文章编号: 1001-0580(2009)03-0310-03 中图分类号: R 994.6 文献标志码: A 【论 著】

纳米二氧化钛毒性线虫模式生物评价*

刘冉,阮秦莉,范从杰,尹立红,浦跃朴

摘 要: **目的** 利用模式生物—秀丽隐杆线虫探讨二氧化钛(TiO_2)纳米颗粒的毒性作用,为建立线虫作为毒理学评价模型提供试验依据。**方法** 采用 5,35,300 nm等 3种粒径的二氧化钛对秀丽隐杆线虫以 0.1,1.0,10.0 g/L等 3个浓度染毒 24 h,应用世代时间、后代数目、头部摆动频率和身体弯曲频率及体长等生殖、运动和发育的相关指标对纳米二氧化钛毒性作用进行综合评价。**结果** 与对照组比较,暴露于 5 nm TiO_2的线虫在中高浓度暴露组均出现生殖、运动和发育等多系统的异常($P<0.05$);而暴露于 35 nm TiO_2的线虫仅在高浓度暴露组出现生殖、运动等指标的异常($P<0.05$);暴露于 300 nm TiO_2时高浓度暴露组的线虫出现身体弯曲频率降低($P<0.05$),其他浓度组未出现差异有统计学意义的改变。**结论** 纳米 TiO_2暴露可影响秀丽隐杆线虫运动、生殖和发育等多种系统,并与粒径和暴露浓度有关。

关键词: 纳米二氧化钛;毒性作用;秀丽隐杆线虫

Toxicity of TiO_2 nanoparticles on nematode Caenorhabditis elegans LIU Ran, RUAN Qin-li, FAN Cong-Jie, et al School of Public Health, Southeast University (Nanjing 210009, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the toxicity of nano-titanium dioxide (TiO_2) with the model organism of Caenorhabditis elegans (C. elegans). **Methods** C. elegans were exposed to 0.1, 1.0 or 10 g/L of 5nm, 35nm, and 300nm TiO_2 primary particles, respectively. The toxic effects were determined with endpoints of development, reproduction, and locomotion behavior. **Results** The exposure of 5nm TiO_2 primary particles lengthened the generation times, decreased the brood sizes and suppressed the locomotion behaviors at the exposure dose above 1.0 g/L ($P<0.05$). The generation times were significantly lengthened when C. elegans were exposed to 0.1g/L of 5nm TiO_2. C. elegans showed the decreased brood sizes and swings when exposed to 35 nm TiO_2 primary particles of 1.0 g/L and 10g/L ($P<0.05$). There was a significant difference in body bends between the high-dose group and the low or moderate dose groups with the exposure of 300nm TiO_2 ($P<0.05$). **Conclusion** The development, reproduction, and locomotion behavior of C. elegans are affected by TiO_2 nanoparticles exposure and the effect correlates with the size and concentration of TiO_2 nanoparticles.

Key words: titanium dioxide nanoparticles; toxicity; Caenorhabditis elegans

随着纳米二氧化钛(nm-TiO_2)的广泛应用,人群对纳米二氧化钛的职业接触和环境暴露的机会增大。纳米二氧化钛材料热、磁、光敏感特性和表面稳定性等不同于常规粒子,其生物效应也可能发生改变,表现为特殊的生物毒作用[1-3]。而秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans, C. elegans)作为环境毒理学研究的模式生物,具有遗传背景清楚、对多系统毒性敏感、行为反应模式稳定、测试周期短、结果灵敏可靠等特点[4,5]。因此,本研究利用 C. elegans模式生物应用发育、生殖和运动等多系统的相关指标探讨纳米二氧化钛颗粒的毒性作用及其特征,为建立线虫作为毒理学评价模型提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 5和 35 nm粒径的 TiO_2材料(浙江弘晟材料科技股份有限公司);300 nm粒径的 TiO_2材料(上海江沪钛白化工有限公司)。3种材料均为锐钛矿,纯度 >98%。

