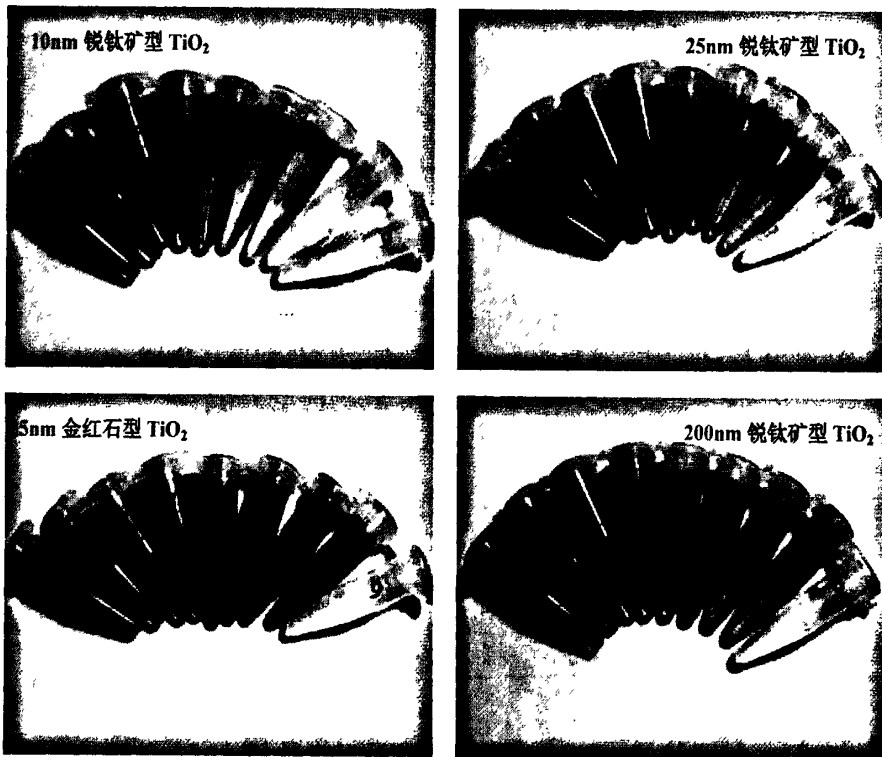
2. 结果

研究结果显示,在不加纳米 TiO₂ 的条件下,亚甲蓝不发生氧化降解;加入纳米 TiO₂ 粒子后,亚甲蓝发生降解。纳米 TiO₂ 光催化降解亚甲蓝的效果和紫外照射剂量呈剂量-反应关系,随着照射剂量的增强,其对亚甲蓝的氧化作用增强;纳米 TiO₂ 浓度越大,其对亚甲蓝的氧化作用越大;不同粒径锐钛矿型 TiO₂ 相比较,粒径越小,光照后对亚甲蓝的氧化作用越强,而金红石型 TiO₂ 光照前后对亚甲蓝的氧化作用变化不明显 (图 1.4-1.5)。



A. 10nm锐钛矿型TiO₂ B. 25nm锐钛矿型TiO₂ C. 25nm金红石型TiO₂ D. 200nm锐钛矿型TiO₂

图1.4 不同浓度纳米TiO₂在不同紫外照射剂量下对亚甲蓝的降解作用



(从1-9依次为: 阴性对照、15.6、31.2、62.5、125、250、500、1000µg/mL TiO₂、阳性对照 0.3%H₂O₂)

图1.5 5J/cm²紫外照射剂量下不同纳米TiO₂光催化降解亚甲蓝颜色变化

3. 讨论

有资料报道, 纳米TiO₂在紫外照射下可产生光催化产物羟自由基, 降解亚甲蓝^[18]。Thevenot的研究表明, 不同表面结构的纳米TiO₂具有不同的细胞毒作用^[19]。锐钛矿型TiO₂的光活性大于金红石型, 而无定型TiO₂没有显示出光活性^[20]。

本研究结果显示, 产生光催化产物的能力随着纳米TiO₂浓度的增加增强; 锐钛矿型TiO₂产生光催化产物的能力10nm>25nm>200nm; 锐钛矿型TiO₂产生光催化产物的能力大于金红石型。有关研究表明, 锐钛矿型TiO₂的带隙略高于金红石型, 稳定性比金红石型差, 金红石型TiO₂对O₂的吸附能力比锐钛矿型差。目前认为锐钛矿型TiO₂表现出高的活性有以下几个原因^[21]: (1) 锐钛矿型TiO₂的禁带宽度为3.2eV, 金红石型TiO₂禁带宽度为3.0eV, 锐钛矿型TiO₂较高的禁带宽度使其电子空穴对具有更正或更负的电位, 因而具有较高氧化能力; (2) 锐钛矿型TiO₂表面吸附H₂O、O₂、及OH⁻的能力较强, 导致其光催化活性较高, 在光催化反应中表面吸附能力对催化活性有很大的影响, 较强的吸附能力对其活性有利; (3) 在结晶过程中锐钛矿型晶粒通常具有较小的尺寸及较大的比表面, 对光催化反应有利。较小的晶粒尺寸意味着催化剂的比表面积比较大, 相同质量的催化剂可以提供更多的吸附和反应表面^[22], 因而小粒径锐钛矿型TiO₂表现出较高光催化活性。

综上所述, 可以看出紫外照射可引起光催化产物的产生, 羟自由基产生的量随着紫外照射剂量的增加而增加; 相同晶型纳米TiO₂间比较, 粒径越小产生羟自由基的量越多; 相同粒径下, 锐钛矿型TiO₂产生光催化产物的量多于金红石型。

第二章 纳米二氧化钛光催化产物对小鼠胚胎成纤维细胞的毒性作用

Cytotoxicity of photocatalytic products of TiO₂ nanoparticles on

Balb/c Swiss mouse embryo fibroblasts cells

成纤维细胞是真皮重要组成细胞之一，是皮肤功能完好的重要保证。成纤维细胞具有合成胶原纤维和弹性纤维，支撑皮肤的结构，以及释放炎症介质主动参与启动和延续炎症反应的功能。在紫外线辐射引起的皮肤光老化以及炎症反应的发生过程中，成纤维细胞合成和分泌的 TNF- α 及 IL-1 β 等细胞因子发挥着重要作用。

小鼠胚胎成纤维细胞 (Balb/c3T3) 细胞是目前最认可的光毒性评价细胞模型，能较好的反应成纤维细胞的生物学效应变化^[23]。本章以 Balb/c3T3 细胞为靶细胞，选择我国目前评价光毒性规定使用的对细胞无损伤的 UVA 照射条件 (365nm, 5J/cm²)，探讨在有无光照的情况下，受试纳米 TiO₂ (10nm 锐钛矿型、25nm 锐钛矿型、25nm 金红石型、200nm 锐钛矿型) 的细胞损伤效应，初步分析纳米光催化产物的主要作用靶点和毒性作用机制。

第一节 纳米二氧化钛光催化产物的一般细胞毒性

光毒性是指应用于机体的物质经暴露于光线后诱发或增强 (在低剂量水平时明显) 的毒性反应^[23]。本节将通过 MTT 法及中性红摄取试验，观察在有无紫外光照条件下受试纳米 TiO₂ 对 Balb/c3T3 细胞形态、细胞内活性氧、细胞活性等方面的影响，初步分析不同类型的纳米 TiO₂ 对细胞细胞膜及线粒体等的损伤水平。

1. 材料与方法

1.1 试验材料 同第一章第一节 1.1。

1.2 实验细胞

小鼠胚胎上皮细胞 (Balb/c3T3) 株由江苏省疾病预防控制中心馈赠。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 细胞培养试剂及其配制

DMEM 高糖培养基的配制 同第一章第一节 1.2.1。

0.25% 胰蛋白酶溶液 称取胰蛋白酶 (美国 Amresco 公司, 进口分装) 1.0g, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 缓冲液溶解, 玻棒搅拌混匀, 放置 4℃ 冰箱过夜后, 定容至 400mL, 抽滤除菌,

分装, -20℃冰箱保存备用。

1.3.2 主要试剂

中性红 (购自北京鼎国生物技术限责任公司);

MTT (购自Sigma公司);

2', 7'-二乙酰二氯荧光素 (DCFH-DA) 荧光探针 (美国invitrogen公司, 进口分装) 按照 1:1000的比例, 用无小牛血清的DMEM培养液稀释, 使终浓度为10 μ mol/L, 临用前配制。

1.3.3 主要仪器

CO₂ 培养箱 (BB5060UV, 香港 Heal Force Development 公司);

倒置显微镜 (CKX41, 日本 Olympus 公司);

全自动酶标仪 (MRX, 美国 Dynex Technologies 公司);

低温超速离心机 (5417R, 德国 eppendorf 公司);

紫外辐照仪 (法国 VILBER 公司)。

1.4 方法

1.4.1 受试细胞

Balb/c3T3 细胞采用常规传代培养, 用 DMEM 培养基 (含体积分数为 10%的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素) 于 37℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养。取生长状态良好的对数生长期细胞进行试验。

1.4.2 纳米 TiO₂ 悬液配制 同第一章第一节 1.3。

1.4.3 紫外辐照条件 波长365nm, 照射剂量5J/cm²。

1.4.4 细胞形态学观察

细胞悬液 (1 \times 10⁵/mL) 接种于24孔细胞培养板, 37℃、5%CO₂培养箱中贴壁生长24h。加入不同浓度的受试物溶液, 相同的受试物浓度序列制备两个板, 每块培养板同时设阴性对照, 每组设3个平行。继续培养18h, 两块板随机选择, 其中一块置紫外辐照仪下进行照射, 照射剂量为5J/cm², 室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后, 继续培养4h后观察细胞形态。

1.4.5 MTT法检测细胞活性^[24]

向96孔板中加入细胞悬液 (1 \times 10⁵/孔), 37℃、5%CO₂培养箱中贴壁生长24h。加入不同浓度的受试物溶液, 相同的受试物浓度序列制备两个板, 每块培养板同时设阴性对照, 每组设3个平行。继续培养18h, 两块板随机选择, 其中一块置紫外辐照仪下进行照射, 照射剂量为5J/cm², 室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后, 继续培养4h后吸除培养基, 用PBS清洗细胞3次, 加入含MTT培养基, 孵育3h, 吸除培养基, 加入DMSO震荡10min后用酶标仪在570nm处测定吸光值。

1.4.6 中性红摄取光毒性实验^[23]

向96孔板中加入细胞悬液 (1×10^5 /孔), 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中贴壁生长24h。加入不同浓度的受试物溶液, 相同的受试物浓度序列制备两个板, 每块培养板同时设阴性对照, 每组设3个平行。继续培养18h, 两块板随机选择, 其中一块置紫外辐照仪下进行照射, 照射剂量为 $5\text{J}/\text{cm}^2$, 室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后, 继续培养4h后吸除培养基, 用PBS清洗细胞3次, 加入含有中性红的无血清培养基 ($100\text{mg}/\text{mL}$), 孵育3h, 吸除中性红培养基, 用PBS清洗细胞, 加入中性红裂解液 (乙酸: 乙醇=1:1); 快速震荡10min后离心取上清, 用酶标仪在570nm处测定吸光值。

1.4.7 细胞内活性氧 (ROS) 生成测定

细胞悬液 ($1 \times 10^5/\text{mL}$) 接种于 96 孔板, $200\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 培养箱中贴壁生长 24h。加入不同浓度的受试物溶液, 相同的受试物浓度序列制备两个板, 每块培养板同时设阴性对照, 阳性对照为 $100\mu\text{M}\text{H}_2\text{O}_2$, 每组设 3 个平行。继续培养 18h, 两块板随机选择, 其中一块置紫外辐照仪下进行照射, 照射剂量为 $5\text{J}/\text{cm}^2$, 室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后将细胞培养板置培养箱继续培养, 分别于照射后 2h、4h、8h、12h 和 24h 终止培养, PBS 洗涤 3 次, 每孔内加入 $200\mu\text{L}$ 2', 7'-二乙酰二氯荧光素 (DCFH-DA) 荧光探针, 37°C 培养箱内孵育 20min。吸弃负载液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA, 每孔内再加入 $100\mu\text{L}$ PBS, 将 96 孔板置于酶标仪上在激发波长 488nm, 发射波长 525nm 条件下进行扫描。以平均荧光强度反映细胞内活性氧水平随时间变化的情况。

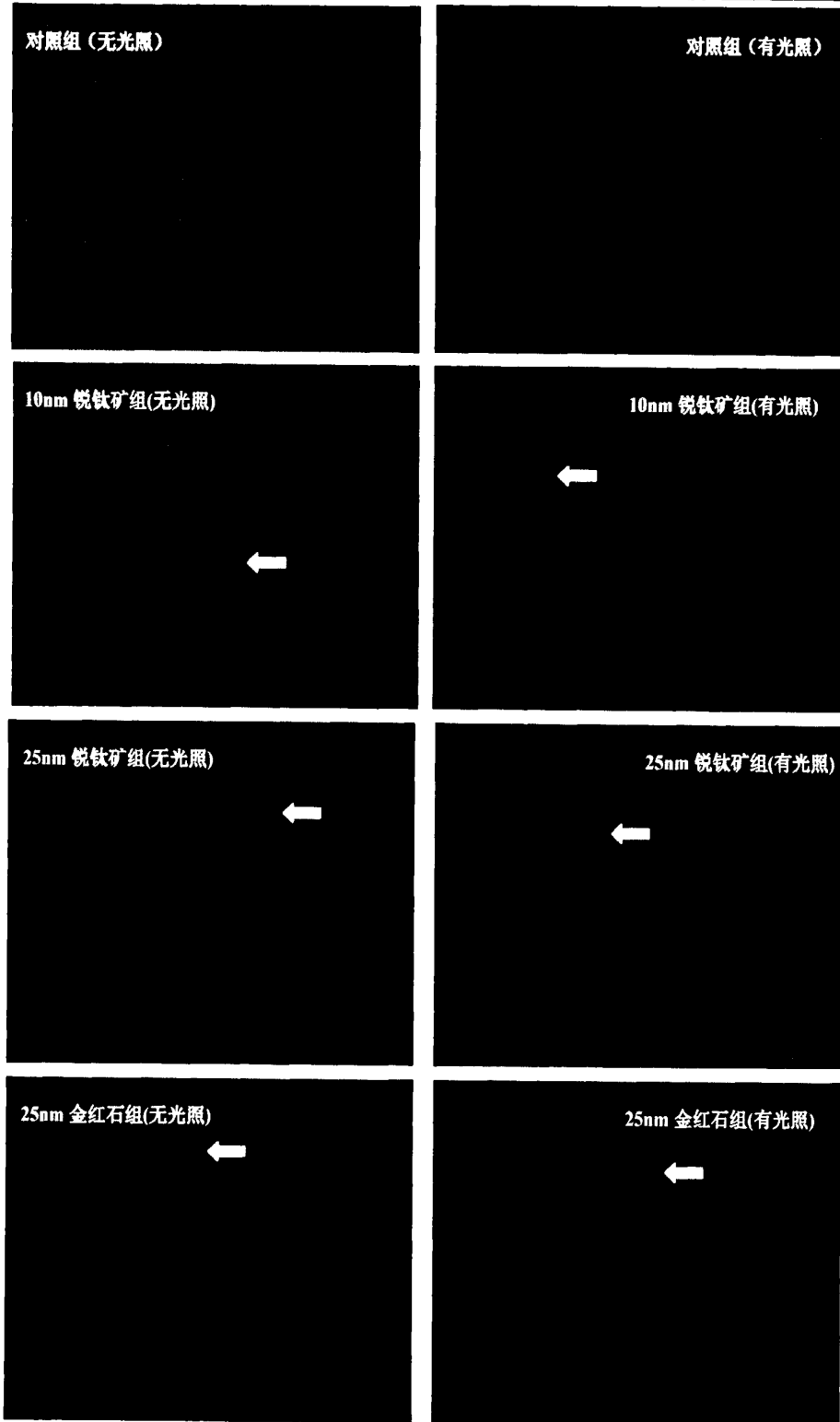
1.5 资料分析

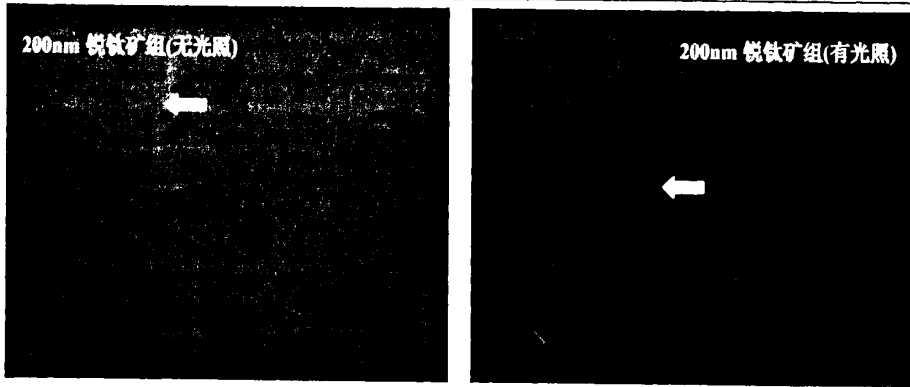
将实验数据录入 Excel 2003, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析、Dunnetts' *t* 检验、多个样本均数两两比较的 *q* 检验、两样本均数比较 *t* 检验及两变量关联性分析。

2. 结果

2.1 细胞形态学观察

光镜下可见对照组细胞呈细长梭形, 多为放射状和旋涡状分布, 轮廓清晰, 结构完整; 各纳米 TiO_2 染毒组细胞逐渐变圆, 皱缩, 悬浮细胞逐渐增加, 胞内出现黑色颗粒, 且入胞的颗粒与所暴露的剂量呈正相关, 某些细胞膜完整性被破坏。光照后, 细胞的损伤更加严重, 有些细胞崩解 (图2.1)。





注：黑色箭头代表吞有 TiO₂ 颗粒的细胞；白色箭头代表皱缩的细胞。

图 2.1 不同类型 TiO₂ 高剂量染毒组的 Balb/c3T3 细胞光照前后形态学比较 (×400)

2.2 MTT实验结果

无光照处理时，与对照组相比，纳米级TiO₂组及200nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性均降低，10nm、25nm、200nm锐钛矿型TiO₂组各剂量组，25nm金红石型250μg/mL剂量组与对照组的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与200nm锐钛矿型TiO₂组相比，10nm、25nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性降低更为明显，多数剂量组的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。TiO₂各染毒组内，随着浓度的升高，细胞活性降低，经两变量关联性分析，25nm锐钛矿型TiO₂组 ($r = -0.687, p = 0.05$)、25nm金红石型TiO₂组 ($r = -0.546, p = 0.035$) 存在剂量反应关系。相同粒径下，锐钛矿型TiO₂对细胞活性的影响大于金红石型 ($p < 0.05$)。

有光照处理时，与对照相比，纳米级TiO₂组及200nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性均降低，多数处理组与对照的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与200nm锐钛矿型TiO₂组相比，10nm、25nm锐钛矿型TiO₂组高剂量组细胞活性降低更为明显，差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。TiO₂各染毒组内，随着浓度的升高，细胞活性降低，经两变量关联性分析，10nm锐钛矿型TiO₂组 ($r = 0.795, p = 0.000$)、25nm锐钛矿型TiO₂组 ($r = 0.624, p = 0.013$)、25nm金红石型TiO₂组 ($r = 0.746, p = 0.001$) 存在剂量反应关系。相同粒径下，锐钛矿型TiO₂对细胞活性的影响大于金红石型 ($p < 0.05$)。

光照前后相比，光照后细胞活性低于光照前。其中，10nm锐钛矿型TiO₂在染毒剂量为125μg/mL时差别有统计学意义 ($p < 0.05$)；25nm锐钛矿型TiO₂在染毒剂量为31.2、62.5μg/mL时差别有统计学意义 ($p < 0.05$)；200nm锐钛矿型TiO₂在染毒剂量为31.2μg/mL时差别有统计学意义 ($p < 0.05$) (表2.1)。

表2.1 纳米TiO₂光催化产物对细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	无光照OD	有光照OD
对照	0	0.89±0.01	0.84±0.01
10nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.70±0.01 [#]	0.66±0.04 [*]
	31.2	0.71±0.02 [*]	0.65±0.01 [*]
	62.5	0.68±0.01 [#]	0.63±0.02 ^{*#Δ}
	125	0.65±0.11 [#]	0.58±0.03 ^{*#@}
	250	0.65±0.04 [#]	0.55±0.04 ^{*#Δ}
25nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.76±0.03 [*]	0.73±0.02 [*]
	31.2	0.78±0.01 [*]	0.68±0.01 [@]
	62.5	0.76±0.02 [*]	0.62±0.04 ^{*#@}
	125	0.68±0.07 [#]	0.63±0.04 ^{*#}
	250	0.67±0.02 [*]	0.62±0.07 [*]
25nm金红石型TiO ₂	15.6	0.85±0.04 [#]	0.81±0.02 [#]
	31.2	0.85±0.04 [#]	0.80±0.04 [#]
	62.5	0.84±0.01 [#]	0.78±0.02 ^{#Δ}
	125	0.82±0.02 [#]	0.77±0.01 [#]
	250	0.79±0.02 [#]	0.71±0.03 ^{#Δ}
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.80±0.04 [*]	0.71±0.05
	31.2	0.77±0.06 [*]	0.70±0.01 ^{*@}
	62.5	0.76±0.03 [*]	0.70±0.04 [*]
	125	0.76±0.03 [*]	0.71±0.02 [*]
	250	0.73±0.01 [*]	0.68±0.03 [*]