1.2 受试生物 野生型 N_2秀丽隐杆线虫(东南大学基础医学院惠赠)。线虫的培养采用线虫生长培养基(NGM),佐以大肠埃希菌(*E. coli*)OP50为食,采用标准程序培养[6]。

1.3 暴露方法 选取 5,35,300nm粒径的 TiO_2纳米材料,应用适当的分散剂配成 0.1,1.0,10.0 g/L的悬浊液,每个培养皿中加入 nm-TiO_2溶液各 200 μl,空白对照组的培养皿中加入相应的分散剂。暴露前 24 h将 nm-TiO_2注入培养皿中,渗透 24 h使颗粒分布均匀。线虫暴露时间为 24 h,所有线虫均在 20 ℃条件下培养。共设立 9个实验组,1个空白对照组。

1.4 体长的测定 将 L4幼虫期的线虫挑取到含有不同浓度 nm-TiO_2溶液的培养皿中,暴露 24 h后测量体长。

1.5 后代数目、世代时间的测定 后代数目(Brood size)是指将一个 L4期幼虫放入培养皿中暴露 24 h,然后将线虫转到正常的培养皿中继续培养,当代线虫(P0)发育为成虫所产生的后代数目,世代时间考察的是从 P0代成虫产卵到其 F1代成虫产卵的时间间隔(Generation time)。

1.6 头部摆动频率测定 首先将 L4幼虫期线虫在含不同浓度 nm-TiO_2的培养皿中暴露 24 h,然后在一个新的培养基上滴加 60 μl的 M9缓冲液,将已发育为成虫的线虫挑入溶液中,经过 1 min的恢复,记录线虫在 1 min内头部摆动的次数(当身体弯曲达到体长的一半作为 1次头部摆动)。

1.7 身体弯曲频率测定 L4幼虫期线虫在含不同浓度 nm-TiO_2的培养皿中暴露 24 h,然后将已发育为成虫的线虫挑到一个没有 OP50的 NGM培养基上,记录下 20 s内身体弯曲的次数。假定沿着咽泵的方向为 y轴,那么线虫爬行过程中身体沿着相应 x轴方向上的 1次改变定义为 1个身体弯曲。

1.8 统计分析 采用 SPSS 13.0软件进行分析。用方差分析法进行组间差异统计学分析。

2 结 果

2.1 分散剂的选取 应用 0.3% NaCl、0.5%羧甲基纤维素钠、1%磷酸盐缓冲液(PBS)、0.5%六偏磷酸钠、0.1%焦磷酸钠(与 TiO_2的质量比)等分散剂分析其对各种粒径 TiO_2的分

*基金项目: 国家基础研究"973"计划项目(2006CB705602)
作者单位: 东南大学公共卫生学院,南京 210009
作者简介: 刘冉(1974-),女,山东平原人,讲师,博士,研究方向:分子毒理学。
通讯作者: 尹立红

散效果。结果表明,采用 0.5%六偏磷酸钠对各种粒径 TiO_2 进行分散时沉降较慢,24 h均匀程度最好。

2.2 nm-TiO_2 对线虫生殖系统的影响(表 1)

2.2.1 nm-TiO_2 对线虫生殖速度的影响 应用世代时间评价 nm-TiO_2 对线虫生殖速度的影响,结果显示,不同粒径和不同浓度的 nm-TiO_2 暴露对线虫生殖的影响不同。暴露于 5 nm 时各浓度组与对照组差异均有统计学意义($P<0.05$),但未显示浓度-反应关系;暴露于 35 nm TiO_2 的各剂量组与对照组比较差异均无统计学意义;暴露于 300 nm TiO_2 时浓度为 1.0 g/L 的浓度组与空白对照比较差异有统计学意义($P<0.05$)。各浓度组内随着 nm-TiO_2 粒径降低,世代时间逐渐延长,5和 35 nm TiO_2 暴露组与对照组比较差异有统计学意义。

2.2.2 nm-TiO_2 对线虫生殖能力的影响 应用产卵数目评价 nm-TiO_2 对线虫生殖能力的影响。结果表明,5 nm TiO_2 的中高浓度组、35 nm TiO_2 的高浓度组与对照组之间差异有统计学意义($P<0.05$);暴露于 300 nm TiO_2 时,各浓度组与对照组比较差异无统计学意义。中高浓度组内随着 nm-TiO_2 粒径降低,产卵数目有降低的趋势,但粒径-反应关系差异无统计学意义。

表 1 不同粒径、浓度 nm-TiO_2 颗粒暴露对秀丽隐杆线虫生殖系统的影响($\bar{x}\pm s$)

组别(nm)	浓度(g/L)	世代时间(h)	产卵数目(个)
对照	—	54.73±1.22	182±27
TiO_2			
5	0.1	56.42±0.66^{ab}	171±13
	1.0	57.10±1.14^{ab}	154±7^{ab}
	10.0	56.80±0.57^{ab}	145±6^{ab}
35	0.1	55.60±1.14^{a}	172±11
	1.0	59.00±1.22^{a}	158±11
	10.0	56.20±1.30^{a}	138±24^{ab}
300	0.1	54.40±1.34	164±30
	1.0	52.60±1.14^{ab}	165±31
	10.0	55.70±0.84	151±37

注:同浓度暴露组之间比较,a $P<0.05$;同粒径暴露组之间比较,b $P<0.05$。

2.3 nm-TiO_2 对线虫运动能力的影响(表 2)

2.3.1 nm-TiO_2 对线虫头部摆动频率的影响 结果表明,暴露于 5 nm TiO_2 的各组线虫存在浓度-反应关系。随暴露剂量增加线虫头部摆动频率显著降低($P<0.05$);暴露于 35 nm TiO_2 时仅高浓度组与对照之间差异有统计学意义($P<0.05$);300 nm TiO_2 的各浓度组与对照组之间差异均无统计学意义。中高浓度组内随着 nm-TiO_2 粒径降低,线虫头部摆动频度显著降低,高浓度暴露组内尺度依赖关系差异有统计学意义。

2.3.2 nm-TiO_2 对线虫身体弯曲频率的影响 表 2可见,5 nm TiO_2 暴露组随暴露浓度增加身体弯曲频率显著降低($P<0.05$),而 35和 300 nm TiO_2 各暴露组未显示浓度依赖关系。各浓度组内随着 TiO_2 尺度降低,身体弯曲频度有降低的趋势,但粒径-反应关系差异无统计学意义。

2.3.3 nm-TiO_2 对线虫生长发育的影响 应用体长评价 nm-TiO_2 对线虫生长发育的影响,结果表明,5 nm TiO_2 的中高浓度组与对照组之间差异有统计学意义($P<0.05$);高浓度组粒径-反应关系差异有统计学意义,随着 nm-TiO_2 粒径降低,线虫体长显著增长($P<0.05$)。

表 2 3种粒径不同、浓度 nm-TiO_2 纳米颗粒暴露对秀丽隐杆线虫运动和发育的影响($\bar{x}\pm s$)

组别(nm)	浓度(g/L)	头部摆动频率(次)	身体弯曲频率(次)	体长(mm)
对照	—	162±18	25±3	10.43±1.04
TiO_2				
5	0.1	155±9	24±2	11.15±1.01
	1.0	134±10^{ab}	19±2^{ab}	12.62±0.68^{ab}
	10.0	96±8^{ab}	17±2^{ab}	12.19±0.39^{ab}
35	0.1	146±42	26±2	11.26±0.92
	1.0	143±20	25±3	10.68±0.90
	10.0	136±15^{ab}	24±3	11.27±1.51
300	0.1	150±19	23±2	11.06±1.17
	1.0	154±11	24±2	10.47±0.64
	10.0	147±10^{a}	22±2^{b}	9.61±0.49