注: *: 经 *Dunnnett's t* 检验, 与阴性对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *t* 检验, 不同染毒组间比较, $p < 0.05$;

Δ: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后自身比较, $p < 0.05$ 。

2.3 Balb/c3T3中性红摄取光毒性试验结果

无光照处理时, 与对照组相比, 纳米级TiO₂组及200nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性均降低, 10nm锐钛矿型TiO₂组各剂量组及25nm锐钛矿型、25nm金红石型、200nm锐钛矿型TiO₂组高剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与200nm锐钛矿型TiO₂组相比, 10nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性降低更为明显, 各剂量组与其对应剂量组的差别均有统计学意义 ($p < 0.05$); 25nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性除250 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组外, 差异不明显。TiO₂各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞活性降低, 经两变量关联性分析, 10nm锐钛矿型TiO₂组 ($r=0.884, p=0.000$)、200nm锐钛矿型TiO₂组 ($r=0.853, p=0.000$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型TiO₂对细胞活性的影响大于金红石型TiO₂, 但差别均无统计学差异。

有光照处理时, 与对照组相比, 纳米级TiO₂组及200nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性均降低, 其中高剂量组与对照间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与200nm锐钛矿型TiO₂组相比, 10nm锐钛矿型TiO₂组的细胞活性降低, 其差异在31.2 $\mu\text{g/mL}$ 、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组有统计学意义 ($p < 0.05$); 25nm锐钛矿型TiO₂组细胞活性亦降低, 在62.5 $\mu\text{g/mL}$ 、125 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下差

别有统计学意义 ($p < 0.05$)。TiO₂各染毒组内,随着浓度的升高,细胞活性降低,经两变量关联性分析,10nm锐钛矿型TiO₂组($r=0.833, p=0.000$)、25nm锐钛矿型TiO₂组($r=0.888, p=0.000$)、25nm金红石型TiO₂组($r=0.731, p=0.002$)、200 nm锐钛矿型TiO₂组($r=0.810, p=0.000$)均存在剂量反应关系。相同粒径下,锐钛矿型TiO₂对细胞活性的影响大于金红石型TiO₂,差别在31.2 $\mu\text{g/mL}$ 剂量下有统计学意义 ($p < 0.05$)。

光照前后相比,光照后细胞活性降低,但差别均无统计学意义(表2.2)。

表2.2 Balb/c3T3细胞中性红摄取光毒性试验结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	无光照OD	有光照OD
对照	0	0.77 \pm 0.02	0.68 \pm 0.01
10nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.67 \pm 0.04* Δ	0.63 \pm 0.02 Δ #
	31.2	0.68 \pm 0.02* Δ	0.65 \pm 0.01 Δ
	62.5	0.58 \pm 0.01* Δ	0.55 \pm 0.01* Δ
	125	0.56 \pm 0.01* Δ	0.54 \pm 0.04* Δ
	250	0.54 \pm 0.02* Δ	0.52 \pm 0.02* Δ
25nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.77 \pm 0.02	0.68 \pm 0.02 Δ
	31.2	0.77 \pm 0.03	0.68 \pm 0.02 Δ
	62.5	0.70 \pm 0.08*	0.57 \pm 0.03* Δ #
	125	0.70 \pm 0.02*	0.54 \pm 0.03* Δ #
	250	0.70 \pm 0.03*#	0.51 \pm 0.02* Δ
25nm金红石型TiO ₂	15.6	0.75 \pm 0.03	0.68 \pm 0.02 Δ
	31.2	0.76 \pm 0.01	0.60 \pm 0.03* Δ #
	62.5	0.73 \pm 0.07	0.59 \pm 0.01* Δ
	125	0.76 \pm 0.02	0.56 \pm 0.03* Δ
	250	0.69 \pm 0.03*	0.56 \pm 0.04* Δ
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.74 \pm 0.03 Δ	0.71 \pm 0.04 Δ
	31.2	0.74 \pm 0.03 Δ	0.68 \pm 0.01 Δ
	62.5	0.67 \pm 0.04* Δ	0.66 \pm 0.05 Δ
	125	0.67 \pm 0.03* Δ	0.63 \pm 0.04 Δ
	250	0.56 \pm 0.02* Δ	0.53 \pm 0.03* Δ

注: *: 经 *Dunnnett's t* 检验, 与阴性对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *t* 检验, 不同染毒组间比较, $p < 0.05$;

Δ : 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$ 。

2.4 细胞内活性氧测定

2.4.1 平均荧光强度变化曲线图

以各纳米 TiO₂ 高剂量组为例, 在无紫外照射时(图 2.2), 各染毒组细胞内活性氧荧光强度在避光处理后 4 时最强, 细胞内活性氧含量最高。4h 后, 细胞内活性氧荧光强度随着时间的延长而减弱。各时间点 TiO₂ 染毒组细胞内活性氧强度均高于对照组。

紫外照射组(图 2.3), 各染毒组细胞内活性氧荧光强度在紫外照射后 4h 时最强, 4h 后,

细胞内活性氧荧光强度随着时间的延长而减弱。各时间点纳米 TiO₂ 染毒组细胞内活性氧强度均高于对照组。

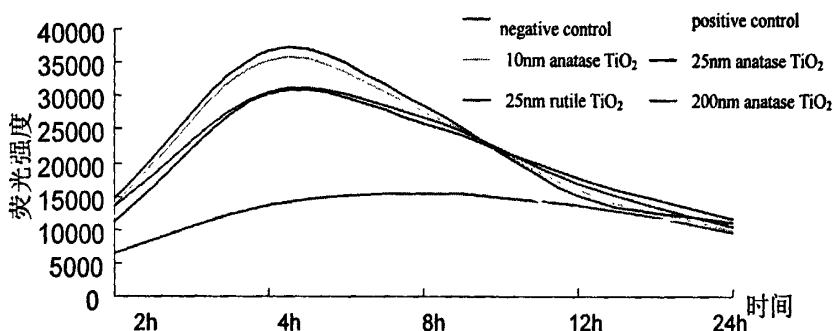


图 2.2 无紫外照射下细胞内活性氧荧光强度变化曲线

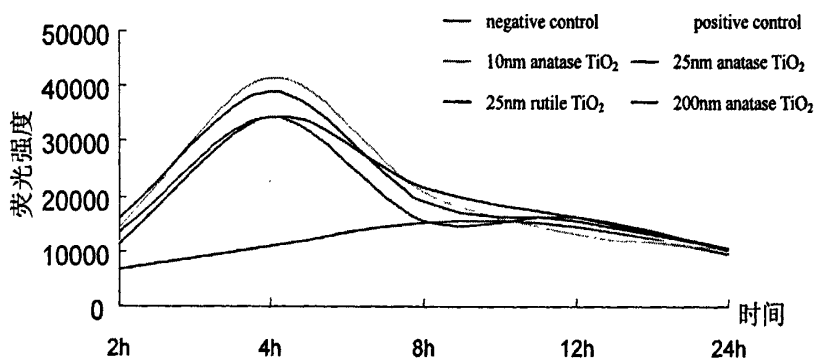


图 2.3 紫外照射下细胞内活性氧荧光强度变化曲线

2.4.2 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞内活性氧水平的影响

无光照处理时，与阴性对照相比，纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞内活性氧水平显著升高，多数剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与阳性对照组相比，纳米级 TiO₂ 组细胞内活性氧水平在避光处理后 4h 显著升高，多数剂量组与其之间的差别无统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比，纳米 TiO₂ 组在各染毒时间点与其对应剂量间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内，相同染毒时间点，随着浓度的升高，经两变量关联性分析，避光处理后 2h，10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.522, p=0.018$)、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.613, p=0.004$)、25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r=0.622, p=0.003$)、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.871, p=0.000$) 存在剂量反应关系；避光处理 12h，25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.626, p=0.003$) 存在剂量反应关系。相同粒径下，锐钛矿型 TiO₂ 染毒组细胞内活性氧水平高于金红石型，但差别无统计学意义 (表 2.3)。

表 2.3 无光照组 Balb/c3T3 细胞内活性氧变化 ($\times 10^4$) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量 $\mu\text{g/mL}$	2h	4h	8h	12h	24h
10nm 锐钛矿型 TiO_2	15.6	1.07 \pm 0.16*	2.86 \pm 0.11	3.16 \pm 0.76	1.54 \pm 0.09	1.11 \pm 0.15
	31.2	1.07 \pm 0.16*	3.68 \pm 0.40**	2.22 \pm 0.17**S	1.58 \pm 0.13	1.03 \pm 0.05
	62.5	1.18 \pm 0.17*	3.65 \pm 0.36**	2.66 \pm 0.89**	1.61 \pm 0.12	1.01 \pm 0.03
	125	1.30 \pm 0.20*	3.64 \pm 0.16**	2.85 \pm 0.16**	1.45 \pm 0.05	1.02 \pm 0.12
	250	1.38 \pm 0.26*	3.53 \pm 0.41**	2.76 \pm 0.45	1.60 \pm 0.05	0.98 \pm 0.10
25nm 锐钛矿型 TiO_2	15.6	1.09 \pm 0.15	3.40 \pm 0.30**	3.08 \pm 0.41*	1.84 \pm 0.20 ^S	1.13 \pm 0.03
	31.2	1.13 \pm 0.18	3.41 \pm 0.12**	3.50 \pm 0.75	1.70 \pm 0.05	1.19 \pm 0.15
	62.5	1.26 \pm 0.18	3.52 \pm 0.12**	3.22 \pm 0.77	1.76 \pm 0.08 ^S	1.02 \pm 0.04
	125	1.34 \pm 0.19*	3.51 \pm 0.26**	3.15 \pm 0.32**	1.66 \pm 0.10	1.17 \pm 0.10
	250	1.46 \pm 0.15*	3.67 \pm 0.38**	2.86 \pm 0.31*	1.51 \pm 0.08	1.11 \pm 0.19
25nm 金红石 TiO_2	15.6	0.94 \pm 0.07	2.80 \pm 0.08**	2.33 \pm 0.30	1.72 \pm 0.14	1.16 \pm 0.04
	31.2	0.99 \pm 0.01 ^S	2.76 \pm 0.14**	2.67 \pm 0.14**	1.55 \pm 0.07	1.16 \pm 0.06
	62.5	1.05 \pm 0.08 ^S	2.62 \pm 0.11**	2.23 \pm 0.20*	1.65 \pm 0.08	1.15 \pm 0.05
	125	1.13 \pm 0.11*	2.53 \pm 0.11**S	2.41 \pm 0.39	1.75 \pm 0.10	1.09 \pm 0.07
	250	1.10 \pm 0.09**S	3.04 \pm 0.22**S	2.60 \pm 0.26*	1.79 \pm 0.09	1.16 \pm 0.11
200nm 锐钛矿型 TiO_2	15.6	0.92 \pm 0.04**S	3.23 \pm 0.27**	2.93 \pm 0.21**	2.21 \pm 0.26 ^S	1.05 \pm 0.05
	31.2	1.03 \pm 0.06**S	3.31 \pm 0.19**	3.07 \pm 0.16**	1.97 \pm 0.11**	1.15 \pm 0.06
	62.5	1.09 \pm 0.06**S	3.37 \pm 0.35**	2.95 \pm 0.32*	1.91 \pm 0.09*	1.13 \pm 0.06
	125	1.16 \pm 0.10**S	3.30 \pm 0.23**	2.82 \pm 0.27**	1.93 \pm 0.17	1.10 \pm 0.09
	250	1.36 \pm 0.10**S	3.06 \pm 0.06**	2.69 \pm 0.24**	1.70 \pm 0.07 ^S	1.05 \pm 0.04
阴性对照	0	0.63 \pm 0.04	1.37 \pm 0.29	1.54 \pm 0.18	1.36 \pm 0.08	0.96 \pm 0.02
阳性对照	0.03% H_2O_2	1.19 \pm 0.02	2.07 \pm 0.15	1.88 \pm 0.09	1.30 \pm 0.13	1.12 \pm 0.05

注: *: 各实验组与阴性对照比较, $p < 0.05$; #: 与阳性对照相比, $p < 0.05$; S: 染毒组内比较, $p < 0.05$; @: 光照前后自身相比, $p < 0.05$ 。

有光照处理时, 与阴性对照相比, 纳米级 TiO_2 组及 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组细胞内活性氧水平显著升高, 多数剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与阳性对照相比, 各实验组细胞内活性氧水平在光照处理后 4h 显著性升高, 多数剂量组与其的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组相比, 纳米 TiO_2 组细胞内活性氧水平降低, 光照处理后 12h, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 15.6、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组、25nm 锐钛矿型 TiO_2 组 62.5 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组与其对应剂量间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。 TiO_2 各染毒组内, 相同染毒时间点, 随着浓度的升高, 经两变量关联性分析, 光照处理后 2h, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=0.629, p=0.003$)、200nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=0.907, p=0.000$) 存在剂量反应关系; 光照处理后 4h, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=0.629, p=0.003$)、25nm 金红石型 TiO_2 组 ($r=0.535, p=0.015$)、200nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=-0.578, p=0.008$) 存在剂量反应关系; 光照处理后 12h, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=-0.447, p=0.048$)、200nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=-0.573, p=0.008$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO_2 染毒组细胞内活性氧水平高于金红石型, 但差别无统

计学意义 (表 2.4)。

表 2.4 有光照组 Balb/c3T3 细胞内活性氧变化 ($\times 10^4$) ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量 μg/ml	2h	4h	8h	12h	24h
10nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	1.14±0.20	3.34±0.39*	2.11±0.32	1.43±0.05&	1.00±0.05
	31.2	1.16±0.15	3.69±0.37*	2.00±0.24	1.46±0.08	1.06±0.04
	62.5	1.23±0.21	3.71±0.43*	2.22±0.11*	1.37±0.07&	1.07±0.04
	125	1.37±0.21	4.06±0.30*#	2.07±0.34*	1.38±0.12	1.14±0.09.
	250	1.42±0.26	4.15±0.18*#	2.08±0.17	1.32±0.08	1.08±0.06
25nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	1.09±0.14 ^s	3.56±0.35*	1.75±0.25	1.97±0.27	1.10±0.05
	31.2	1.20±0.19	3.49±0.22*	1.78±0.36	1.86±0.18	1.16±0.07
	62.5	1.27±0.19	3.61±0.39*	2.42±0.54	1.78±0.03*#@	1.05±0.05
	125	1.44±0.20	3.93±0.38*	1.90±0.31*	1.69±0.08	1.08±0.09
	250	1.59±0.21 ^s	3.89±0.23*#	1.92±0.19	1.55±0.01	1.08±0.06
25nm 金红石型 TiO ₂	15.6	0.97±0.06	3.11±0.24*	1.80±0.15 ^s	1.63±0.11	1.12±0.17
	31.2	1.02±0.03*	2.93±0.18 ^s	2.45±0.34 ^s	1.56±0.04	1.03±0.04
	62.5	1.07±0.07*	3.50±0.10* ^s	6.46±2.44 ^s	1.63±0.06	1.10±0.14
	125	1.12±0.11	3.33±0.23*	2.33±0.18 ^s	1.72±0.14	1.04±0.03
	250	1.12±0.06*	3.46±0.16* ^s	2.18±0.21 ^s	1.64±0.11	1.05±0.07
200nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	0.95±0.04 ^s	4.07±0.20*#	1.63±0.02* [@]	1.82±0.02 ^s	1.06±0.05
	31.2	1.03±0.04 ^s	4.30±0.53*	1.61±0.25* [@]	1.86±0.08*	0.98±0.06
	62.5	1.09±0.07 ^s	4.21±0.31*#	2.07±0.32	1.85±0.07*	1.06±0.08
	125	1.23±0.09 ^s	3.65±0.14*#	1.79±0.23	1.72±0.17	1.05±0.18
	250	1.36±0.12 ^s	3.45±0.28*	1.56±0.17	1.63±0.05 ^s	1.04±0.07
阴性对照	0	0.67±0.04	1.10±0.13	1.53±0.18	1.44±0.06	0.97±0.05
阳性对照	0.03% H ₂ O ₂	1.18±0.06	2.07±0.15	1.85±0.16	1.35±0.27	1.08±0.06

注: *: 各实验组与阴性对照比较, $p < 0.05$; #: 与阳性对照相比, $p < 0.05$; ^s: 染毒组内比较, $p < 0.05$; &, 染毒组间比较, $p < 0.05$; @: 光照前后自身相比, $p < 0.05$ 。

光照前后相比, 光照后 2h、4h 光照组细胞内活性氧水平高于无光照组, 4h 后, 光照组细胞内活性氧水平低于无光照组, 差别在 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 15.6、31.2 μg/mL 剂量组光照处理后 8h, 25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 62.5 μg/mL 剂量组光照处理后 12h 有统计学意义 ($p < 0.05$)。

3. 讨论

正常细胞在生长过程中会维持一种特定的形态, 细胞形态学改变是细胞受损的表征之一。本研究结果显示, 从细胞形态学变化来看, 纳米 TiO₂ 染毒组细胞体积缩小, 出现细胞膜不完整, 纳米 TiO₂ 可以进入胞内, 而在 200 纳米 TiO₂ 暴露组表现不明显。光照后细胞的损伤加重, 悬浮细胞增多, 胞内纳米 TiO₂ 增多。结果提示, 纳米 TiO₂ 能够进入细胞内, 纳米 TiO₂ 光催化产物可以促进该过程。

MTT 是综合评价细胞毒性的常用指标, 能够很好地反映基于线粒体功能障碍的细胞毒性。本研究结果表明锐钛矿型 TiO₂ 的毒性明显大于金红石型, 小粒径受试材料的细胞毒性高

于大粒径材料,并存在剂量-反应关系($p < 0.05$)。朱融融等人对 CHO 细胞研究中,也得出类似结论,认为 10nm-20nm 的锐钛矿毒性 $>50-60\text{nm}$ 粒径的锐钛矿 $>50-60\text{nm}$ 的金红石^[25]。

光毒性是指应用于机体的物质经暴露于光线后诱发或增强(在低剂量水平时明显)的毒性反应。对 HeLa 细胞用 25nm 锐钛矿型 TiO_2 染毒,当剂量 $<150\text{g/mL}$ 时,存活率超过 90%,但在接受了 $14-20\text{ J/cm}^2$ 汞灯照射后 HeLa 细胞全部死亡^[26],说明接受紫外照射增大了纳米 TiO_2 对细胞的毒性作用,表现出一定的光毒性。魏刚^[27]等人的研究结果显示,粒子的尺寸越小,比表面积越大,光吸收效率也越高,有利于光催化反应在表面上进行,因此活性增强。

活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)是一系列化学性质活泼、氧化能力强的含氧物质的总称。它是由氧直接或间接转变的氧自由基及其衍生物,包括氧的单电子反应产物超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)、膜质过氧化中间产物脂氧自由基($\text{LO}\cdot$)、脂过氧自由基($\text{LOO}\cdot$)等比分子氧活泼的物质^[28]。体内正常代谢过程中,吞噬细胞可以通过产生大量活性氧发挥吞噬和杀伤作用;在病理条件下,由于活性氧的产生和清除失去了平衡,就可能通过脂质过氧化、DNA 氧化损伤、蛋白质氧化和单糖氧化等过程导致机体损伤^[29]。细胞膜、线粒体等细胞器膜磷脂分子层及膜蛋白的结构也易受活性氧的攻击,细胞内环境会显著改变,如胞内游离 Ca^{2+} 浓度上升、ATP 缺失及脂质的氧化等。活性氧攻击细胞膜脂,使膜的通透性发生改变,引起细胞外 Ca^{2+} 内流或者线粒体、内质网膜受损也可能导致细胞内部 Ca^{2+} 的释放。

在以往对 UVA 致凋亡作用的研究中,人们认为 UVA 是通过 ROS 来介导引发细胞凋亡的^[30]。我们在亚甲蓝降解实验的基础上,进一步用荧光探针(DCFH-DA)标记 ROS 的方法检测了二氧化钛在 UVA 照射下诱导 ROS 生成的作用。结果显示,纳米 TiO_2 可导致受试细胞内活性氧水平升高,细胞内活性氧水平和纳米 TiO_2 浓度、粒径、晶型、染毒时间及紫外照射有关。随着纳米 TiO_2 浓度的增高,粒径越小,细胞内活性氧水平升高;相同粒径下锐钛矿型 TiO_2 组细胞内活性氧水平高于金红石型,染毒 4h 后,差别无统计学意义。光照后 2h、4h 光照组细胞内活性氧水平高于无光照组。由此进一步说明纳米 TiO_2 经紫外照射后产生的羟自由基引起细胞活性氧代谢失衡,诱导细胞内活性氧水平的升高。光照处理 4h 后,光照组细胞内活性氧水平低于未光照组,可能与光照 4h 后,细胞损伤更加严重,细胞发生凋亡的数量增多有关。

本研究结果提示,纳米 TiO_2 光催化产物中活性氧是影响细胞毒性的重要物质基础,不同类型的纳米 TiO_2 表现出不同的光催化敏感性,纳米 TiO_2 对 Balb/c3T3 细胞的生长有明显的抑制作用,其中纳米 TiO_2 的染毒剂量、颗粒的粒径、晶型、以及光照等因素都能够影响细胞的生长活性。

第二节 纳米二氧化钛光催化产物的细胞氧化损伤

细胞膜是纳米 TiO₂ 光催化产物对细胞攻击的主要目标。有资料显示, 纳米 TiO₂ 作用后存在细胞膜受损的现象^[31]。本节将通过 LDH、SOD、MDA、GSH-Px 活性等指标的测定, 初步探讨纳米 TiO₂ 光催化产物对细胞产生的以膜损伤为特征的氧化损伤程度。

1. 材料与方法

1.1 实验材料 同第一章第一节1.1。

1.2 实验细胞 同第本章章第一节 1.2。

1.3 试剂与仪器 同第本章章第一节 1.3.1。

乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 同本章第一节 1.4.1。

1.4.2 TiO₂悬液配制 同本章第一节1.4.2。

1.4.3 细胞外液 LDH、SOD、MDA、GSH-Px 活性测定

细胞悬液 (1.5×10^5 /mL) 接种于 24 孔板, 1mL/孔, 37℃、5%CO₂ 培养箱中贴壁生长 24h。加入不同浓度的受试物溶液, 相同的受试物浓度序列制备两个板, 每块培养板同时设阴性对照, 每组设 3 个平行。继续培养 18h, 两块板随机选择, 其中一块置紫外辐照仪下进行照射, 照射剂量为 5J/cm², 室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后, 继续培养 4h 后终止培养, 每孔吸取上清液 30 μL 按试剂盒说明检测细胞外液中 LDH、SOD、MDA、GSH-Px 活性。

1.4.4 资料分析

将实验数据录入 Excel 2003, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析、Dunnetts't 检验、多个样本均数两两比较的 *q* 检验、两样本均数比较 *t* 检验及两变量关联性分析。

2. 结果

2.1 纳米 TiO₂ 光催化产物对 LDH 活性的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组高剂量组细胞培养上清 LDH 活性升高, 与对照的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米级 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清 LDH 活性升高, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.868, p=0.000$)、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.858, p=0.000$)、25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r=0.712, p=0.003$) 存在剂量反应关系。相同粒径下锐钛矿型 TiO₂ 组比金红石型 TiO₂ 组细胞培养上清 LDH 活性高,

在剂量为 125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差别有统计学意义 ($p<0.05$)。

有光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO_2 组及 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组高剂量组细胞培养上清 LDH 活性升高, 与对照的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组相比, 纳米级 TiO_2 组与其之间的差别无统计学意义。 TiO_2 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清 LDH 活性升高, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=0.721, p=0.002$)、200nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=0.681, p=0.005$) 存在剂量反应关系。相同粒径下锐钛矿型 TiO_2 组比金红石型 TiO_2 组细胞培养上清 LDH 活性高, 在剂量为 31.2、62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差别有统计学意义 ($p<0.05$)。

光照前后相比, 光照后细胞培养上清 LDH 活性上升, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组、25nm 锐钛矿型 TiO_2 组 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组光照前后的差别有统计学意义 ($p<0.05$) (表 2.5)。

表 2.5 纳米 TiO_2 光催化产物对 LDH 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	LDH(U/L, 无光照)	LDH(U/L, 有光照)
对 照	0	551.12 \pm 18.44	579.23 \pm 104.93
10nm锐钛矿型 TiO_2	15.6	468.6 \pm 141.16 [#]	674.13 \pm 67.15
	31.2	549.81 \pm 16.75 [#]	607.17 \pm 139.98 ^{#@}
	62.5	536.6 \pm 26.2 [#]	684.79 \pm 173.7
	125	752.43 \pm 93.53 [#]	941.64 \pm .63.83 ^{#*}
	250	908.71 \pm 65.64 ^{#*}	942.68 \pm 87.91 ^{#*}
25nm锐钛矿型 TiO_2	15.6	581.58 \pm 27.02 [#]	652.46 \pm 221.12 [@]
	31.2	623 \pm 60.82 [#]	829.81 \pm 172
	62.5	717.81 \pm 69.57 ^{#*}	884.58 \pm 143.56 [*]
	125	782.38 \pm 95.28 ^{#*}	797.75 \pm 131.88
	250	889.8 \pm 110.79 ^{#*}	893.97 \pm 128.55 [*]
25nm金红石型 TiO_2	15.6	475.31 \pm 69.09 [#]	516.74 \pm 91.61
	31.2	570.4 \pm 78.88	527.93 \pm 105.81 ^{&}
	62.5	617.02 \pm 88.3	568.03 \pm 82.33 ^{&}
	125	618.05 \pm 26.54 ^{&}	604.24 \pm 68.52 ^{&}
	250	685.77 \pm 95.97 ^{*&#}	599.03 \pm 89.52 ^{&}
200nm锐钛矿型 TiO_2	15.6	593.59 \pm 168.51	567.07 \pm 107.49 [#]
	31.2	581.57 \pm 108.42	561.28 \pm 45.5 [#]
	62.5	590.18 \pm 166.03	648.78 \pm 53.65 [#]
	125	661.01 \pm 105.44	877.18 \pm 119.46 ^{#*}
	250	755.56 \pm 108.86 [*]	762.58 \pm 143.1 [*]

注: * : 经 *Dunnett's t* 检验, 与阴性对照组比较, $p<0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p<0.05$; & : 经 *t* 检验, 不同染毒组间比较, $p<0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p<0.05$ 。

2.2 纳米 TiO₂ 光催化产物对 MDA 含量的影响

无光照处理时,与对照相比,纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MDA 含量上升,其中 10nm、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比,纳米级 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内,随着浓度的升高,细胞培养上清 MDA 含量升高,经两变量关联性分析,10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.754, p=0.001$)、25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r=0.649, p=0.009$) 存在剂量反应关系。相同粒径下,锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MDA 含量高于金红石型,差别无统计学意义。

有光照处理时,与对照相比,纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MDA 含量上升,其中 10nm、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比,纳米级 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内,随着浓度的升高,细胞培养上清 MDA 含量升高,经两变量关联性分析,10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.553, p=0.032$)、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.546, p=0.035$)、25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r=0.704, p=0.003$) 存在剂量反应关系。相同粒径下,锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MDA 含量高于金红石型,差别无统计学意义。

紫外照射后细胞培养上清 MDA 含量上升,其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 染毒组除 15.6 μ g/mL 剂量组外,其余各剂量组照射前后的差别均有统计学意义 ($p<0.05$) (表 2.6 所示)。

表 2.6 纳米 TiO₂ 光催化产物对 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量($\mu\text{g/mL}$)	无光照	有光照
		MDA(mmol/mL)	MDA(mmol/mL)
对照	0	0.55±0.06	0.81±0.34
10nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.68±0.17 [#]	1.13±0.11 [#]
	31.2	0.65±0.06 [#]	1.39±0.65 ^{#@}
	62.5	0.74±0.06	1.49±0.23 ^{#@}
	125	0.81±0.06 [*]	1.78±0.54 ^{#@}
	250	0.94±0.06 ^{**}	1.91±0.569 ^{#@}
25nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.71±0.20 [#]	1.04±0.30 [#]
	31.2	0.74±0.15 [#]	1.13±0.31 [#]
	62.5	0.74±0.11 [#]	1.20±0.15
	125	0.84±0.06 [*]	1.26±0.35 [#]
	250	0.81±0.06 ^{**}	1.55±0.35 [#]
25nm金红石型TiO ₂	15.6	0.52±0.05	0.68±0.08
	31.2	0.55±0.05	0.74±0.05
	62.5	0.58±0.14	0.87±0.08
	125	0.65±0.09	0.91±0.12
	250	0.71±0.05	0.97±0.16
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.84±0.45	1.26±0.61
	31.2	0.87±0.35	1.33±0.65
	62.5	0.94±0.30	1.327±0.593
	125	0.87±0.42	1.36±0.51
	250	0.94±0.28	1.42±0.50

注: *: 经 Dunnett's *t* 检验, 与阴性对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p < 0.05$ 。

2.3 纳米 TiO₂ 光催化产物对 SOD 活性的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 SOD 活性下降, 其中 10nm、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米级 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清 SOD 活性下降, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r = -0.662, p = 0.007$)、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r = -0.600, p = 0.018$)、25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r = -0.609, p = 0.016$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 SOD 活性低于金红石型, 差别无统计学意义。

有光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 SOD 活性下降, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米级 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清 SOD 活性下降, 经两变量关联性分析, 25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r = -0.522, p = 0.046$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上

清 SOD 活性低于金红石型, 差别无统计学意义。

光照前后相比, 紫外照射后细胞培养上清 SOD 活性下降, 其中 10nm TiO₂ 组 125μg/mL 剂量组照射前后的差别有统计学意义 ($p < 0.05$) (表 2.7)。

表 2.7 纳米 TiO₂ 光催化产物对 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量(μg/mL)	无光照SOD(U/mgprot)	有光照SOD(U/mgprot)
对照	0	24.032±1.718	22.191±0.813
10nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	23.57±1.962 [#]	21.352±1.145
	31.2	23.699±1.171 [#]	20.992±0.555
	62.5	23.319±1.041 [#]	20.62±0.447
	125	22.559±0.358 [#]	20.48±2.81 [@]
	250	19.861±1.83 ^{*#}	19.14±1.618 [*]
25nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	24.128±2.287	21.978±1.535
	31.2	23.254±1.334	21.098±1.358
	62.5	22.991±1.454	21.163±1.875
	125	22.430±1.738	20.345±1.994
	250	20.707±1.619 [*]	20.428±2.626
25nm金红石型TiO ₂	15.6	24.529±0.886	23.447±0.835
	31.2	23.893±1.252	22.252±1.978
	62.5	23.596±1.839	21.361±2.43
	125	22.448±1.634	21.208±2.324
	250	22.027±1.417	20.592±1.33
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	23.697±1.672	22.115±1.587
	31.2	23.402±2.406	21.633±1.88
	62.5	23.755±1.872	21.867±2.38
	125	22.959±2.907	22.1±2.41
	250	22.712±2.295	21.98±2.065

注: *: 经 *Dunnnett's t* 检验, 与阴性对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p < 0.05$ 。

2.4 纳米 TiO₂ 光催化产物对 GSH-Px 活性的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 GSH-Px 活性下降, 其中高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米级 TiO₂ 组 GSH-Px 活性下降更为明显, 其中 250μg/mL 剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。TiO₂ 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清 GSH-Px 活性下降, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 250μg/mL 剂量组与 15.6、31.2μg/mL 剂量组间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$), 25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 250μg/mL 剂量组与 15.6、31.2、62.5μg/mL 剂量组间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 GSH-Px 活性低于金红石型, 差别在 250μg/mL 剂量组有统计学意义 ($p < 0.05$)。

有光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清

GSH-Px 活性下降, 其中 10nm、25nm、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米级 TiO₂ 组 GSH-Px 活性下降更为明显, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 31.2、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组, 25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组与之对应剂量组间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。TiO₂ 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清 GSH-Px 活性下降, 其中 10nm、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组高剂量组与低剂量组间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 GSH-Px 活性低于金红石型, 差别 15.6、62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组有统计学意义 ($p<0.05$)。

光照前后比较, 光照后细胞培养上清 GSH-Px 活性降低, 其中 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组光照前后的差别有统计学意义 ($p<0.05$) (表 2.8)。

表 2.8 纳米 TiO₂ 光催化产物对 GSH-Px 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	无光照	有光照
		GSH-Px(活力单位)	GSH-Px(活力单位)
对照	0	22.00 \pm 1.00	20.33 \pm 2.52
10nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	19.67 \pm 3.22 [#]	19.33 \pm 3.51 [#]
	31.2	17.67 \pm 4.04 ^{*#}	14.67 \pm 1.53 ^{*##&}
	62.5	16.00 \pm 1.00 [*]	13.00 \pm 2.00 ^{*#}
	125	14.67 \pm 1.12 [*]	10.00 \pm 1.00 ^{*##&}
	250	10.33 \pm 2.31 ^{*##&}	9.33 \pm 1.53 ^{*##&}
25nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	19.00 \pm 1.00 [#]	16.67 \pm 2.08 [#]
	31.2	19.33 \pm 4.16 [#]	17.33 \pm 4.16 [#]
	62.5	18.67 \pm 3.79 [#]	14.33 \pm 2.52 [*]
	125	14.67 \pm 2.08	10.33 \pm 0.58 ^{*##&}
	250	10.33 \pm 1.53 ^{*##&}	9.67 \pm 2.31 ^{*#}
25nm 金红石型 TiO ₂	15.6	21.00 \pm 2.65	23.67 \pm 2.08 ^{&}
	31.2	20.67 \pm 0.58	20.33 \pm 2.52
	62.5	20.67 \pm 1.16	20.67 \pm 2.89 ^{&}
	125	17.67 \pm 3.51 [*]	20.33 \pm 2.52 ^{&}
	250	17.67 \pm 2.89 ^{*&}	20.33 \pm 2.08 ^{&}
200nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	22.33 \pm 3.22	20.67 \pm 4.04
	31.2	19.00 \pm 4.36	21.33 \pm 3.79
	62.5	18.00 \pm 2.00	16.33 \pm 3.22
	125	16.67 \pm 1.53	15.33 \pm 1.16
	250	15.33 \pm 0.58 [*]	13.33 \pm 2.31 ^{*@}

注: * : 经 Dunnett's t 检验, 与阴性对照组比较, $p<0.05$; # : 经 q 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p<0.05$; & : 经 t 检验, 不同染毒组间比较, $p<0.05$; @ : 经 t 检验, 光照前后相比, $p<0.05$ 。

3. 讨论

细胞膜的骨架是脂质双分子层, 外界化学物与膜蛋白及膜脂质的结合可诱发膜通透性的改变。细胞膜的通透性是与其细胞功能相适应的, 通透性的改变是很多毒物作用于细胞膜时常

见的早期反应。在细胞膜上建立新的通透途径和调节膜上原有的通透途径是改变膜通透性的常见作用机理。乳酸脱氢酶 (Lactate Dehydrogenase, LDH) 是一种胞浆标记酶, 细胞膜受损后被释出, 细胞外液中的 LDH 活性是反映膜损伤的较敏感指标^[32], 可反映细胞膜通透性的变化和细胞受损程度^[33]。有研究结果显示, 纳米 TiO₂ 小鼠经口染毒后可使血清 LDH 活性升高, 纳米级 TiO₂ 和微米级 TiO₂ 对染毒小鼠血清 LDH 活性有不同影响^[34]。

本研究结果显示, 10nm 锐钛矿型、25nm 锐钛矿型、25nm 金红石型及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 达到一定浓度时均可引起 Balb/c3T3 细胞外液中 LDH 活性增加 ($p < 0.05$)。细胞培养上清 LDH 含量与 TiO₂ 浓度、晶型、粒径大小及有无光照有关。相同晶型的锐钛矿, 粒径越小对细胞的损伤越严重。LDH 的含量与纳米 TiO₂ 的浓度呈剂量反应关系, 随着剂量的增加, LDH 活性升高。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 对细胞的损伤大于金红石型。这和纳米 TiO₂ 特殊的表面结构有关, 粒径越小, 表面效应越强, 越容易引起细胞的损伤。金红石型 TiO₂ 较锐钛矿稳定, 对细胞的损伤效应小。光照后, 细胞损伤程度大于光照前。

丙二醛 (MDA) 是细胞脂质过氧化降解产物。机体通过酶系统与非酶系统产生的氧自由基可通过生物膜中多不饱和脂肪酸的过氧化引起细胞损伤。丙二醛能改变膜的流动性、交联、结构和功能, 增加膜的脆性, 最终导致膜的破坏。因而测定 MDA 含量可反映机体内脂质过氧化程度, 间接反映细胞损伤的程度^[35]。本研究结果显示, 纳米 TiO₂ 染毒组细胞培养上清内 MDA 含量上升, 纳米 TiO₂ 浓度越高, 细胞培养上清中 MDA 含量越高; 相同晶型的锐钛矿相比, 粒径越小, 细胞培养上清中 MDA 含量越高; 相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 染毒组细胞培养上清 MDA 含量高于金红石型; 光照后, 细胞培养上清 MDA 含量上升。结果提示, 纳米 TiO₂ 染毒可引起细胞的脂质过氧化损伤, 损伤程度和纳米 TiO₂ 的粒径、晶型、浓度及有无紫外照射有关。

谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 可以清除由活性氧和·OH 诱发的脂质过氧化物, 保护细胞膜结构和功能的完整性。有试验显示, 紫外照射引起 SOD、GSH-Px 活性降低, 其清除自由基的能力下降, 修复损伤细胞的能力下降。因而, 自由基损伤的细胞增多, 引起脂质过氧化损伤。SOD (超氧化物歧化酶) 是一种源于生命体的活性物质, 能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质, 是生物体内清除自由基的首要物质。它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞, 复原因自由基造成的细胞伤害。本次实验表明, 纳米 TiO₂ 染毒后, 各剂量组细胞培养上清 SOD、GSH-Px 活性降低, 光照后与光照前相比, SOD、GSH-Px 活性降低。

本研究结果提示纳米 TiO₂ 可以引起细胞膜的损伤, 导致细胞的脂质过氧化损伤, 引起细胞 MDA 含量升高, 而 SOD、GSH-Px 活性降低使细胞脂质过氧化产物 MDA 不能被有效

的清除。MDA 能改变膜的流动性、交联、结构和功能，增加膜的脆性，最终导致膜的破坏，LDH 溢出。光照后细胞的损伤程度加重，光照后纳米 TiO₂ 引起自由基的产生加重了细胞的损伤程度。羟自由基是化学性质最活泼的 ROS，其反应特点是无专一性，几乎能与生物体内的所有物质发生反应，且反应速率快。羟自由基攻击的靶点多是不饱和脂肪酸，引起脂质过氧化反应。因此，细胞中的膜结构都有可能与自由基反应，引起细胞过氧化损伤，引起 MDA 合成增多、细胞膜弹性下降、细胞变僵硬。

第三节 纳米二氧化钛光催化产物对细胞凋亡及细胞间隙通讯的影响

细胞凋亡和细胞间通讯异常可成为细胞的致死性原因。成纤维细胞的凋亡可以导致胶原的合成减少，从而导致光老化的发生。本节主要探讨在有无紫外光照条件下受试纳米 TiO₂ 对 Balb/c3T3 细胞凋亡及细胞间隙通讯的影响，进一步分析纳米 TiO₂ 光催化产物细胞毒作用机制。

1. 材料与方法

1.1 实验材料 同第一章第一节1.1。

1.2 实验细胞 同第本章章第一节 1.2。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 细胞培养试剂及其配制 同第本章章第一节 1.3.1。

1.3.2 主要试剂

Hoechst 33258 (美国 sigma公司)，临用时用PBS配置成浓度为5mg/L的溶液；

荧光黄染料 (美国 sigma公司)，临用时用PBS配置成浓度为0.5g/L的溶液。

1.3.3 主要仪器 同本章第一节 1.3.3。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养 同第二章第一节 1.4.1。

1.4.2 纳米 TiO₂ 悬液的配制 同本章第一节 1.4.2。

1.4.3 Hoechst 33258 核染色观察细胞凋亡

将 Balb/c3T3 细胞以 2×10^4 /孔的密度接种于 6 孔板，37℃、5%CO₂ 培养箱中贴壁生长 24h。加入不同浓度的受试物溶液，相同的受试物浓度序列制备两个板，每块培养板同时设阴性对照，每组设 3 个平行。继续培养 18h，两块板随机选择，其中一块置紫外辐照仪下进行照射，

照射剂量为 $5\text{J}/\text{cm}^2$ ，室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后，继续培养 4h 后终止培养，弃原培养液，用 PBS 清洗细胞 3 次。加入 0.5mL 固定液，固定 10min。PBS 洗 2 遍，5mg/L Hoechst 33258 染液染色 5min。去染色液，用 PBS 或 0.9%NaCl 洗两遍，每次 3 分钟。洗涤时宜用摇床或手动摇晃。荧光显微镜下观察。

1.4.4 细胞间隙连接通讯 (GJIC) 功能的测定

将 Balb/c3T3 细胞以 2×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板， 37°C 、5% CO_2 培养箱中贴壁生长 24h。加入不同浓度的受试物溶液，相同的受试物浓度序列制备两个板，每块培养板同时设阴性对照，每组设 3 个平行。继续培养 18h，两块板随机选择，其中一块置紫外辐照仪下进行照射，照射剂量为 $5\text{J}/\text{cm}^2$ ，室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后，继续培养 4h 后终止培养，弃原培养液，用 PBS 清洗细胞 3 次。用手术刀片在培养板底部轻轻划线数条，加入 2mL 配置好的荧光黄染料，置 37°C 培养箱 10min，吸出染液，再用 PBS 洗 3 次，以去除游离的荧光染料及脱落的细胞，立即置于荧光显微镜下观察细胞间荧光染料的扩散情况并拍照。

1.4.5 资料分析

本实验记录荧光强度随时间变化的相对值，将实验数据录入 Excel 2003，采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析、Dunnett's *t* 检验、多个样本均数两两比较的 *q* 检验、两样本均数比较 *t* 检验及两变量关联性分析。