注:同浓度暴露组之间比较,a $P<0.05$;同粒径暴露组之间比较,b $P<0.05$。

3 讨 论

本研究结果显示,nm-TiO_2 可对秀丽隐杆线虫造成运动、生殖和发育多种系统的影响,且多种指标存在剂量和粒径依赖关系。当线虫暴露于 5 nm TiO_2 时,暴露浓度低至 1.0 g/L,线虫即出现了运动、生殖和发育等多系统功能的显著改变,与之相对应的是暴露于 300 nm TiO_2 时线虫的运动、生殖、发育等指标多未显示有显著改变,提示纳米二氧化钛对线虫的毒性作用与暴露浓度和颗粒大小密切相关。纳米二氧化钛的高化学活性,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[7,8]。研究表明,纳米二氧化钛能够影响细胞微结构、破坏细胞膜[9]。而且纳米粒子对靶器官的损伤作用可能与粒子的纳米特征有关,纳米粒子的粒径越小,比表面积越大,反应活性就越高,生物学作用可能就越强[10]。推测 5 nm TiO_2 通过消化道吸收进入到线虫体内,其粒径较小,线虫体内的防御机制无法或很难将其清除,可能进一步分布并作用于线虫的神经系统和生殖系统,引起线虫运动能力和生殖能力的降低。

本研究结果提示,基于微米级二氧化钛制订的现有二氧化钛的使用标准可能不适用于纳米二氧化钛,对纳米二氧化钛的安全性评价应该探索更为敏感的方法并制定新的标准,本次研究发现,国标(GB2760-2007)规定的最大使用剂量的微米级(300 nm)二氧化钛暴露可致线虫部分运动能力的改变,提示线虫作为模式生物在评价化学物的毒性作用时较为敏感,结合其简便、快速的多系统评价体系,在外来化合物的毒性评价生物模型的构建方面具有一定的价值。

参考文献

〔1〕 应贤平,仲伟鉴. 纳米二氧化钛颗粒毒理学进展[J]. 毒理学杂志,2006,20(5):334-336.

〔2〕 隋少峰,刘志艳,张红,等. 二氧化钛光降解饮用水中藻毒素的研究进展[J]. 中国公共卫生,2004,20(7):875-876.

〔3〕 Park JH, Kim S, Bard AJ. Novel carbon-doped TiO_2 nanotube arrays with high aspect ratios for efficent solar water splitting[J]. Nano Lett, 2006, 6: 24 - 28.
〔4〕 刘恩岐,仓林让. 模型动物秀丽隐杆线虫研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2003, 20(10): 22 - 24.
〔5〕 Grishok A. RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*[J]. FEBES Lett, 2005, 579(26): 5932 - 5939.
〔6〕 Mohri A, Kodama E, Kimura KD, et al. Genetic control of temperature preference in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 2005, 169(3): 1437 - 1450.
〔7〕 Wang JX, Zhou GQ, Chen CY, et al. Acute toxicity and biodistrbution of different sized titaium dioxide particles in mice after oral administration[J]. Toxicol Lett, 2007, 168: 176 - 185.
〔8〕 Warheit DB, Webb TR, Sayes CM, et al. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO_2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon size and surface area[J]. Toxicol Sci, 2006, 91: 227 - 236.
〔9〕 Nurkiewicz TR, Porter DW, Barger M, et al. Systemic microvascular dysfunction and inflammation after pulmonary particulate matter exposure[J]. Environ Health Perspect, 2006, 114: 412 - 419.
〔10〕 Baan R, Straif K, Grosse Y, et al. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc[J]. Lancet Oncol, 2006, 7(4): 295 - 296.

收稿日期: 2008-07-08 (宋艳萍编辑 孔繁学校对)

文章编号: 1001-0580(2009)03-0312-02 **中图分类号**: R 181.2+2 **文献标志码**: A

【调查研究与分析】

哈尔滨市区居民 10年恶性肿瘤死亡及减寿分析

兰莉,张桂荣,孙波,崔文秀,隋丛兰,徐国华

摘 要: **目的** 了解黑龙江省哈尔滨市区 1995～2004年恶性肿瘤死亡变化情况及其对居民健康和社会的危害,为制定防治措施提供科学依据。**方法** 采用标化死亡率、标化减寿率等指标对 1995～2004年哈尔滨市区居民恶性肿瘤死亡监测资料进行统计分析。**结果** 恶性肿瘤年均标化死亡率 99.06/10万(男性 116.62/10万,女性 81.06/10万)。男、女性总体标化死亡率和标化减寿率呈平稳变化趋势,而白血病和乳腺癌的标化死亡率和标化减寿率呈上升趋势。**结论** 肺癌是威胁我市居民身体健康的最主要肿瘤,是当前肿瘤防制工作的重点。同时应加强其他肿瘤尤其是白血病和乳腺癌的防控工作力度。