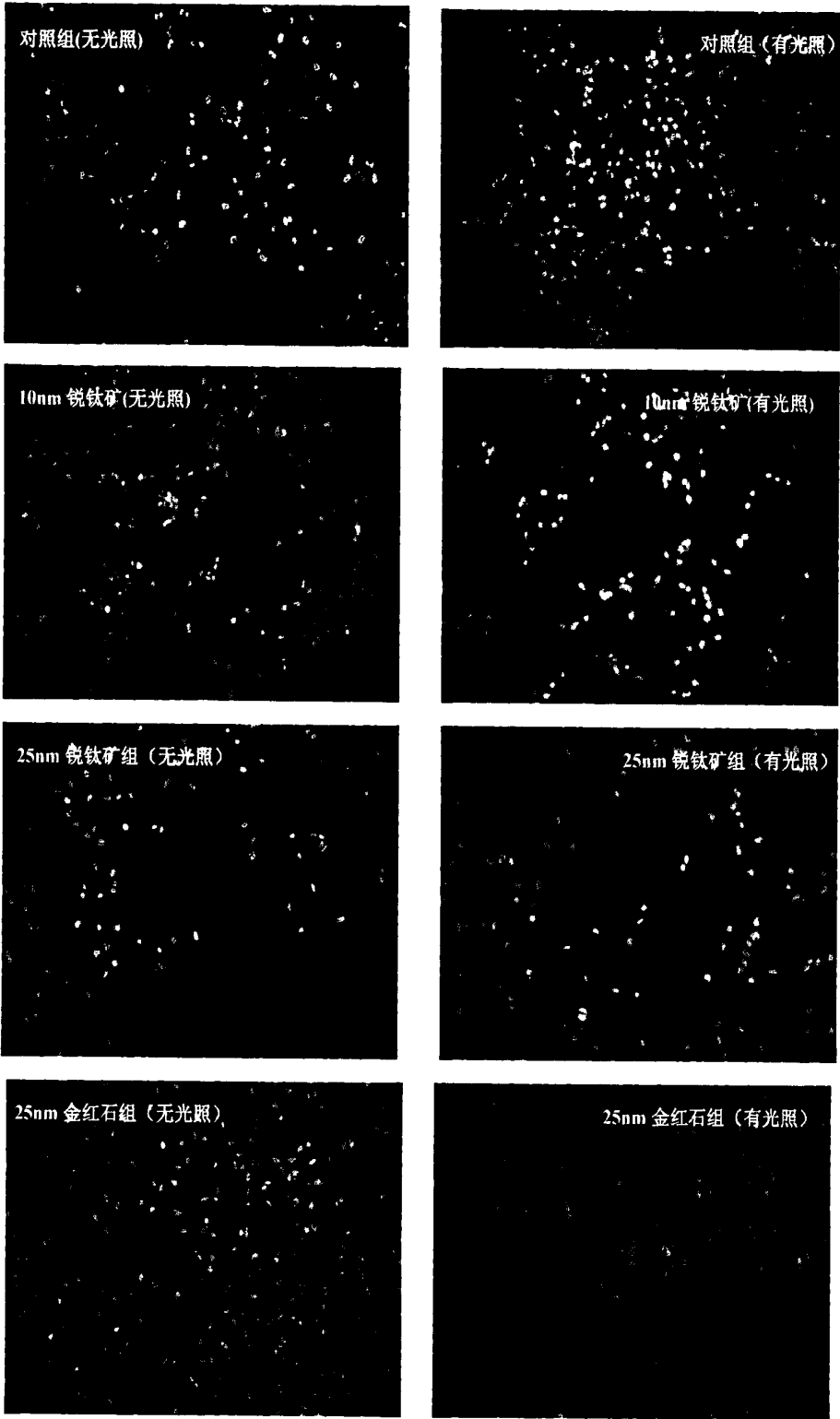
2. 结果

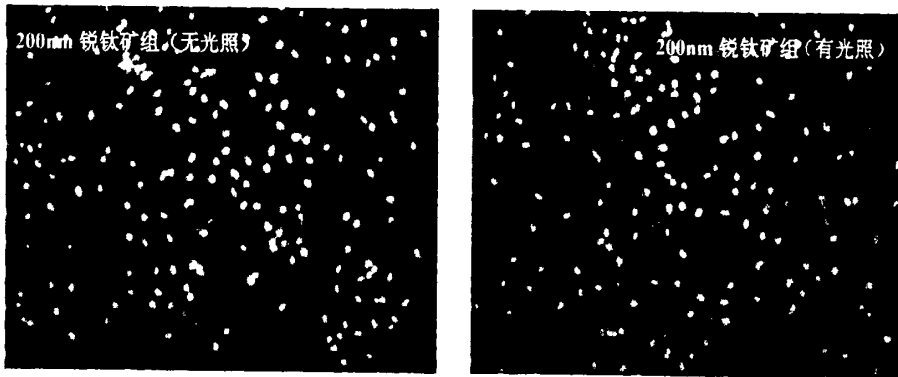
2.1 Hoechst 33258 核染色观察细胞凋亡

镜下随机选取 6 个视野分别计数凋亡细胞和总细胞数，计算凋亡百分率。

$$\text{凋亡百分率} = (\text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}) \times 100\%$$

荧光显微镜下观察可见，对照组凋亡细胞数少，细胞核染色呈正常的蓝色。纳米 TiO_2 组凋亡细胞增加，凋亡细胞染色质固缩，出现体积缩小、核碎裂、核固缩等典型的凋亡形态学改变。随着纳米 TiO_2 浓度的增加，凋亡细胞数增加；锐钛矿型 TiO_2 相比，粒径越小，凋亡细胞数越多；相同粒径下，锐钛矿型 TiO_2 组凋亡细胞数大于金红石型组（图 2.4）。





注：红圈内是凋亡细胞。

图 2.4 不同类型纳米 TiO₂ 染毒后的细胞凋亡观察 (10×10)

无光照处理时,与对照相比,纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞凋亡率上升,其中多数剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比,纳米级 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内,随着浓度的升高,细胞凋亡率上升,经两变量关联性分析,25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.555, p=0.032$)、25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r=0.822, p=0.000$)、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.538, p=0.039$) 存在剂量反应关系。相同粒径下,锐钛矿型 TiO₂ 组细胞凋亡率高于金红石型,但差别无统计学意义。

有光照处理时,与对照相比,纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞凋亡率上升,其中多数剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比,纳米级 TiO₂ 组细胞凋亡率上升,其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组各剂量组、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 62.5、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内,随着浓度的升高,细胞凋亡率上升,经两变量关联性分析,10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.514, p=0.050$)、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.791, p=0.000$)、25nm 金红石型 TiO₂ 组 ($r=0.832, p=0.000$)、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.754, p=0.001$) 存在剂量反应关系。相同粒径下锐钛矿型 TiO₂ 组细胞凋亡率高于金红石型,各剂量组间的差别均有统计学意义 ($p<0.05$)。

光照前后比较,光照后细胞凋亡率上升,其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 染毒组各剂量组、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 15.6、62.5、125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组光照前后的差别有统计学意义 ($p<0.05$) (表 2.9)。

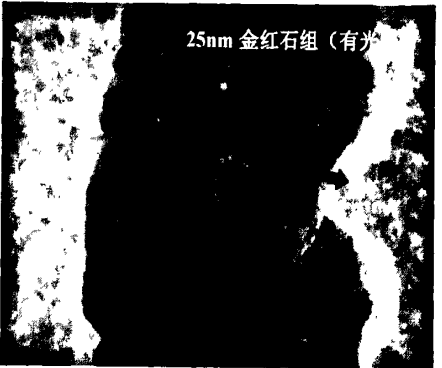
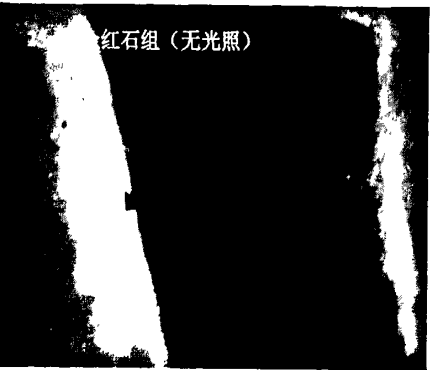
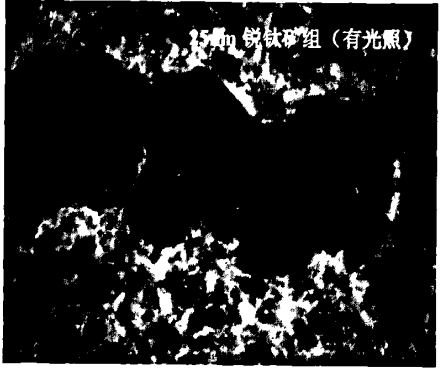
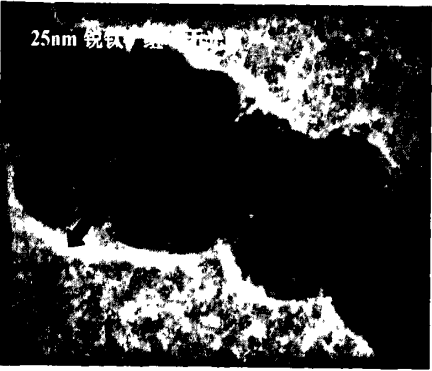
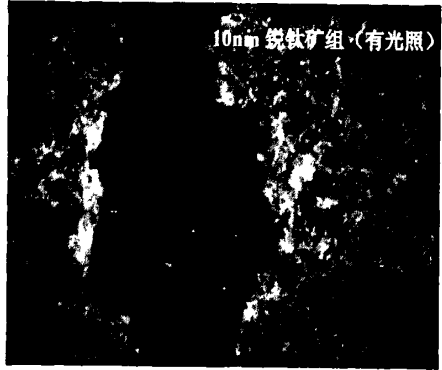
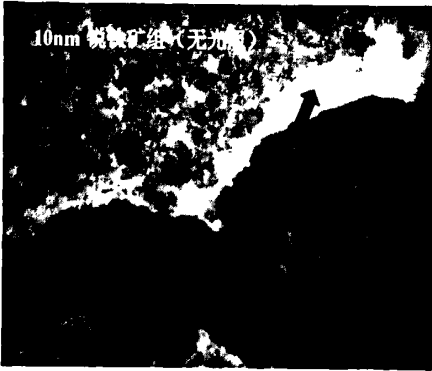
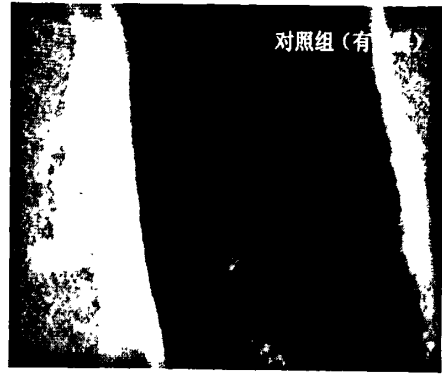
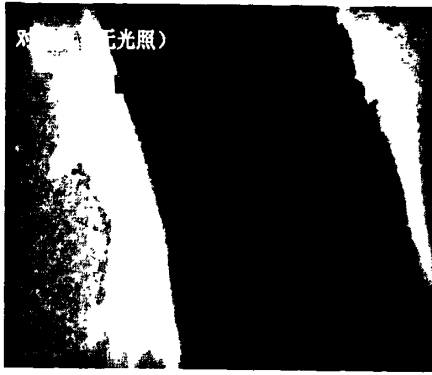
表 2.9 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

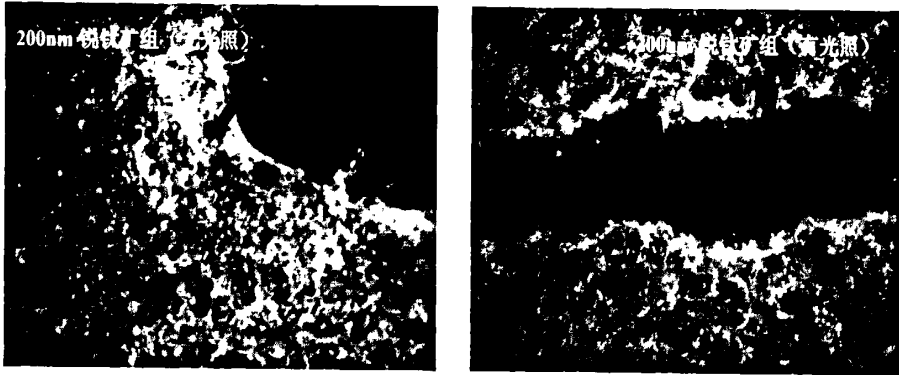
组别	剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	无光照凋亡率 (%)	有光照凋亡率 (%)
阴性对照	0	2.22±0.31	3.89±0.42
10nm锐钛矿TiO ₂	15.6	11.89±5.27*	20.89±2.74* ^{&@}
	31.2	12.89±4.84*	20.56±2.08* ^{&@}
	62.5	14.89±2.31*	27.11±2.74* ^{&@}
	125	15.11±3.36*	25.33±6.13* ^{&@}
	250	18.22±5.45*	28.44±6.42* ^{&@}
25nm锐钛矿TiO ₂	15.6	8.22±3.18	15.22±1.59* ^{#@}
	31.2	9.44±2.44*	14.00±4.24* [#]
	62.5	14.78±5.45*	18.56±3.97* ^{#&@}
	125	12.78±2.01*	25.11±5.50* ^{#@}
	250	17.33±6.69*	36.00±7.07* ^{#&@}
25nm金红石型TiO ₂	15.6	6.33±1.36 [#]	9.00±0.98* ^{&}
	31.2	8.44±0.42*	8.67±1.70* ^{#&}
	62.5	8.89±1.50	11.22±1.10* ^{#&}
	125	12.56±0.83* [#]	12.11±1.03* ^{#&}
	250	12.22±2.08* [#]	16.33±1.78* ^{#&}
200nm锐钛矿TiO ₂	15.6	8.00±1.89 [#]	8.00±2.68
	31.2	13.56±2.69* [#]	8.56±2.53
	62.5	11.56±1.26* [#]	13.67±3.30*
	125	18.33±0.47* [#]	16.56±4.24*
	250	12.89±2.20* [#]	16.89±1.34*

注: *: 经 *Dunnnett's t* 检验, 与阴性对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$; &: 经 *t* 检验, 不同染毒组间比较, $p < 0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p < 0.05$ 。

2.2 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞间隙通讯的影响

图 2.5 所示为细胞划痕染料标记示踪实验结果, 以低剂量组为例, 荧光显微镜下观察可见, 对照组细胞形态完整, 细胞数量多, 染料可以在细胞间进行传递, 传递距离较远。纳米 TiO₂ 组细胞数减少, 细胞散落存在, 染料传递距离近, 表现出对细胞间荧光扩散较强的抑制作用, 抑制作用随剂量增高而增加。锐钛矿型纳米 TiO₂, 粒径越小, 荧光扩散抑制作用越强; 相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 抑制作用大于金红石型 TiO₂ 组。光照后, 由于细胞毒性大, 抑制作用更强。





注：箭头表示荧光沿细胞传递的距离。

图 2.5 不同类型纳米 TiO₂ 染毒后对细胞间隙通讯传递的影响

3. 讨论

机体内自由基代谢失衡，可导致一系列的连锁反应，引起不同程度的细胞毒性，并导致瞬时的或不可逆的损伤。近年来的研究表明，氧化应激是导致细胞凋亡的重要原因之一^[36]。认为活性氧诱导细胞凋亡的可能机制为：氧自由基的增加会导致核因子活化，DNA 的氧化并活化聚-ADP-核糖转录酶，导致细胞凋亡；氧自由基能下调 bcl-2 mRNA 表达，通过 bcl-2 作用于多种途径诱导凋亡^[37]；钙堆积与细胞凋亡密切相关，细胞内钙过量可通过一系列的酶促反应诱导凋亡，氧自由基能刺激线粒体内钙释放而致细胞凋亡^[38]。Singh 等研究表明，纳米级的 TiO₂ 比微米级的 TiO₂ 对细胞产生的炎性损伤更重，产生更多的 IL-8 等炎性因子，更容易引发细胞凋亡^[39-40]。本研究结果显示，TiO₂ 染毒组细胞凋亡率上升，细胞凋亡率与纳米 TiO₂ 的粒径、晶型及染毒剂量有关，随着染毒剂量的增高，粒径越小，细胞凋亡率上升，相同粒径下锐钛矿型 TiO₂ 比金红石型 TiO₂ 染毒组细胞凋亡率高，光照后细胞凋亡率上升，表明光照后产生的羟自由基可促进细胞凋亡进程。

细胞间隙通讯连接（GJIC）的结构单位是嵌在细胞膜上的大分子蛋白，称为连接子（connexon），又称为连接蛋白（connexin）。连接蛋白在电镜下呈六角形，由六个蛋白亚单位组成，与相邻细胞的连接子衔接成亲水性膜通道。通道直径约 15-20Å，只能透过分子量小于 1KD 的分子和离子。它们可以是细胞内代谢产物，次级信使 cAMP、Ca²⁺ 以及其他参与细胞生长分化的调节性物质。众多研究已表明，GJIC 在传递信号、调控细胞的增殖分化和代谢方面起重要作用，并与细胞癌变密切相关^[41-42]，GJIC 功能异常或缺失常成为肿瘤细胞的特征之一，表现为癌细胞间和/或癌细胞与正常细胞间的信息传递受阻，肿瘤细胞因失去周围正常细胞的生长调控而无限增殖，最终形成肿瘤。GJIC 功能指标已作为评价促癌物的依据之一。本研究结果显示，纳米 TiO₂ 表现出对细胞 GJIC 功能有抑制作用，荧光传递距离下降，且随着染毒剂量的增加、粒径的减小对 GJIC 的抑制作用增强；相同粒径的锐钛矿型 TiO₂ 比金红石

型 TiO₂ 抑制作用强；光照和纳米 TiO₂ 联合染毒，抑制作用更强，有一定的协同作用。关于纳米 TiO₂ 是否有致癌作用还缺乏系统的研究报告。

综上所述，纳米 TiO₂ 染毒导致细胞凋亡率上升，细胞间隙通讯功能受损，且损伤程度与 TiO₂ 晶型、粒径、浓度及光照有关。光照后明显促进细胞凋亡和细胞间隙通讯功能受损，显示出纳米 TiO₂ 光催化产物对细胞作用的多靶点效应和羟自由基在此过程中的主导地位。

第四节 纳米二氧化钛光催化产物对细胞分泌功能的影响

成纤维细胞是皮肤真皮中的主体细胞成分，其分泌的胶原纤维、弹性纤维及基质成分，与成纤维细胞一同构成了真皮的主体。已有大量的研究证明在皱纹形成过程中，成纤维细胞是主要的效应细胞，它的生物学特性改变是皮肤老化的决定性因素^[43]。此外，成纤维细胞合成和分泌的 TNF- α 及 IL- 1β 等细胞因子在紫外线辐射引起的皮肤光老化以及炎症反应的发生过程中，也发挥着重要作用。此外成纤维细胞可分泌白介素 6 (Interleukin 6, IL-6)，表皮生长因子 (Keratinocyte growth factor, KGF)，促进角质形成细胞的增殖，加速上皮化，促进创伤的愈合。本节通过对 Balb/c3T3 细胞分泌胶原和细胞因子的研究，初步探讨纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌功能的影响。

1. 材料与方法

1.1 试验材料 同第一章第一节1.1。

1.2 实验细胞 同第二章第一节 1.2。

1.3 试剂与仪器

1.3.1 细胞培养试剂及其配制 同第本章第一节1.3.1。

1.3.2 其他试剂 MMP-1、MMP-3、羟脯氨酸测定试剂盒（购自南京建成生物工程研究所）。

1.3.3 主要仪器 同本章第一节 1.3.3。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 同第二章第一节1.4.1。

1.4.2 TiO₂悬液的配制 同本章第一节1.4.2。

1.4.3 羟脯氨酸、MMP-1、MMP-3测定

细胞悬液 (1.5×10^5 /ml) 接种于24孔板，1mL/孔，37℃、5%CO₂培养箱中贴壁生长24h。加入不同浓度的受试物溶液，相同的受试物浓度序列制备两个板，每块培养板同时设阴性对

照, 每组设3个平行。继续培养18h, 两块板随机选择, 其中一块置紫外辐照仪下进行照射, 照射剂量为 $5\text{J}/\text{cm}^2$, 室温下将另一块置于暗盒内。照射结束后, 继续培养4h后取上清按试剂盒说明分别检测细胞外液中羟脯氨酸、MMP-1、MMP-3含量。

1.4.4 细胞因子 (IL-1、IL-6、TNF- α) 含量测定 方法同上。

1.5 资料分析

将实验数据录入 Excel 2003, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析、Dunnetts'*t* 检验、多个样本均数两两比较的 *q* 检验、两样本均数比较 *t* 检验及两变量关联性分析。

2. 结果

2.1 纳米 TiO_2 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞上清胶原含量的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO_2 组及 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组细胞培养上清胶原含量降低, 10nm、25nm 锐钛矿型 TiO_2 组高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组相比, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组胶原含量降低 ($p<0.05$)。 TiO_2 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清胶原含量降低, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=-0.785, p=0.001$)、25nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=-0.766, p=0.001$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO_2 组细胞培养上清胶原含量低于金红石型, 差别在 62.5、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组有统计学意义 ($p<0.05$)。

有光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO_2 组及 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组细胞培养上清胶原含量降低, 10nm、25nm 锐钛矿型 TiO_2 组高剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO_2 组相比, 纳米 TiO_2 组胶原含量降低, 但差别无统计学意义。 TiO_2 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清胶原含量降低, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=-0.796, p=0.000$)、25nm 锐钛矿型 TiO_2 组 ($r=-0.746, p=0.001$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO_2 组细胞培养上清胶原含量低于金红石型, 差别在 125、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组有统计学意义 ($p<0.05$)。

光照前后各组胶原含量的变化无统计学意义 (表 2.10)。

表 2.10 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞上清胶原含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	无光照胶原含量 ($\mu\text{g/mgprot}$)	有光照胶原含量 ($\mu\text{g/mgprot}$)
对照	0	19.80 \pm 2.77	18.50 \pm 1.09
10nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	18.73 \pm 2.44 [#]	17.02 \pm 1.20
	31.2	15.51 \pm 0.68 ^{*#}	16.69 \pm 1.13
	62.5	13.53 \pm 1.28 ^{*#}	13.84 \pm 1.86 [*]
	125	13.57 \pm 1.11 ^{*&#}	12.38 \pm 1.94 [*]
	250	12.34 \pm 0.86 ^{*#}	11.72 \pm 2.27 [*]
25nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	18.73 \pm 0.48 [#]	17.24 \pm 0.65
	31.2	17.03 \pm 1.98	16.45 \pm 0.55
	62.5	15.63 \pm 0.66 [*]	13.74 \pm 2.00 [*]
	125	15.62 \pm 0.91 [*]	12.49 \pm 1.68 [*]
	250	14.66 \pm 0.26 ^{*#}	11.57 \pm 3.20 [*]
25nm 金红石型 TiO ₂	15.6	17.70 \pm 2.10	18.07 \pm 1.47
	31.2	19.04 \pm 0.48	18.25 \pm 1.11
	62.5	18.96 \pm 0.34 ^{&}	18.07 \pm 2.20
	125	19.72 \pm 0.77 ^{&}	18.71 \pm 0.42 ^{&}
	250	16.61 \pm 3.52	17.89 \pm 3.04 ^{&}
200nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	17.64 \pm 0.84	17.48 \pm 2.54
	31.2	15.63 \pm 0.88	16.66 \pm 2.82
	62.5	15.66 \pm 1.22	14.99 \pm 2.91
	125	16.43 \pm 0.86	14.65 \pm 2.51
	250	14.49 \pm 3.00	13.87 \pm 1.32

注: *: 经 Dunnett's *t* 检验, 与阴性对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$; &: 经 *t* 检验, 不同染毒组间比较, $p < 0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p < 0.05$ 。

2.2 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞培养上清 MMP-1 含量的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MMP-1 含量升高, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 62.5、125、250 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组, 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 125、250 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组与其对应剂量间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着浓度的升高, 细胞培养上清中 MMP-1 升高, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.874, p=0.000$)、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.775, p=0.001$) 存在剂量反应关系。

有光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MMP-1 含量上升 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MMP-1 含量升高, 但差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清 MMP-1 含量升高, 但各剂量组间的差别均无统计学意义。

光照前后比较, 光照后细胞培养上清 MMP-1 含量升高, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 15.6、31.2、62.5 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组, 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组光照前后的差别有统计

学意义 ($p<0.05$) (表 2.11)。

表 2.11 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 MMP-1 的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	无光照MMP-1 (ng/mL)	有光照MMP-1 (ng/mL)
对照	0	343.99 \pm 22.22	348.59 \pm 24.42
10-nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	352.27 \pm 25.72 [#]	469.82 \pm 7.50* [@]
	31.2	363.08 \pm 44.78 [#]	502.72 \pm 23.59* [@]
	62.5	407.02 \pm 37.26* [#]	502.49 \pm 38.10* [@]
	125	445.21 \pm 7.09* [#]	502.49 \pm 49.56*
	250	512.61 \pm 1.30*	522.27 \pm 29.04*
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	302.82 \pm 81.67	460.16 \pm 22.26* [@]
	31.2	414.67 \pm 15.94	461.31 \pm 10.46*
	62.5	422.89 \pm 8.09	461.31 \pm 10.43*
	125	495.81 \pm 63.21*	459.93 \pm 31.61*
	250	503.18 \pm 47.12*	496.50 \pm 3.30*

注: *: 经 Dunnett's *t* 检验, 与对照组比较, $p<0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p<0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p<0.05$ 。

2.3 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞培养上清 MMP-3 含量的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MMP-3 含量升高, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 62.5、125、250 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组, 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 125、250 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清中 MMP-3 升高, 但差别无统计学意义。

有光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 MMP-3 含量上升, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 31.2、125 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组, 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组各剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。各染毒组内部比较, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清 MMP-3 含量升高, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.530, p=0.042$)、存在剂量反应关系。

光照前后比较, 光照后细胞培养上清 MMP-3 含量升高, 但差别没有统计学意义 (2.12)。

表 2.12 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 MMP-3 影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组 别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	无光照MMP-3 (ng/mL)	有光照MMP-3 (ng/mL)
对 照	0	27.01 \pm 2.64	30.53 \pm 2.04
10nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	34.28 \pm 4.96	38.96 \pm 1.97
	31.2	34.67 \pm 2.38	43.23 \pm 2.36*
	62.5	38.39 \pm 6.95*	42.75 \pm 9.77
	125	40.13 \pm 2.68*	45.03 \pm 1.22*
	250	40.38 \pm 1.02*	46.53 \pm 3.20
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	33.80 \pm 1.20	42.42 \pm 1.77*
	31.2	34.25 \pm 1.20	42.63 \pm 2.68*
	62.5	35.42 \pm 6.37	44.37 \pm 3.82*
	125	37.94 \pm 4.87*	45.57 \pm 2.91*
	250	41.85 \pm 8.56*	45.45 \pm 2.58*

注: *: 经 *Dunnett's t* 检验, 与对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p < 0.05$ 。

2.4 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 IL-1 的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-1 含量升高, 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-1 含量降低, 多数剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 10nm、25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-1 含量升高, 125 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组与其对应剂量组之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。TiO₂ 各染毒组内, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清中 IL-1 含量升高, 但差别无统计学意义, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.589, p=0.021$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-1 含量低于金红石型, 但差别无统计学意义。

有光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-1 含量升高, 多数剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清中 IL-1 含量升高, 但差别无统计学意义。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-1 含量低于金红石型, 但差别无统计学意义。

光照前后比较, 光照后 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-1 含量下降, 其中 125 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组光照前后的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组光照后细胞培养上清 IL-1 含量上升, 各剂量组的差别均有统计学意义 ($p < 0.05$) (表 2.13)。

表 2.13 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 IL-1 的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	剂量 ($\mu\text{g/mL}$)	无光照IL-1(ng/mL)	有光照IL-1(ng/mL)
对照	0	0.16±0.03	0.132±0.01
10nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.26±0.01*	0.22±0.04*
	31.2	0.26±0.09	0.24±0.04*
	62.5	0.25±0.05	0.25±0.01*
	125	0.38±0.01* ^{&}	0.25±0.05* [@]
	250	0.34±0.08*	0.28±0.02*
25nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.27±0.01*	0.15±0.09
	31.2	0.27±0.14	0.18±0.07
	62.5	0.27±0.06*	0.24±0.10
	125	0.27±0.09 ^{&}	0.24±0.05*
	250	0.31±0.06*	0.24±0.08*
25nm金红石型TiO ₂	15.6	0.27±0.13	0.32±0.06*
	31.2	0.28±0.08*	0.30±0.06*
	62.5	0.31±0.08*	0.28±0.04*
	125	0.24±0.08	0.25±0.10
	250	0.26±0.08	0.20±0.04*
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.12±0.04	0.29±0.12* [@]
	31.2	0.13±0.05	0.29±0.04* [@]
	62.5	0.14±0.04	0.28±0.07* [@]
	125	0.09±0.02*	0.31±0.04* [@]
	250	0.17±0.04	0.30±0.04* [@]

注: *: 经 Dunnett's *t* 检验, 与阴性对照组比较, $p < 0.05$; #: 经 *q* 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p < 0.05$; &: 经 *t* 检验, 不同染毒组间比较, $p < 0.05$; @: 经 *t* 检验, 光照前后相比, $p < 0.05$ 。

2.5 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 IL-6 的影响

无光照处理时, 与对照相比, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-6 含量在剂量小于 125 $\mu\text{g/mL}$ 时降低, 其中 15.6、31.2 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p < 0.05$); 25nm、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-6 含量上升, 多数剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米 TiO₂ 组细胞培养上清含量降低, 但差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清中 IL-6 含量差别无统计学意义, 经两变量关联性分析, 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.663$, $p=0.007$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 与金红石型 TiO₂ 染毒组细胞培养上清 IL-6 含量没有差别。

有光照处理时, 与对照相比, 10nm 锐钛矿型、25nm 金红石型、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-6 高剂量组含量升高, 25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组在 125 $\mu\text{g/mL}$ 及以下剂量组细胞培养上清 IL-6 含量下降, 其中 15.6 $\mu\text{g/mL}$ 剂量组与对照的差别有统计学意义 ($p < 0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 纳米 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-6 含量降低, 但差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清中 IL-6 含量差别无统计学意义,

经两变量关联性分析, 25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 ($r=0.610$, $p=0.016$) 存在剂量反应关系。相同粒径下, 锐钛矿型 TiO₂ 比金红石型 TiO₂ 染毒组细胞培养上清 IL-6 含量低, 其中 15.6、62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。

光照前后比较, 光照后 10nm 锐钛矿型、25nm 金红石型 TiO₂ 组细胞培养上清 IL-6 含量上升, 其中 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组光照前后的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。25nm、200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组光照后细胞培养上清 IL-6 含量下降, 25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 15.6、31.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组光照前后的差别有统计学意义 ($p<0.05$) (表 2.14)。

表 2.14 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组 别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	无光照 IL-6 (ng/mL)	有光照 IL-6 (ng/mL)
对 照	0	158.80 \pm 2.22	172.78 \pm 54.37
10nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	99.24 \pm 29.87*	158.74 \pm 66.01
	31.2	131.81 \pm 18.54*	193.78 \pm 108.92
	62.5	135.34 \pm 27.51	189.60 \pm 17.06@
	125	158.43 \pm 27.33	206.16 \pm 48.41
	250	207.80 \pm 65.68	280.70 \pm 63.33
25-nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	240.63 \pm 54.75*	80.09 \pm 7.24* & @
	31.2	252.48 \pm 36.21*	135.28 \pm 41.21@
	62.5	173.22 \pm 79.07	150.38 \pm 55.31
	125	230.72 \pm 49.24	155.70 \pm 64.21
	250	242.14 \pm 134.58	228.96 \pm 82.80
25nm 金红石型 TiO ₂	15.6	200.12 \pm 1.18*	247.08 \pm 88.53&
	31.2	140.35 \pm 32.45	223.64 \pm 57.38
	62.5	134.72 \pm 59.95	279.84 \pm 51.42&
	125	166.32 \pm 21.78	217.90 \pm 66.39
	250	161.54 \pm 82.68	217.83 \pm 34.72
200nm 锐钛矿型 TiO ₂	15.6	282.20 \pm 84.14*	177.19 \pm 19.33
	31.2	347.76 \pm 113.00*	164.78 \pm 52.71
	62.5	263.41 \pm 25.06*	238.58 \pm 15.50
	125	284.29 \pm 43.53*	204.31 \pm 54.66
	250	209.28 \pm 74.19	256.28 \pm 63.98

注: *: 经 Dunnett's t 检验, 与阴性对照组比较, $p<0.05$; #: 经 q 检验, 各染毒组内不同剂量间比较, $p<0.05$; &: 经 t 检验, 不同染毒组间比较, $p<0.05$; @: 经 t 检验, 光照前后相比, $p<0.05$ 。

2.6 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 TNF- α 的影响

无光照处理时, 与对照相比, 纳米级 TiO₂ 组及 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组细胞培养上清中 TNF- α 含量与其之间的差别无统计学意义。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比, 仅 25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 15.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量组与其之间的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。TiO₂ 各染毒组内, 随着染毒剂量的增高, 细胞培养上清中 TNF- α 含量差别无统计学意义。相同粒径下, 锐钛矿型

TiO₂与金红石型 TiO₂ 染毒组细胞培养上清 TNF- α 含量没有差别。

有光照处理时,与对照相比,10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 62.5、125 μ g/mL 剂量组细胞培养上清 TNF- α 含量升高 ($p<0.05$),25nm 锐钛矿型 TiO₂ 组在 62.5 μ g/mL 及以上剂量组细胞培养上清 TNF- α 含量上升 ($p<0.05$),200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组在剂量为 15.6 μ g/mL 时细胞上清 TNF- α 含量低于对照组 ($p<0.05$),在剂量为 62.5 μ g/mL 时细胞上清 TNF- α 含量高于对照组 ($p<0.05$)。与 200nm 锐钛矿型 TiO₂ 组相比,纳米 TiO₂ 组与其之间的差别无统计学意义。TiO₂ 各染毒组内,随着染毒剂量的增高,细胞培养上清中 TNF- α 含量差别无统计学意义。相同粒径下,锐钛矿型 TiO₂ 与金红石型 TiO₂ 染毒组细胞培养上清 TNF- α 含量没有差别。

光照前后比较,光照后 10nm 锐钛矿型 TiO₂ 组 31.2 μ g/mL 剂量组光照前后的差别有统计学意义 ($p<0.05$),光照后 TNF- α 含量是光照前的 1.37 倍。其余各组差别无统计学意义 (表 2.15)。

表 2.15 纳米 TiO₂ 光催化产物对 Balb/c3T3 细胞分泌 TNF- α 的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 (μ g/mL)	无光照 TNF- α (ng/mL)	有光照 TNF- α (ng/mL)
对照	0	0.99 \pm 0.41	1.20 \pm 0.02
10-nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	1.65 \pm 0.28	1.42 \pm 0.28
	31.2	0.94 \pm 0.38	1.39 \pm 0.09 [@]
	62.5	1.70 \pm 0.20	1.62 \pm 0.17 [*]
	125	1.32 \pm 0.48	1.99 \pm 0.32 [*]
	250	1.62 \pm 0.55	1.39 \pm 0.20
25-nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	0.72 \pm 0.23 ^{&}	0.88 \pm 0.30
	31.2	0.88 \pm 0.32	1.43 \pm 0.34
	62.5	1.99 \pm 0.99	1.67 \pm 0.21 [*]
	125	1.33 \pm 0.40	1.57 \pm 0.36 [*]
	250	1.27 \pm 0.18	1.71 \pm 0.38 [*]
25-nm金红石型TiO ₂	15.6	1.23 \pm 0.14	1.24 \pm 0.06
	31.2	1.04 \pm 0.39	1.52 \pm 0.36
	62.5	1.67 \pm 0.89	1.34 \pm 0.58
	125	1.54 \pm 0.23	1.48 \pm 0.33
	250	1.84 \pm 0.87	1.18 \pm 0.20
200nm锐钛矿型TiO ₂	15.6	1.33 \pm 0.46	0.78 \pm 0.25 [*]
	31.2	1.33 \pm 0.36	1.23 \pm 0.44
	62.5	1.26 \pm 0.30	1.88 \pm 0.46 [*]
	125	1.11 \pm 0.08	1.18 \pm 0.42
	250	1.17 \pm 0.60	1.26 \pm 0.37

注: *: 经 Dunnett's t 检验,与阴性对照组比较, $p<0.05$; #: 经 q 检验,各染毒组内不同剂量间比较, $p<0.05$; &: 经 t 检验,不同染毒组间比较, $p<0.05$; @: 经 t 检验,光照前后相比, $p<0.05$ 。

3. 讨论

成纤维细胞是真皮中最主要的细胞成分，在皮肤光老化的形成中具有重要作用，对成纤维细胞在皮肤光老化形成中的作用进行研究，可以为阐明皮肤光老化的形成机制及寻找有效的防制手段提供理论依据，同时也为阐明细胞衰老与器官老化之间的关系提供线索。胶原蛋白是皮肤组织中细胞外基质的主要成分，主要是由真皮层中的皮肤成纤维细胞合成，正常情况下 I 型胶原含量最多，但在光老化细胞中，胶原含量减少^[44]。本研究结果显示，在细胞培养上清中，纳米 TiO₂ 染毒组胶原含量降低，胶原含量随着纳米 TiO₂ 染毒浓度的增加而减少；锐钛矿型 TiO₂ 染毒组，随着粒径的减小，胶原含量减少；相同粒径下，锐钛矿组胶原含量小于金红石组；光照后胶原含量明显少于光照前。

皮肤光老化的主要改变是真皮层细胞外基质成分的变化，从而引起了光老化皮肤特有的粗深皱纹。基质金属蛋白酶家族参与正常组织和异常组织的构建，在各种生理病理条件下细胞外基质降解和重塑起着关键作用^[45]。皮肤光老化最重要的变化主要是由于以细胞外基质为底物的基质金属蛋白酶 (matrix metallo proteinases, MMPs) 增高所致的纤维结缔组织降解。已有体内研究证明紫外线辐射后诱导人体皮肤产生 MMPs, MMPs 能特异地降解几乎所有的细胞外基质成分，在皮肤光老化中起着重要作用^[46]。I、III 型胶原是构成真皮细胞外基质的主要成分，而 MMP-1 (间质胶原酶)、MMP-3 (基质溶解素) 是降解真皮细胞外基质成分的两类主要酶类。既往研究表明，UVA 诱导皮肤产生的 ROS 可进一步激活丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路，促进 MMPs 的表达，同时抑制胶原的合成，从而造成光老化皮肤特征性的改变^[47-48]。

MMP-1、MMP-3 含量测定实验选用 10nm、200nm 锐钛矿 TiO₂ 进行比较，结果表明，纳米 TiO₂ 染毒组细胞培养上清 MMP-1、MMP-3 含量上升。MMP-1、MMP-3 含量与纳米 TiO₂ 浓度、粒径及有无光照有关。随着纳米 TiO₂ 浓度的升高，粒径的减小，细胞培养上清 MMP-1、MMP-3 含量升高；光照组 MMP-1、MMP-3 含量高于未光照组。

IL-1 主要存在于正常皮肤的棘层中，由活化的单核吞噬细胞、角质形成细胞、树突状细胞、成纤维细胞和血管内皮细胞产生，可分为 IL-1 α 和 IL-1 β 两种类型，能促进活化 T、B 细胞增生和分化，促进 CSF 对骨髓细胞的作用，刺激合成前列腺素等激素，还能够诱导 IL-6 的表达。IL-1 在皮肤光老化的真皮胶原过度降解中发挥着重要的作用^[49]。IL-6 具有多种生物活性，调节创伤后机体免疫紊乱状态细胞，释放大炎症介质。TNF- α 能诱导 IL-6 的释放，而 IL-6 又可诱导 TNF- α 、IL-1 β 等促炎细胞因子产生，参与细胞因子网络的级联反应。TNF- α 具有炎性源作用，可以增强机体早期非特异性免疫防御功能，同时 TNF- α 还能够诱导 MHC 类分子表达增强，从而促进 T 细胞的活化，诱导特异性免疫应答。当体内这些细胞因子过量产生时就会造成对正常组织的伤害。它们作为炎症介质在加重局部炎症的同时，还可通过循

环引起远处组织损伤, 严重者导致多系统器官障碍、衰竭^[50-51]。

有研究表明, 小鼠单核巨噬细胞系 (PAW_{264.7}) 暴露于颗粒物 PM_{2.5} 后, PAM 暴露于颗粒物 PM₁₀ 后, 它们分泌的 TNF- α 、IL-6 均升高, PM_{2.5} 还可引起人肺泡上皮细胞 (A₅₄₉) 培养上清液中 IL-6 分泌量的增加, 并且 PM_{2.5} 染毒致 PAM 释放细胞炎性因子的作用强于 PM₁₀ 染毒^[52-55]。

结果显示, 纳米 TiO₂ 染毒后, 各实验组细胞内 IL-1 水平表达升高, 而 TNF- α 、IL-6 在染毒剂量较大亦增高, 并与纳米 TiO₂ 粒径及是否光照有关; 随着粒径的减小, IL-1、TNF- α 表达水平升高, 细胞培养上清 IL-6 含量降低。相同粒径的锐钛矿型 TiO₂ 与金红石型的差别无统计学意义。

本研究结果显示, 纳米 TiO₂ 染毒后, 细胞胶原含量降低, 基质金属蛋白酶含量升高, 可能与光照后纳米 TiO₂ 产生的羟自由基引起了细胞活性下降, 导致合成胶原的能力下降有关。此外, 纳米 TiO₂ 的超微性, 使得它可以轻松地通过细胞膜进入细胞内, 甚至通过细胞核膜, 进入细胞核内^[56]。进一步加重了细胞功能的损伤, 胶原合成能力下降。另一方面, 纳米 TiO₂ 染毒导致细胞基质金属蛋白酶含量增高, 从而导致基质金属蛋白酶降解细胞外基质, 也是引起细胞培养上清胶原含量减少的原因之一。光照后细胞 MMP-1、MMP-3 含量升高, 提示纳米 TiO₂ 与紫外线具有一定的协同作用。有资料显示, 光照后产生的自由基可以激活丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路, 促进 MMPs 的表达, 促进光老化的形成^[57]。另外, 本研究结果显示, 纳米 TiO₂ 染毒后, 对细胞炎性因子的释放有一定影响, 粒径越小、染毒剂量越高影响越大, 但与有无光照没有明显相关性。