关键词:恶性肿瘤;标化死亡率;标化减寿率

Mortality, YPLL and WYPLL of cancer in urban Harbin, 1995 - 2004 LAN Li, ZHANG Gui-rong, SUN Bo, et al. Center for Disease Control and Prevention of Harbin (Harbin 150056, China)

Abstract: **Objective** To explore the disease burden of cancer in residents of urban Harbin from 1995 to 2004 and to provide sicentific basics for cancer prevention and control. **Methods** The data of cancer mortaliy in urban Harbin from 1995 to 2004 were analyzed by standardized mortaliy rate, standardized YPLL rate, standardized WYPLL rate. **Results** The annual standardized mortality rate was 99.06/10^5 (male 116.62/10^5, female 81.06/10^5). Standardized mortality rate of the male decreased steadily and that of the female increased steadily. In the 10 years, the life lost caused by lung cancer did not vary much. Standardized YPLL rate and standardized WYPLL rate of the male were higher than that of the female. The five main cancer in the famale were breast cancer, lung cancer, intestinal cancer, gastric cancer and liver cancer. **Conclusion** Lung cancer is the major cancer inducing great disease burden in residents of urban Harbin.

Key words: cancer; standardized mortality rate; standardized YPLL rate

当今,恶性肿瘤无论在发达国家或发展中国家,其发病和死亡均呈不断上升趋势。恶性肿瘤已成为危害人类健康的主要疾病之一[1]。为了解黑龙江省哈尔滨市区近 10年居民恶性肿瘤死亡变化情况及其对居民健康和社会的危害,为制定防治措施提供科学依据,现将哈尔滨市区 1995～2004年居民恶性肿瘤死亡资料分析如下。

1 资料与方法

1.1 资料 死亡资料来源于哈尔滨市疾病预防控制中心生命统计死因监测资料积累;人口资料由哈尔滨市公安局提供。

1.2 统计分析 死因分类按照国际疾病分类标准进行分类。应用 Excel进行统计,并采用 SPSS软件进行分析。以 1990年中国人口构成进行各种率的标化。

作者单位:黑龙江省哈尔滨市疾病预防控制中心慢性非传染性疾病预防控制所,150056
作者简介:兰莉(1970 -),女,黑龙江哈尔滨人,副主任医师,硕士,主要从事慢性非传染性疾病预防控制工作。

2 结 果

2.1 恶性肿瘤死亡分析

2.1.1 恶性肿瘤总死亡情况 1995～2004年哈尔滨市区居民恶性肿瘤共死亡 42 432人,占总死亡的 21.99%,年平均粗死亡率为 141.04/10万,标化死亡率为 99.06/10万,占总死亡的 21.99%,居全死因第 1位。其中,男性恶性肿瘤死亡 25 624人,粗死亡率为 169.65/10万,标化死亡率 116.62/10万;女性恶性肿瘤死亡 16 806人,粗死亡率 112.20/10万,标化死亡率为 81.06/10万,男、女各占同性别总死亡的 23.20%和 20.36%。男性死亡率高于女性,性比值为 1.51:1。

2.1.2 10种主要恶性肿瘤的死亡率及位次(表 1) 10年间位于前 10位的恶性肿瘤中,除乳腺癌和女性特有的宫颈癌的死亡率女性高于男性外,其余均为男性高于女性。男女性死亡率前 4位均依次为肺癌、肝癌、胃癌、结直肠癌,男性分别是女性的 1.58倍,2.61倍,2.04倍,1.33倍。男性居第 5位的为食管癌,女性为乳腺癌。