第三章 纳米二氧化钛光催化产物对SD大鼠的皮肤毒性作用

Skin Toxicity of Photocatalytic Products of TiO₂ Nanoparticles on Sprague-Dawley (SD) Rats

纳米TiO₂粒径小于100nm时,具有很强的散射和吸收紫外光的能力。当纳米TiO₂在化妆品中的含量为10%时,防晒系数可达30;含量为5%时,防晒系数可达15,建议最理想的用量为5%-20%^[58]。

本章在体外细胞实验的基础上选择10纳米TiO₂作为研究对象,选择化妆品添加时理想浓度的最高用量作为受试浓度,对大鼠皮肤进行染毒,并进行紫外照射,进一步探讨纳米TiO₂紫外照射后的生物安全性。

第一节 纳米二氧化钛光催化产物对大鼠皮肤的光老化作用

我们通过对纳米TiO₂光催化活性的测定及细胞毒性的观察,证实了纳米TiO₂经紫外照射后可产生羟自由基并可引起体外培养细胞活性降低、凋亡以及细胞分泌功能损伤,细胞分泌胶原纤维含量降低,导致体外培养细胞表现出光老化特征等。本节将通过对SD大鼠皮肤染毒后,观察有无紫外照射条件下纳米TiO₂的皮肤光老化作用。

1. 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试验动物

选用清洁级SD大鼠,体重130-150g,雌雄各半,共40只,由南京市盛民动物养殖场提供,动物合格证号:SCXK(苏)2009-0002。

1.1.2 实验材料

10nm锐钛矿型TiO₂购自杭州万景新材料有限公司,纯度>95%。

1.1.3 主要仪器及试剂

细胞超声粉碎机(宁波海曙科生超声波有限公司);

皮肤光毒试验仪(8130A,天津合普工贸有限公司);

羟脯氨酸试剂盒(购自南京建成生物研究所)。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米TiO₂混悬液制备 称取10nm锐钛矿型TiO₂溶于蒸馏水中,配成质量分数为20%

的混悬液，超声分散备用。

1.2.2 染毒方式

纳米 TiO₂ 暴露组在紫外照射前，大鼠背部分别涂抹纳米 TiO₂，涂抹量为 2 μ L/cm²。

1.2.3 实验分组

将 40 只 SD 大鼠称重后随机分组，每组 10 只，雌雄各半。SPF 动物房饲养，标准饲料自由摄食饮水，温度 20~25℃，相对湿度 40~60%，12h 人工光照，适应 7 天。实验分为 4 组，包括对照组、纳米 TiO₂ 涂抹组、UV 组、纳米 TiO₂+UV 组；大鼠背部去毛，按设计组别进行染毒；应用皮肤光毒检测仪（波长 365nm，照射剂量 10J/cm²）实施 UVA 照射，范围 3cm×3cm，连续照射 21 天。

1.2.4 皮肤胶原含量、IL-1、IL-6、TNF- α 测定

在染毒期间，观察动物的一般表现如摄食、饮水、中毒体征及发生过程、死亡情况。每 7 天称重 1 次。染毒结束后，取暴露部位皮肤，一部分进行组织病理学检查和电镜观察，另一部皮肤剪制成 10%的组织匀浆，在冰浴下超声破碎后 4℃下 3000r/min 离心 15 min，取上清液分别测定胶原含量、IL-1、IL-6、TNF- α 。

1.3 资料分析

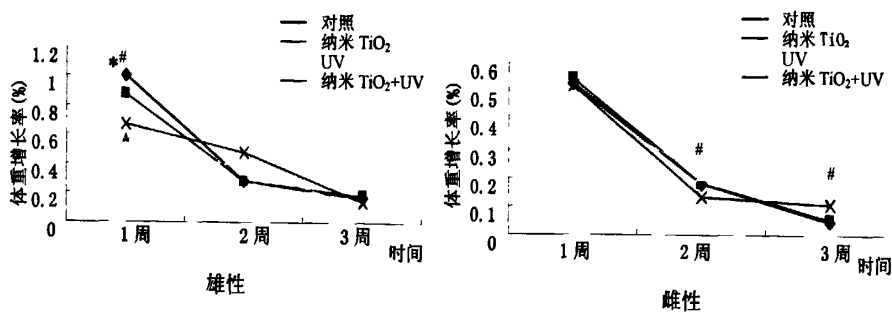
将实验数据录入 Excel 2003，采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析、Dunnett's *t* 检验及两样本比较 *t* 检验。

2. 结果

2.1 一般情况及体重变化

染毒期间，未观察到大鼠死亡，正常对照组营养及精神状况良好，实验组健康状况良好，无明显不适症状。

染毒期间各组体重变化情况见图 3.1，雄性大鼠，与对照组比，体重增长率仅在第一周时差别有统计学意义，UV 组、纳米 TiO₂+UV 体重增长率降低 ($p<0.05$)；三个不同处理组内比较，UV 组体重增长率低于纳米 TiO₂ 涂抹组 ($p<0.05$)。雌性大鼠，与对照相比，三个处理组与对照的差别无统计学意义；三个不同处理组内相比，第二周时纳米 TiO₂+UV 组体重增长率低于 UV 组 ($p<0.05$)；第三周时纳米 TiO₂ 涂抹组体重增长率低于 UV 组 ($p<0.05$)。



注: *: 与对照组相比, $p < 0.05$; #: 各实验组相比, $p < 0.05$ 。

图 3.1 不同处理组大鼠体重变化

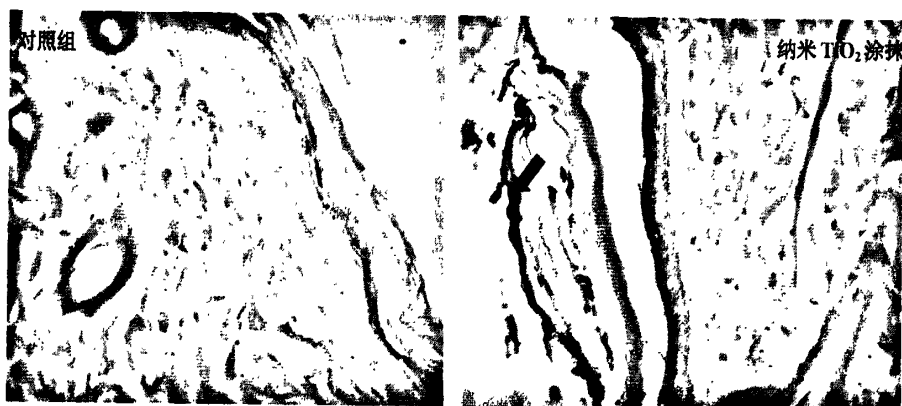
2.2 组织病理学检测结果

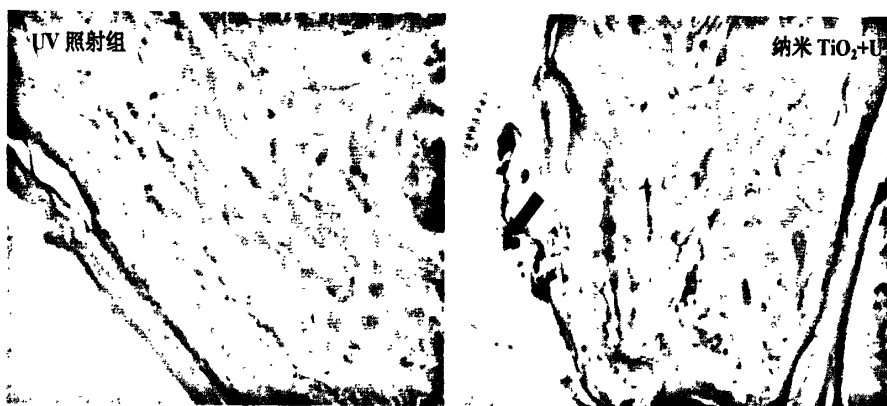
2.2.1 大体观察

对照组、纳米 TiO₂ 组、UV 组大鼠背部皮肤无肉眼可见变化, 脱毛部位毛发生长正常, 皮肤无红斑、水肿。纳米 TiO₂+UV 组大鼠皮肤出现松弛, 照射部位皮肤捏起后不易恢复。各处理组脏器均无肉眼可见变化。

2.2.2 光学显微镜观察

光镜下可见四个不同处理组大鼠皮肤表皮层与真皮层厚度无明显改变, 真皮层胶原纤维排列整齐, 皮肤各层无炎性浸润。纳米 TiO₂ 涂抹组皮肤角质层可见纳米 TiO₂ 颗粒, 但仅限角质层, 表皮基底层及真皮均未见纳米 TiO₂ 颗粒 (图 3.2)。



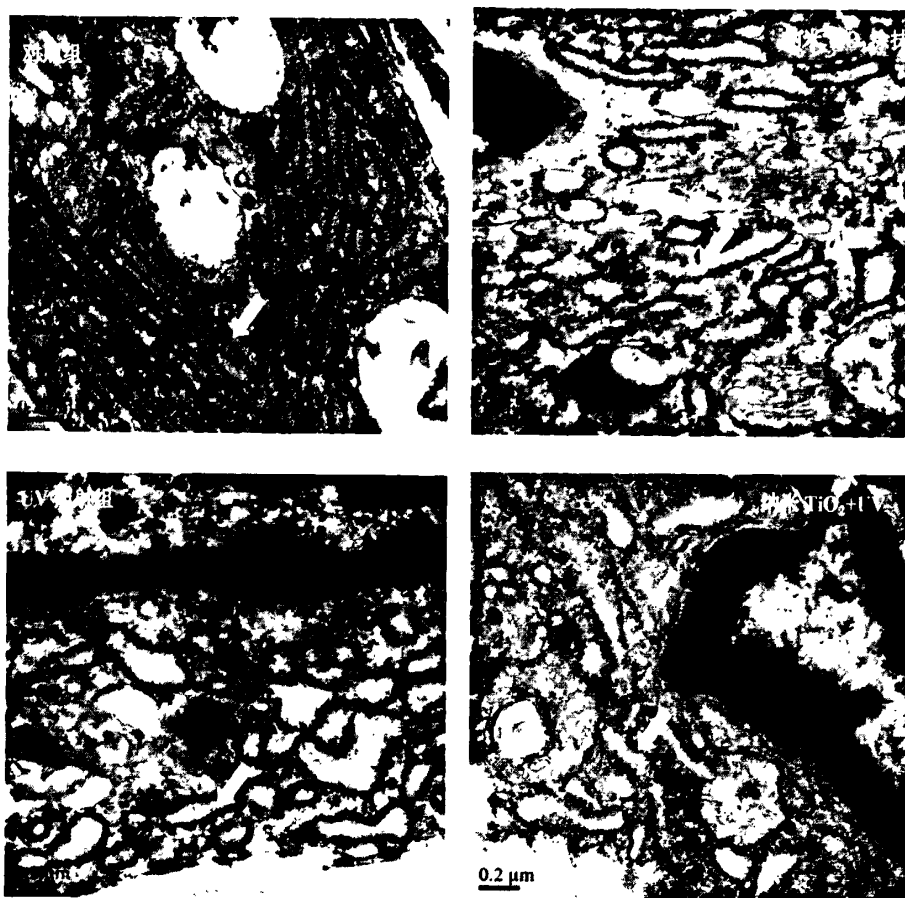


注：黑色箭头表示进入角质层的 TiO_2 颗粒

图 3.2 不同处理组大鼠皮肤病理切片 ($\times 200$)

2.2.3 电镜观察

电镜下可见四个不同处理组大鼠皮肤真皮细胞形态无明显变化，真皮层纤维排列整齐，线粒体结构正常。实验组与对照组相比，粗面内质网变宽 (图 3.3)。



注：箭头所指为粗面内质网。

图 3.3 不同处理组大鼠皮肤电镜照片

2.3 不同处理对大鼠皮肤胶原含量的影响

与对照组比较,三个实验组皮肤中胶原含量均上升,其中雄性大鼠三个实验组与对照组的差别有统计学意义 ($p<0.05$),雌性大鼠三个实验组与对照间的差别无统计学意义。三个实验组间相比,差别无统计学意义(表 3.1)。

表 3.1 各组大鼠皮肤胶原含量($\mu\text{g}/\text{mgprot}$) ($\bar{x} \pm S$, $n=5$)

组别	胶原含量 ($\mu\text{g}/\text{mgprot}$)	
	雄性	雌性
对照组	49.05 \pm 10.09	39.28 \pm 6.49
纳米 TiO ₂ 组	71.76 \pm 13.16*	45.21 \pm 5.95
UV 组	67.03 \pm 1.49*	48.22 \pm 5.34
纳米 TiO ₂ +UV	65.25 \pm 6.56*	46.16 \pm 1.49

注: *: 各实验组与对照相比, $p<0.05$.

2.4 不同处理对大鼠皮肤细胞分泌细胞因子的影响

雄性大鼠,与对照组相比,纳米 TiO₂+UV 组 TNF- α 、IL-1 含量上升,IL-6 含量降低,但差别无统计学意义;UV 组及纳米 TiO₂ 组 TNF- α 、IL-6 含量降低,IL-1 含量上升,其中 UV 组 IL-6 含量与对照的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。三个不同处理组相比,IL-6 含量的差别有统计学意义 ($p<0.05$),UV 组 IL-6 含量低于纳米 TiO₂+UV 组及纳米 TiO₂ 组。

雌性大鼠,与对照组相比,三个处理组 TNF- α 含量上升、IL-6 含量降低,IL-6 含量与对照的差别有统计学意义 ($p<0.05$)。三个不同处理组相比,纳米 TiO₂+UV 组 IL-1 含量高于 UV 组 ($p<0.05$)。纳米 TiO₂ 组 IL-6 含量低于 UV 组 ($p<0.05$) (表 3.2)。

表 3.2 各组大鼠皮肤细胞因子含量 ($\bar{x} \pm S$, $n=5$)

组别	TNF- α (ng/mL)		IL-1(ng/mL)		IL-6(ng/mL)	
	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
对照组	0.69 \pm 0.36	0.65 \pm 0.21	0.46 \pm 0.14	0.49 \pm 0.11	142.27 \pm 26.75	122.01 \pm 18.50
纳米 TiO ₂ 组	0.47 \pm 0.34	0.96 \pm 0.06	0.49 \pm 0.14	0.58 \pm 0.10	137.08 \pm 22.11 [#]	57.96 \pm 0.79 [#]
UV 组	0.56 \pm 0.26	0.71 \pm 0.42	0.52 \pm 0.04	0.42 \pm 0.03 [#]	73.29 \pm 23.14 [#]	89.76 \pm 28.15 [#]
纳米 TiO ₂ +UV	0.74 \pm 0.40	0.71 \pm 0.16	0.52 \pm 0.04	0.54 \pm 0.05 [#]	114.81 \pm 24.97 [#]	73.74 \pm 18.98 [*]

注: *: 各实验组与对照相比, $p<0.05$; #: 各实验组间相比, $p<0.05$.

3.讨论

因纳米 TiO₂ 广泛应用于各类防晒产品,其是否可经皮渗透进人体引起了人们的普遍关注。关于纳米级 TiO₂ 粒子的皮肤渗透可能性已经进行了若干研究,但结果不一。Tan 等^[59]将含有 8%超细微 TiO₂ (10-50nm) 防晒产品在 16 名志愿者的皮肤上应用了 2 至 6 周以研究

其是否渗入皮肤。结果表明,皮肤中纳米 TiO_2 粒子明显升高,首次提供了关于纳米级 TiO_2 皮肤渗透的证据。Schulz^[60]等和 Pfticker 等^[61]应用光电子显微镜后,认为纳米 TiO_2 (20-200 nm) 仅沉积在角质层的最外边,角质层的深面和真皮层并没有检测到它的存在,纳米粒子不能渗入志愿者的皮肤。Lademann 等^[62]报道在毛囊角质层和毛乳头处现了防晒霜中的超细 TiO_2 颗粒的沉积,但是这并不能认为颗粒能穿透活皮肤组织。Bennat 等^[63]将水状和油状的纳米 TiO_2 用于评价其皮肤渗透性,结果表明油状的纳米 TiO_2 较水状的纳米 TiO_2 的皮肤渗透现象明显。Menzel^[64]等用与人体皮肤最为相似的猪皮做纳米粒子渗透性实验,实验结果证实了粒径为 45-150nm 长、17-35nm 宽的纳米 TiO_2 可以通过角质层进入到表皮下的颗粒层,尤其是在表皮生发层,并推测随着观察时间推后,纳米 TiO_2 粒子很有可能随着细胞的活动,进入到真皮层,引起更大的损伤。

以上研究仅限于观察纳米 TiO_2 的经皮渗透性,但关于光催化后纳米 TiO_2 对皮肤的毒性研究尚属空白。因此,基于以上的研究背景,本试验通过皮肤涂抹纳米 TiO_2 , 探讨纳米 TiO_2 经皮暴露并给与紫外照射下对皮肤的损伤。

本研究染毒过程中,观察到雄性大鼠体重变化的情况仅在染毒第一周时差别有统计学意义,纳米 TiO_2 +UV 组、UV 组的体重增长率低于对照组;对雌性大鼠体重的影响在第二周时,纳米 TiO_2 +UV 组体重增长率低于 UV 组,第三周时纳米 TiO_2 涂抹组体重增长率低于 UV 组。

光老化皮肤表现为表皮层明显增厚,棘细胞排列紊乱,真皮中胶原含量下降,胶原纤维排列紊乱、断裂,有异常弹力纤维的增生,苏木素-伊红(HE)染色显示真皮浅层有无定形嗜碱性团块样物质的沉积带,即特征性的光老化性弹力纤维变性。本研究结果显示,四种不同处理组大鼠皮肤表皮层与真皮层厚度无明显改变,真皮层胶原纤维排列整齐,皮肤各层无炎性浸润。纳米 TiO_2 涂抹组皮肤角质层可见纳米 TiO_2 颗粒,但表皮基底层及真皮均未见纳米 TiO_2 颗粒。电镜下可见四种不同处理组大鼠皮肤真皮细胞形态无明显变化,线粒体结构正常。实验组与对照组相比,粗面内质网变宽。粗面内质网是成纤维细胞合成胶原的重要细胞器,粗面内质网的功能主要合成分泌性的蛋白和多种膜蛋白、合成用于构成细胞器中的可溶性驻留蛋白、新生多肽的折叠与装配、蛋白质的修饰与加工、为多种酶类提供附着位点、有储存运输物质等功能。有报道经 UVA 照射的成纤维细胞表达胶原酶 mRNA 水平增加,粗面内质网扩张说明成纤维细胞分泌功能旺盛^[65-68]。粗面内质网过度扩张可引起粗面内质网脱颗粒和囊泡化,影响成纤维细胞的功能。皮肤中胶原蛋白含量随年龄的增长而逐渐降低,因此测定皮肤中羟脯氨酸的含量,可作为皮肤衰老的指标。动物试验中羟脯氨酸含量的变化也常被用来评价化妆品或药物抗皮肤老化的效果^[69]。本研究结果显示,与对照组相比,不同处理大鼠皮肤胶原含量都有一定上升。

研究表明, IL-1, IL-6 和 TNF- α 可以诱导成纤维细胞产生 MMP-1^[70]。IL-6 既可诱导胶原的合成和抑制胶原的降解, 还可诱发体液免疫方面的变化^[71]。IL-1 能刺激成纤维细胞增殖, 介导血小板源生长因子的活性及促进成纤维细胞分泌胶原和胶原酶, 它既可致肺泡炎症期的损伤, 又可促进间质损伤、修复乃至过度修复引起间质纤维化^[72]。本研究结果显示, 与对照组相比, 纳米 TiO₂+UV 组及纳米 TiO₂ 组 IL-1 含量上升, IL-6 含量降低, 动物实验结果与体外细胞实验一致, 结合皮肤胶原含量的测定结果, 提示上升的 IL-1 可以促进成纤维细胞分泌胶原, 导致胶原含量升高。IL-6 含量降低, 不能有效诱发体液免疫, 调节创伤后机体免疫紊乱状态细胞。不同染毒处理各组间相比, 雄性大鼠 UV 组 IL-6 含量低于纳米 TiO₂+UV 组及纳米 TiO₂ 组, 雌雄大鼠纳米 TiO₂ 组 IL-6 含量低于 UV 组 ($p<0.05$), TNF- α 含量雄性大鼠仅纳米 TiO₂+UV 组上升, 雌性大鼠各实验组均上升, 说明不同性别的大鼠对纳米 TiO₂ 及 UV 的敏感性不同, 雌性大鼠对纳米 TiO₂ 更敏感。

综上所述, 纳米TiO₂光催化产物的皮肤毒性在SD大鼠实验中也得到了初步证实, 同时, 实验中UVA光源的照射情况与日光中UVA照射情况的差别、照射周期较短、受试动物的敏感性等因素使本研究结果具有一定的局限性, 相关研究还有待于进一步深入。

第二节 纳米二氧化钛光催化产物对大鼠皮肤的氧化损伤作用

本文第一章证实纳米 TiO₂ 光催化后会产生羟自由基, 羟自由基攻击的主要靶点是多不饱和脂肪酸, 引起脂质过氧化损。皮肤结构中含有大量的多不饱和脂肪酸, 占皮肤脂质总量的 25%以上, 很容易成为羟自由基攻击的目标。脂质过氧化反应存在于人和动物的正常皮肤中, 脂质过氧化反应在皮肤中生成多种终产物, MDA 是最常见的一种, 可作为反映脂质过氧化程度的指标。脂质过氧化反应可造成皮肤细胞(角质形成细胞, 成纤维细胞)细胞膜损害并引起细胞代谢和功能异常^[73]。

细胞实验结果提示光催化纳米 TiO₂ 后可导致细胞氧化损伤, 本节将通过对脂质过氧化损伤指标 MDA 的测定, 以及对脂质过氧化损伤有修复作用的 SOD、GSH-Px 含量的测定, 来观察纳米 TiO₂ 经皮暴露后皮肤脂质过氧化的改变, 为进一步探讨纳米 TiO₂ 的毒性效应提供一定的依据。

1. 材料与方法

1.1 试剂与仪器 同本章第一节1.1。

SOD、MDA、GSH-Px试剂盒购自南京建成生物研究所。

1.2 实验方法

1.2.1 纳米 TiO₂ 混悬液制备 同本章第一节 1.2.1。

1.2.2 实验动物分组 同本章第一节 1.2.2。

1.2.3 光源和照射方式 同本章第一节 1.2.3。

1.2.4 TiO₂ 涂抹 同本章第一节 1.2.4。

1.2.5 氧化损伤的测定

处死大鼠后,用锋利剪刀分离背部皮肤,去除皮下脂肪,称重,将皮肤剪成肉糜状,用 PBS 配制成 10%的组织匀浆,在冰浴下超声破碎后 4℃下 3000r/min 离心 15 min,取上清液测定。

1.3 统计分析

将实验数据录入 Excel 2003,采用 SPSS 11.5 统计软件进行 ANOVA、Dunnetts't 检验及两样本比较 t 检验。

2. 结果

不同处理对大鼠皮肤氧化损伤的影响见表 3.3。雄性大鼠,与对照组相比,纳米 TiO₂+UV 组 MDA、SOD 含量上升,GSH-Px 含量下降,但差别均无统计学意义。三个不同处理组间差别亦无统计学意义。雌性大鼠,与对照组相比,纳米 TiO₂+UV 组 MDA、SOD 含量升高,GSH-Px 含量下降,但差别无统计学意义。三个不同处理组比较,纳米 TiO₂+UV 组 MDA 含量较 UV 组及纳米 TiO₂ 组含量上升 ($p<0.05$)。

表 3.3 各组大鼠皮肤氧化损伤 ($\bar{x} \pm S$, n=5)

组别	MDA(mmol/mL)		SOD(U/mgprot)		GSH-Px (活力单位)	
	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
对照组	3.09±0.54	3.54±1.39	291.59±46.95	319.96±6.17	2163.81±575.62	2516.20±929.85
纳米 TiO ₂ 组	2.92±1.65	3.29±0.85 [#]	351.22±74.21	317.11±24.73	2588.89±333.17	2550.69±619.11
UV 组	2.96±0.78	3.53±1.14 [#]	373.62±25.72	352.50±37.68	2151.76±462.79	2248.02±321.89
纳米 TiO ₂ +UV	4.97±2.30	6.29±1.92 [#]	339.50±31.66	348.68±29.39	2080.09±292.26	1964.55±419.51

注:[#]:各实验组间相比, $p<0.05$ 。

3. 讨论

氧化损伤结果显示,雄性大鼠纳米 TiO₂+UV 组 MDA、SOD 含量较对照组上升,GSH-Px 含量较对照组下降。雌性大鼠纳米 TiO₂+UV 组 MDA、SOD 含量比对照组升高,GSH-Px 含量下降。三个不同处理组比较,纳米 TiO₂+UV 组 MDA 含量较 UV 组及纳米 TiO₂ 组含量上升 ($p<0.05$)。结果提示,纳米 TiO₂ 染毒可引起皮肤细胞脂质过氧化反应,MDA 含量升高。谷

胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)可以清除由活性氧和 $\cdot\text{OH}$ 诱发的脂质过氧化物, 保护细胞膜结构和功能的完整性, 本次试验纳米 TiO_2 组动物皮肤匀浆 GSH-Px 含量上升, 纳米 TiO_2 +UV 组 GSH-Px 含量下降, 从而导致纳米 TiO_2 +UV 组 MDA 不能被有效的清除, 进一步导致更加严重的损伤。而 SOD 含量升高, SOD 能消除生物体在新陈代谢过程中产生的有害物质, 是生物体内清除自由基的首要物质。它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞, 复原因自由基造成的细胞伤害。说明机体在受到外界刺激后引起机体内氧化-抗氧化系统的活化, 对抗外界因素对生物体的损伤。本次试验仅雌性大鼠纳米 TiO_2 +UV 组出现脂质过氧化损伤的发生, 随着染毒及照射时间的延长, 有可能对受试大鼠皮肤造成更加严重的损伤。

随着对 UVA 危害的逐步认识, 作为紫外线防护重要措施之一的防晒化妆品已广泛进入市场, 纳米 TiO_2 以其优异的屏蔽紫外性能被广泛的应用于化妆品中。以往关于纳米 TiO_2 皮肤毒性的研究多停留在其穿透方面, 仍缺乏系统的实验室研究资料。本研究通过动物整体实验, 探讨纳米 TiO_2 光催化产物可能引发的皮肤慢性损伤。结果显示紫外照射与纳米 TiO_2 联合作用能引起雌性大鼠皮肤脂质过氧化损伤。由此提示, 应该关注含纳米 TiO_2 防晒化妆品使用中潜在的安全性问题。长时间低剂量的纳米 TiO_2 经皮暴露是否会引起更严重的损伤, 有待于进一步研究。

总 结

CONCLUSIONS

本研究围绕纳米 TiO₂ 光催化产物的细胞毒性和皮肤毒性进行研究,探讨了化妆品级纳米 TiO₂ 的皮肤毒作用特点,获得以下初步结论:

1. UVA 照射引起纳米 TiO₂ 光催化产物的产生,光催化产物产生的量随着紫外照射剂量的增加而增加;锐钛矿型、小粒径纳米 TiO₂ 产生光催化产物的能力较强,光催化产物是纳米 TiO₂ 光催化活性效应产生的物质基础。

2. 以 Balb/c3T3 细胞为靶细胞的纳米 TiO₂ 光催化产物的细胞毒性研究表明,光催化产物水平升高及其对细胞的多作用靶点可能是导致细胞毒性的根本原因,氧化损伤是导致细胞凋亡、影响细胞间隙通讯功能以及降低成纤维细胞胶原分泌量、影响相关细胞因子释放等效应的重要因素。细胞毒性与受试纳米 TiO₂ 的晶型、剂量、粒径及有无紫外照射有关,锐钛矿型、小粒径纳米 TiO₂ 表现出较强的细胞毒性。

3. 纳米 TiO₂ 光催化产物对 SD 大鼠的皮肤毒性作用研究显示,光镜下皮肤结构无明显变化,纳米 TiO₂ 浸入仅限于角质层;电镜下细胞呈现粗面内质网扩张,细胞分泌功能旺盛。紫外照射后皮肤 MDA 含量增加,对 TNF- α 、IL-1、IL-6 等细胞因子释放有一定的影响,提示氧化性损伤以及炎症反应是纳米 TiO₂ 光催化产物皮肤毒性的早期事件。

综上所述,化妆品级纳米 TiO₂ 具有一定的光催化活性,导致的细胞毒性与光催化活性产物羟自由基水平升高密切相关,由此提示,应该关注含纳米 TiO₂ 防晒化妆品使用中潜在的安全性问题。虽然本研究结果中动物实验皮肤形态没有表现出明显的变化,但功能方面出现氧化损伤及炎症反应,结果提示在还没有完善的纳米材料安全性评价体系的现况下,有必要关注纳米 TiO₂ 长期低剂量暴露的生物学效应问题,在评价纳米材料安全性指标的特异性和研究方法的科学性等方面都有待于深入系统地开展研究,为纳米产品的安全使用提供有效保障。

参 考 文 献

REFERENCE

- [1] 赵宇亮, 赵峰, 叶昶. 纳米尺度物质的生物环境效应与纳米安全性[J]. 中国基础科学, 2005, 7(2): 19-23.
- [2] 汪冰, 丰伟悦, 赵宇亮, 等. 纳米材料生物效应及其毒理学研究进展[J]. 中国科学 B 辑, 化学, 2005, 35(1): 1-10.
- [3] 李卫华, 市原学, 李洁斐, 等. 纳米材料的毒理学和安全性[J]. 环境与职业医学, 2006, 23(5): 430-434.
- [4] 刘庆辉, 詹宏昌, 易光旺. 对纳米医学材料安全性问题的思考[J]. 中国安全科学学报, 2008, 18(3): 114-118.
- [5] 应杏秋. 超微颗粒毒性研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 32(1): 6-10.
- [6] 赵家龙, 周方策, 靳春明, 等. 表面化学修饰对TiO₂半导体超微粒子光学性质的影响[J]. 化学物理学报, 1993, 16(2): 129-133.
- [7] 黄云, 龚天铎. 化妆品用纳米二氧化钛的研究进展[J]. 浙江化工, 2002, 33: 13-15.
- [8] 涂建鹏. 纳米混晶 TiO₂ 的合成及光催化降解亚甲蓝特性与影响因素[D]. 华中农业大学硕士学位论文, 2007.
- [9] 方艳芬, 黄应平, 陈和春, 等. 二氧化钛光催化体系中的羟基自由基的测定[J]. 分析化学, 2006, 34(9): S83-S86.
- [10] HUANG Y P, MA W H, LI J, et al. Efficient H₂O₂ Oxidation of Organic Pollutants catalyzed by Supported Iron Sulfophenylporphyrin under Visible Light Irradiation [J]. Phys.Chem.B, 2004, 108, 7263-7270.
- [11] Tchler M J, Domann F E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2007, 43(7): 1023-1036.
- [12] Castranova V, Porter D, Millecchia L, et al. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002, 234-235(1): 177-184.
- [13] Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and bcl 2 protection in very low oxygen [J]. Nature, 1995, 374(6525): 814.
- [14] Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, et al. UV-induced oxidative stress and photo aging[J]. Curr Probl Dermatol, 2001, 29: 83-94.
- [15] Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, et al. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinases pathways in human skin in vivo [J]. J Clin Invest, 1998, 101: 1432-1440.
- [16] 郑品棋, 熊予莹, 黄志安, 等. 化学沉淀法和溶胶-凝胶法制备纳米二氧化钛及其抑菌性的研究[J].

- 2006, 3: 65-69.
- [17] Xiaoqiang Zhang, Lihong Yin, Yuepu Pu, et al. Optimized Method for Preparation of TiO₂ Nanoparticles Dispersion for Biological Study[J]. *Nanosci. Nanotechnol*, 2010, 10, 5213-5219.
- [18] 陈梅兰. 二氧化钛光催化降解次甲基蓝的研究简报[J]. *浙江化工*, 2000, 31(2):31-33.
- [19] THEVENOT P, CHO J, WAVHAL D, et al. Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO₂ nanoparticles [J]. *Nanomedicine: NBM*, 2008, 4, 226-236.
- [20] REHN B, SEILER F, REHN S, et al. Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: untreated and surface treated [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 189(7): 84-95.
- [21] 唐玉朝, 李薇, 胡春, 等. TiO₂ 型态结构与光催化活性关系的研究[J]. *化学进展*, 2003, 15(5): 379-384.
- [22] 刘松翠, 吕康乐, 邓克俭, 等. 三种不同晶型二氧化钛的制备及光催化性能研究[J]. *影像科学与光化学*, 2008, 26(2): 138-147.
- [23] 体外3T3中性红摄取光毒性试验方法[S]. 中华人民共和国国家标准, GB/T 21769-2008.
- [24] 赵嘉惠, 张华屏, 王春芳. MTT 法在检测细胞增殖方面的探讨[J]. *山西医科大学学报*, 2007, 38(3): 262-263.
- [25] ZHU R R, WANG S L, CHAO J, et al. Bio-effects of nano-TiO₂ on DNA and cellular ultrastructure with different polymorph and size [J]. *Mater. Sci*, 2009, 29(3): 691-696.
- [26] Cai R, Kubota Y, Shuin T, et al. Induction of Cytotoxicity by Photoexcited TiO₂ Particles[J]. *Cancer Res*, 1992, 52: 2346-2348.
- [27] 魏刚, 黄海燕, 熊蓉春. 纳米二氧化钛的光催化性能及其在有机污染物降解中的应用[J]. *现代化工*, 2003, 23(1): 20-23.
- [28] 邱红燕, 袁聚祥. 氧化损伤与矽肺[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2008, 11(7): 1062-1064.
- [29] Park E J, Park K. Oxidative stress and pro-inflammatory responses induced by silica nanoparticles in vivo and in vitro [J]. *Toxicology Letters*, 2009, 184(1): 18-25.
- [30] Morita A, Krutmann J. Ultraviolet A radiation - induced apoptosis In:Packer L,Sies H,eds.Methodsin Enzymology: Singlet oxygen, UVA, and Ozone. New York: Academic Press, 2000, 302-309.
- [31] Long TC, Saleh N, Tilton RD, et al. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia(BV2): Implications for nanoparticles neurotoxicity[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40: 4346-4352.
- [32] 姜又红, 董静, 陈莹, 等. 纳米SiO₂对大鼠肺脏白介素-4表达的影响[J]. *中国公共卫生*, 2004, 20(5): 524-525.

- [33] 范轶欧, 张颖花, 刘冰, 等. TiO_2 、 SiO_2 、Fe 纳米及微米粉体对红细胞毒性作用的比较[J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18(2): 67-69.
- [34] Slowing I I, Wu C W, Vivero-Escoto J L, et al. Mesoporous silica nanoparticles for reducing hemolytic activity towards mammalian red blood cells [J]. *Small*, 2009, 5(1): 57-62.
- [35] 车望军. 汽车尾气致氧化应激作用的实验研究[D]. 四川大学, 2007: 3-61.
- [36] Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and bcl 2 protection in very low oxygen J. *Nature*, 1995, 374(6525): 814.
- [37] Deng HX, Hentai A, Tainer JA. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu, Zn superoxide dismutase J. *Science*, 1993, 261(5124): 1947.
- [38] Richter C. Prooxidants and mitochondrial Ca: their relationship to apoptosis and oncogenesis J. *FEBS Lett*, 1993, 325 (1-2): 104.
- [39] Singh S, Shi T, Duffin R, et al. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO_2 [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2007, 222(2): 141-151.
- [40] Rahman Q, Lohani M, Dopp E, et al. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis [J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(8): 797-800.
- [41] Bruzzone R, While TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling [J]. *Eur J Biochem*, 1996, 238: 1-27.
- [42] Yamadaki H, Krutovskih V, Mesnil M, et al. Role of connexin (gap junction) genes in cell growth control and carcinogenesis [J]. *C-R-Acad-Sci-III*, 1999, 322: 151-159.
- [43] Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action [J]. *Carcinogenesis*, 1991, 12(112): 2109-2114.
- [44] Chaumontet C, Bex V, Gaillard Sanchez I, et al. Apigenin and tangeretin enhance gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells [J]. *Carcinogenesis*, 1994, 15 (10): 2325-2330.
- [45] 王曦. 成纤维细胞与皮肤老化[J]. 中国美容医学, 2005, 14(2): 243-245.
- [46] 李华, 叶婷杰, 李伯勤, 等. 虫草多糖对 8-MOP/UVA 诱导光老化皮肤成纤维细胞胶原的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 22(4): 75-78.
- [47] 刘仲荣, 刘荣卿, 张国威等. 基质金属蛋白酶表达在皮肤光老化皱纹形成中的作用[J]. 中国皮肤科杂志, 2003, 36(6): 332-334.
- [48] 李柏建, 牛兆山, 王国英. 光老化皮肤中基质金属蛋白酶增高的信号转导机制及防治策略[J]. 中华医学美学美容杂志, 2004, 10(3): 781-782.

- [49] Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature*, 1996, 379: 335-339.
- [50] Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, et al. UV-induced oxidative stress and photo aging. *Curr Probl Dermatol*. 2001, 29: 83-94.
- [51] 王小勇, 毕志刚. IL-1 对 UVA 辐射成纤维细胞基质金属蛋白酶表达的影响机制探讨[J]. *中国皮肤性病学杂志*, 2005, 19(9): 315.
- [52] Chen L, Zhou J, Gao W, et al. Action of NO and TNF- α release of rats with cadmium loading in mediating malfunction of multiple system organs[J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2003, 55(5): 535-540.
- [53] 朱善良, 陈龙, 高伟等. CCl₄ 致小鼠肝损伤中几种免疫介质含量变化的研究[J]. *实验生物学报*, 2004, 37(1): 50-54.
- [54] Pozzi R, Berardis BD, Paoletti L, et al. Inflammatory mediators induced by coarse (PM_{2.5-10}) and fine (PM_{2.5}) urban air particles in RAW 264.7 cells. *Toxicology*, 2003, (183): 243-254
- [55] 贾玉巧, 赵晓红, 郭新彪. 大气 PM₁₀ 对两种不同细胞分泌炎性细胞因子的影响. *卫生研究*, 2006, 35(5): 557-560.
- [56] 张文丽, 崔九思, 戚其平等. 细颗粒物污染及对炎性因子 IL-6 表达的影响. *卫生研究*, 2003, 32(6): 548-552.
- [57] 黄雪莲, 金昱, 郭新彪等. 沙尘暴 PM_{2.5}、PM₁₀ 对大鼠肺泡巨噬细胞炎性因子分泌的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2004, 21(1): 38-40.
- [58] 周友亚. 二氧化钛在化妆品和环境保护中的应用[J]. *中国公共卫生*, 2002, 18(8): 1021-1023.
- [59] Tan MH, Commem CA, Burner L, et al. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens[J]. *Aus J Dermatol*, 1996, 37(4): 185-187.
- [60] Schulz J, Hohenberg H, Hlacker F, et al. Distribution of sunscreen on skin[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54 (1): 157-163.
- [61] Pflucker F, Wendel V, Hohenberg H, et al. The human stratum corneum layer—An effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide[J]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001, 14 (1): 92-97.
- [62] Lademarm J, Weigman H, Rickmeyer C, et al. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice[J]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 1999, 12(5): 247-256.
- [63] Bennat C, Miiller-Goyman n CC. Skin penetration and stabilization of formulations containing microfine titanium dioxide as physical UV filter[J]. *Int J Cosmetic Sei*, 2000, 22(4): 271-283.

- [64] Menzel F. Nucl Instrum Methods Phvs Res B, 2004, 219-220: 82-86.
- [65] 韦敏, 穆雄铮, 张涤生, 等. 下颌骨牵拉成骨的实验研究[J]. 实用美容整形外科杂志2000,11(1): 10-13.
- [66] Ohnishi Y, Tajima M, Akiyama A, et al. Expression of elastin-related proteins and matrix metalloproteinases in actinic elastosis of sun-damaged skin[J]. Arch Dermatol, 2000, 292:27 - 31.
- [67] Gary J, Zengquan W, Subhash C, et al. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light[J]. New England Med, 1997, 337: 1419-1428.
- [68] Marta P, Tiffani H, Haili L. Regulation and inhibition of collagenase expression by long-wavelength ultraviolet radiation in cultured human skin fibroblasts[J]. Photochem and Photobiol, 1995, 62: 444-448.
- [69] 杜向阳, 倪建华, 沈福杰, 等. 长波紫外线对大鼠皮肤脂质过氧化和胶原的影响及防晒剂的防护[J]. 上海预防医学杂志, 2003, 15(9): 438-439, 460.
- [70] 倪建华, 周华, 戴修道. 紫外线对人角朊细胞的氧化损伤及防护研究[J]. 环境与健康, 2001, 18(4):212-214.
- [71] Arcangeli G, Cupelli V, Giuliano G. Effects of silica on human lung fibroblast in culture [J]. Science of the Total Environment, 2001, 270(1-3): 135-139.
- [72] Kolb M, Margetts P J, Anthony D C, et al. Transient expression of IL-1 β induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(12): 1529-1536.
- [73] 杨斌, 刁庆春, 钟白玉, 等. 番茄红素对长波紫外线照射大鼠皮肤中丙二醛形成和基质金属蛋白酶表达的抑制作用[J]. 2006, 12(6): 358-361.

纳米 TiO₂ 光催化活性及其毒性研究

紫外线是太阳光中对人体危害较大的一种光波。过度照射紫外线,会使皮肤产生红斑、黑斑,使皮肤老化,严重的会引发皮肤癌^[1-2]。近年来,随着人们对紫外线认识的提高及保健意识的增强,防晒型化妆品的开发、应用逐渐成为一个科研热点。二氧化钛由于具有高折光性和高光活性,一直被作为一种主要的防晒剂。纳米二氧化钛因有着更为优越的性能而被广泛重视,被用于新型、优质防晒化妆品的研究和开发,逐步显示其特殊的优越性和广阔的应用前景。

一、纳米TiO₂在化妆品中的应用

(一) 用量的选择

纳米TiO₂粒径小于100nm时,具有很强的散射和吸收紫外光的能力。当纳米TiO₂在化妆品中的含量为10%时,防晒系数可达30;当含量为5%时,防晒系数可达15,因此最理想的用量为5%-20%^[3]。

(二) 晶型的选择

常用二氧化钛属正方晶体,其晶型有金红石型及锐钛矿型两种,前者可通过后者煅烧制得,因而晶格结构更完善,在热力学上更为稳定。从折光率来看,金红石型为2.7,锐钛矿型为2.3,因此,金红石型对紫外线的发射、散射能力较强,而吸收力较弱。因此,从保持稳定、增强屏蔽作用、减少二氧化钛光活性、降低其光危害性的角度出发,在化妆品中应尽量采用金红石型二氧化钛^[4-5]。

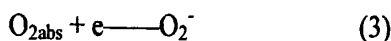
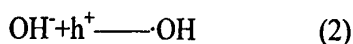
(三) 粒径的选择

TiO₂有一最佳粒径,并非原始粒径越小越好。考虑到纳米TiO₂粒子存在不可避免的团聚现象,一般认为屏蔽紫外线的最佳粒径为10nm-60nm^[6]。

二、纳米TiO₂光催化活性

二氧化钛有金红石型、锐钛矿型以及板钛矿三种晶型,具有较高光催化活性的为纳米锐钛矿型二氧化钛,这主要由其特殊的能带 $E_g = 3.2\text{eV}$ 所决定。该二氧化钛的能带是不连续的,价带和导带之间存在一个禁带。在光照条件下,当光子能量达到或超过其带隙能时,其价带电子被激发跃迁进入到导带,在导带上产生带负电的高活性电子,在价带上留下带正电荷的空穴。在适合条件下,电子与空穴分离并迁移到粒子表面不同位置,还原和氧化吸附在粒子表面的物质。二氧化钛在能带跃迁的过程中,产生的电子及空穴与水作用可以生成羟基自由基($\cdot\text{OH}$)^[7]。

纳米 TiO₂ 光催化反应机理如下^[8]:



在整个光催化反应中，·HO起着决定性的作用。羟基自由基是一种活性非常强的物质，对光催化反应起着决定性的作用，可破坏有机物中的C—C、C—O、C—H、C—N等化学键，从而使有机物彻底氧化。

三、纳米TiO₂的毒性研究

目前纳米毒性关注的焦点多集中在碳纳米管等早先发现的纳米材料上，却对纳米TiO₂这一取得方便、制备容易、应用广泛、产量最大的纳米材料关注不足^[9]。

本文将从细胞水平及在体水平综述纳米二氧化钛及其光催化产物的毒性研究进展。

(一) 纳米TiO₂的毒效应研究

纳米TiO₂的超微性，使得它可以轻松地通过细胞膜进入细胞内，甚至通过细胞核核膜，进入细胞核内。纳米TiO₂的高化学活性，又使其可以与细胞内众多细胞器以及一些生物大分子发生作用。研究表明，纳米TiO₂能够影响细胞微结构、破坏细胞膜。

1. 纳米TiO₂引起细胞膜的破裂

细胞膜是纳米TiO₂对细胞攻击的第一个目标。纳米TiO₂对细胞的损伤首先体现在它对细胞膜的破坏，使细胞坏死。Sakai等^[10]发现，纳米TiO₂处理的细胞，可以检测出大量的钙离子，说明细胞膜的破裂，钙离子的渗出；Long等^[11]采用透射电子显微镜观察发现纳米TiO₂能够穿过神经小胶质细胞（BV2）的细胞膜进入细胞内部，聚集在线粒体中。

2. 纳米TiO₂影响细胞遗传信息的表达

纳米TiO₂的超微性使其可以进入细胞质，高化学活性又使其具备氧化损伤细胞遗传物质的能力。Wamer等^[12]的实验证明，纳米TiO₂损伤人体纤维原细胞的核酸，将纳米TiO₂作用后的细胞分离出RNA和DNA，在RNA中可以检测到8-羟基鸟苷的生成。由于RNA负责遗传信息从DNA到蛋白质的传递，纳米TiO₂对RNA的损伤间接影响了细胞遗传信息的表达。

3. 纳米TiO₂抑制细胞生长

部分学者认为，纳米TiO₂在一定的粒径范围内可以抑制细胞的生长和增殖。Amezaga-Madrid等^[13]采用假单胞菌作为培养对象，在纳米TiO₂的存在下，UV照射40min，通过TEM以及XRD观测，发现纳米TiO₂对细胞生长的抑制率达到60%-72%。武汉理工大学的熊先立等^[14]用47nm粒径的纳米TiO₂培养细胞系Bel-7402人肝癌细胞，发现细胞系G期细胞数明显增加，S期数量减少。即纳米TiO₂通过阻止细胞从G期进入S期，通过影响细胞周期抑制细胞生长。

4. 纳米TiO₂引起细胞凋亡及死亡

在细胞凋亡中,形态上的改变往往伴随有染色质聚集,核固缩、破裂:细胞膜失去其特有的结构,变得光滑,细胞缩小、变形,细胞破碎,碎片中有DNA和细胞器,这种碎片称作凋亡小体。凋亡的细胞DNA表现出一种特殊的,形如“楼梯”的电泳条带。Lovern等^[15]的研究发现,当大型(*Daphnia magna*)处于一定浓度的纳米TiO₂水溶液中时,随着浓度的增加大型(*Daphnia magna*)的死亡增加。陈惜燕等^[16]研究发现,纳米TiO₂对胶孢炭疽菌具有较强的抑菌作用。朱融融等^[38]研究发现锐钛矿型纳米TiO₂能够诱导卵巢肿瘤细胞(CHO)生成凋亡小体,但是对正常的人肾上皮细胞(293T)并没有表现出相应的毒性作用。

(二) 纳米TiO₂光催化产物的毒性效应

·HO是一种非选择性的具有高氧化活性的自由基,它能够很容易地氧化各种有机物和无机物,氧化效率高,反应速度快^[17-18]。极易与生物大分子如脂类、蛋白质、酶类以及核酸大分子反应,直接损害或通过一系列氧化链式反应而对生物细胞结构引起广泛的损伤性破坏。

1. 对细胞膜的损伤

·HO攻击的靶点是多不饱和脂肪酸,引起脂质过氧化反应。细胞90%以上为膜性结构,细胞膜上含有的多不饱和脂肪酸是最易受到自由基攻击的生物分子。在生命过程中,自由基通常维持在一个正常的生理水平,这种状态与人体健康密切相关,一旦氧化抗氧化系统的动态平衡发生紊乱或破坏,就会导致体内自由基浓度过高,造成生命反应异常,加速细胞衰老而诱发疾病^[19-20]。机体内自由基代谢失衡,可导致一系列的连锁反应,引起不同程度的细胞毒性,并导致瞬时的或不可逆的损伤。

2. 对DNA的损伤

·HO可以与DNA发生反应,产生8-羟基鸟苷,导致DNA的解旋断链和氧化损伤。

2.1 氧化损伤

氧化性DNA损伤在生物体细胞老化、死亡的发生过程中起重要作用。8-羟基脱氧鸟苷是DNA氧化损伤的标志物,是鸟嘌呤上的C-8位受到攻击的产物,自由基被认为是导致其产生的主要因素^[21]。腺嘌呤和鸟嘌呤很容易受到羟基自由基进攻,产生A8OH·与G8OH·。它们会发生开环反应,一旦开环,DNA便不易修复^[22]。Warner等^[12]用320-400 nm的紫外线照射在纳米TiO₂溶液中的小牛胸腺DNA,用HPLC分析反应后的小牛胸腺DNA发现有8-羟基脱氧鸟苷的生成,从而验证了纳米TiO₂对DNA的氧化损伤作用。

2.2 解旋与断链

Dunford等用含有纳米TiO₂的防晒化妆品作用于核酸PBIIDNA,介于300-400nm的紫外线照射。通过DNA凝胶电泳分析,发现了DNA的解旋与断裂。Ashikaga等^[23]采用超螺旋pBR322 DNA作为作用对象,将其与一定浓度的纳米TiO₂混合,采用波长在365nm左右的黑灯提供紫

外光照35.5min, 通过柯达显像密度计分析, 得到了有25%左右的DNA产生解旋的试验结果。在同样的实验条件下, 如果提高光照的强度与光照时间, DNA的解旋率必然会增加。

3. 对皮肤成纤维细胞功能的影响

相关研究表明, 自由基通过氧化应激可导致细胞凋亡^[24], 并能激活丝裂原活化蛋白激酶信号传导通路, 促进 MMP 的表达, 能抑制成纤维细胞胶原合成, 引起 MDA 增多、细胞膜弹性下降、细胞变僵硬, 导致光老化皮肤特征性的改变^[25-26]。

(三) 纳米TiO₂皮肤毒性研究

国外对纳米TiO₂ (包括其他相似纳米颗粒) 的毒性研究历史也只有短短的20年左右。对其毒性的研究还局限于毒性的表征, 对其毒性机制的分析相对较为薄弱。关于纳米TiO₂皮肤毒性的研究工作大都集中在研究其皮肤渗透性。

众所周知, 皮肤是人类阻挡外源性物质的重要屏障系统, 但是也只能有效地阻止宏观颗粒物经过皮肤进入体内。而二氧化钛制造商所生产出来的产品尺寸仅仅在10nm左右, 日本已经开发了粒径为5nm, 轴径比为4的针状纳米TiO₂。粒径如此之小的纳米粒子, 既是宏观状态时脂/水分配系数小, 也完全有可能通过简单扩散或渗透形式通过皮肤进入体内。

关于纳米级 TiO₂ 粒子的皮肤渗透可能性已经进行了若干研究, 但结果不一。Tan 等^[27]将含有 8%超细微 TiO₂ (10-50nm) 防晒产品在 16 名志愿者的皮肤上应用了 2 至 6 周以研究其是否渗入皮肤。结果表明, 皮肤中纳米 TiO₂ 粒子明显升高, 首次提供了关于纳米级 TiO₂ 皮肤渗透的证据。Schulz^[28]等和 Pflucker 等^[29]应用光电子显微镜后, 认为纳米 TiO₂ (20-200 nm) 仅沉积在角质层的最外边, 角质层的深面和真皮层并没有检测到它的存在, 纳米粒子不能渗入志愿者的皮肤。Lademann 等^[30]报道在毛囊角质层和毛乳头处现了防晒霜中的超细 TiO₂ 颗粒的沉积, 但是这并不能认为颗粒能穿透活皮肤组织。Bennat 等^[31]将水状和油状的纳米 TiO₂ 用于评价其皮肤渗透性, 结果表明油状的纳米 TiO₂ 较水状的纳米 TiO₂ 的皮肤渗透现象明显。Menzel^[32]等用与人体皮肤最为相似的猪皮做纳米粒子渗透性实验, 实验结果证实了粒径为 45-150nm 长、17-35nm 宽的纳米 TiO₂ 可以通过角质层进入到表皮下的颗粒层, 尤其是在表皮生发层, 并推测随着观察时间推后, 纳米 TiO₂ 粒子很有可能随着细胞的活动, 进入到真皮层, 引起更大的损伤。

目前还不能确定TiO₂纳米粒子可经皮渗透而产生毒性影响。因此专家们认为关于皮肤渗透需要加强以下几方面的研究: ①对皮肤细胞的毒性机制; ②长期暴露后, 对皮肤的蓄积毒性; ③是否会代谢成更小的粒子而增加了潜在的毒性; ④光学催化后的纳米粒子毒性研究等^[33]。

四、结语

纳米二氧化钛由于有着较高的折光性和光活性,因而成为一种性能优越的新型防晒剂,在防晒化妆品的应用中具有较好的发展前景。但是,要高效、安全地应用其防晒性,在实际应用时应认真研究其独特的光活性,在晶型、粒径、制备方法、表面改性工艺等方面进行认真的选择,以减少或完全消除其光活性的危害。这是纳米二氧化钛在防晒化妆品应用中一个新而重要的研究课题^[34-35]。

参考文献:

- [1] 李晓娥. 纳米 TiO₂ 紫外线屏蔽性能的研究[J]. 涂料工业, 2000, (9): 31.
- [2] 余爱萍. 无机纳米抗紫外粉体及其在化妆品中的改性应用[J]. 材料导报, 2001, 15(12): 38.
- [3] 周友亚. 二氧化钛在化妆品和环境保护中的应用[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(8): 1021.
- [4] 杜华. 二氧化钛光敏性浅谈[J]. 北京日化, 2001, 65(4): 161.
- [5] 祖庸. 纳米TiO₂在化妆品中的应用[J]. 钛工业进展, 1998, (9): 28.
- [6] 姚超, 吴凤芹, 林西平, 等. 防晒化妆品中的纳米二氧化钛[J]. 日用化学工业, 2003, 33(5): 333-336.
- [7] 李红娟, 何唯平. 纳米二氧化钛分散性能与光催化活性研究[J]. 涂料工业, 2010, 40(1): 24-28.
- [8] 董淑萍, 胡晓宏, 刘艳华. TiO₂光催化净化室内低浓度氮氧化物[J]. 清洁与空调技术, 2007, (2): 1-4.
- [9] 马艳菊, 郁昂. 纳米二氧化钛的毒性研究进展[J]. 环境科学与进展, 2009, 34(8): 33-37.
- [10] Sakai H, Ito E, Cai RX, et al. Intracellular Ca²⁺ concentration change of T24 cell under irradiation in the presence of TiO₂ ultrafine particles[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1201(2): 259-265.
- [11] Long TC, Saleh N, Tilton RD, et al. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticles neurotoxicity [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40: 4346-4352.
- [12] Wamer WG, Yin JJ, Wei RR. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide [J]. Free Radic Biol Med, 1997, 23(6): 851-858.
- [13] Amezcaga-Madrid P, Silveyra-Morales R, Cordoba-Fierro L, et al. TEM evidence of ultrastructural alteration on *Pseudomonas aeruginosa* by photocatalytic TiO₂ thin films [J]. J Photochem Photobiol B, 2003, 70(1): 45-50.
- [14] Xiong XL, Wu ML, Li SP. The influence of cell cycle of human hepatoma cell by nanometer titanium dioxide [J]. Cancer Res Prev Treat, 2003, 30(4): 300.
- [15] Lovern SB, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles [J]. Environ Toxicol Chem, 2006, 25(4): 1132-1137.
- [16] Chen XY, Wang LG, Li L, et al. Inhibition of TiO₂ against *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. Chin J, 8

- BiolControl, 2005, 21(4): 269-272.
- [17] 方艳芬, 黄应平, 陈和春, 等. 二氧化钛光催化体系中的羟基自由基的测定[J]. 分析化学, 2006, 34(9): S83-S86.
- [18] HUANG Y P, MA W H, LI J, et al. Efficient H₂O₂ Oxidation of Organic Pollutants catalyzed by Supported Iron Sulfohenylporphyrin under Visible Light Irradiation [J]. Phys.Chem.B, 2004, 108, 7263-7270.
- [19] Tchler M J, Domann F E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2007, 43 (7): 1023-1036.
- [20] Castranova V, Porter D, Millecchia L, et al. Effect of inhaled crystalline silica in a rat model: Time course of pulmonary reactions [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2002, 234-235 (1): 177-184.
- [21] 潘洪志, 邱向红, 王军, 等. 番茄红素对大鼠细胞 DNA 氧化损伤修复的研究中国卫生检验杂志[J]. 2003, 13(4): 404-405.
- [22] 张桂玲, 戴柏青. 嘌呤受羟基自由基损伤机制的量子化学研究[J]. 中国生物化学与生物学报, 2000, 16(1): 120-123.
- [23] Ashikaga T, Wada M, Kobayashi H, et al. Effect of the photocatalytic activity of tio₂ on plasmid DNA[J]. Mutat Res, 2000, 466(1): 1-7.
- [24] Jacobson MD, Raff MC. Programmed cell death and bcl 2 protection in very low oxygen [J]. Nature, 1995 , 374(6525) : 814.
- [25] Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, et al. UV-induced oxidative stress and photo aging[J]. Curr Probl Dermatol, 2001, 29: 83-94.
- [26] Fisher GJ, Talwar HS, Lin J, et al. Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinas pathways in human skin in vivo [J]. J Clin Invest, 1998, 101: 1432-1440.
- [27] Tan MH, Commem CA, BurnerL, et al. A pilot study on the percutaneous absorption of microfine titanium dioxide from sunscreens[J]. Aus J Dermatol, 1996, 37(4):185-187.
- [28] Schulz J, Hohenberg H, Hlacker F, et al. Distribution of sunscreen on skin[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2002, 54 (1):157-163.
- [29] Pflücker F, Wendel V, Hohenberg H, et al. The human stratum corneum layer~An effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide[J]. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2001, 14 (1): 92-97.
- [30] Lademarm J, Weigman H, Rickmeyer C, et al. Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice[J]. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 1999,

12(5):247-256.

- [31] Bennat C, Miiller-Goyman n CC. Skin penetration and stabilization of form ulations containing micmfine titanium dioxide as physical UV filter[J]. Int J Cosmetic Sei, 2000, 22(4): 271-283.
- [32] Menzel F, Reinert T, Vogt J, et al. Investigations of percutaneous uptake of ultrafine tio2 particles at the high energy ion nanoprob LIPSION [J].Nucl Instr Meth B, 2004; 219-220: 82-86.
- [33] Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, et a1. Forum series: Research strategies for safety evaluation of nanomaterials[J]. Toxicol Sci, 2005, 21: 1-30.
- [34] 朱利安. 二氧化钛与硅氧烷类物质制备高效化妆品用防晒剂[J]. 日用化学品科学, 2001, 24(5): 321.
- [35] 张瑞波.超细二氧化钛在防晒化妆品中的应用[J]. 北京日化, 2000, 59(2):131.

作者简介

CURRICULUMVITAE

张学艳，女，中共党员，1982年3月生，山东省郯城县人。2007年月本科毕业于济宁医学院预防医学专业。2007年9月开始在东南大学公共卫生学院攻读硕士研究生学位。所学专业为劳动卫生与环境卫生学。在读期间共学习必修和选修课程共计31学分，所修课程全部合格。在校期间，积极参加预防医学本科实验教学工作，取得较好的效果；顺利通过江苏省硕士学位英语考试。在读期间，研究方向为分子环境医学，部分研究成果已经发表和参加会议交流。

研究生期间发表的学术论文

第一作者：

1. The Immune Toxicity of small size Titanium Dioxide Nanoparticles on Rats Pulmonary Alveolar Macrophages via intra-tracheal instillation in vivo[J]. The 8th National Postgraduate Symposium on Enviromental and Occupational Medicine, 2009, 169-174.
2. 小粒径纳米 TiO₂ 暴露对大鼠肺巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 第八届全国环境与职业医学研究生学术研讨会,2009,175-179.
3. 纳米 TiO₂ 暴露对大鼠肺巨噬细胞免疫功能的影响[J]. 东南大学校庆论文收录.
4. Effects of Hydroxyl Radicals from Titanium Dioxide by UV Exposure on 3T3 Cells [J]. The 5th International Academic Conference on Enviromental and Occupational Medicine. 2010, 177-179.

非第一作者：

1. Small-sized Titanium Dioxide Nanoparticles Mediated Immune Dysfunction of Rats Pulmonary Alveolar Macrophages in vivo[J]. JNN, 2009.
2. DNA 修复酶基因 MGMT 启动子区异常甲基化与食管癌的关系[J]. 癌变·畸变·突变, 2008,2(21),105-108.

致 谢

ACKNOWLEDEMENTS

值此论文完成之际，首先向尊敬的导师尹立红教授表示衷心的感谢和诚挚的敬意。时光如梭，转眼三年的学习生活即将结束。三年来，导师敏锐的思维、严谨的治学态度、渊博的学识、诚挚谦虚的品格，永远值得我学习和效仿。导师在我的学业上尤其是在论文的撰写过程中，倾注了大量的心血，给予了我许多教诲和指导，将使我终生受益。

同时感谢浦跃朴教授，为我的课题设计和论文修改，提出了很多宝贵意见。感谢汪国雄教授在我的论文审阅中给出的大量修改意见，他的敬业精神也深深感染了我。

感谢刘冉老师在我的实验和论文撰写中给予的大量指导和帮助。

感谢江苏省疾病预防控制中心毒理与功能实验科给予我课题的帮助与支持。

感谢我的同学冀琛，在他的帮助下我的课题才得以顺利进行。

感谢课题组苏耀耀、李小琴、王希凯、刘辉、张艳秋等同学，实验室葛锡泳、冯靖宇等同学在试验中给予的帮助！

感谢劳环系沈孝兵、梁戈玉、李晓波、张娟、杨红等老师给予的关怀与帮助。

感谢公共生卫学院党委和实验中心各位老师的关心与支持。

谨向各位老师表示诚挚的谢意。

最后，我要衷心地感谢我的父母，感谢他们在我学习生活中所给予的精神上极大的理解与支持。感谢罗亚洲在我的工作、学习、科研生活中给与的帮助与照顾。

向所有关心和帮助过我的人们致以深深的祝福！