

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20141102003

刘燕婕, 张艳红, 吕斌. 双酚 A 对纳米二氧化钛理化特性及其 DNA 损伤效应的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 224-229

Liu Y J, Zhang Y H, Lu B. Impacts of bisphenol A on physicochemical properties and DNA damage effects of titanium dioxide nanoparticles on human embryo liver cell [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 224-229(in Chinese)

双酚 A 对纳米二氧化钛理化特性及其 DNA 损伤效应的影响

刘燕婕^{1,2}, 张艳红², 吕斌^{2,*}

1. 长江航运总医院/武汉脑科医院检验科, 武汉 430015

2. 华中科技大学公共卫生学院, 武汉 430030

收稿日期: 2014-11-02 录用日期: 2015-02-04

摘要: 纳米二氧化钛(nano-TiO₂)应用领域广泛, 由于其对有机物或生物分子有吸附作用, 二者相互反应, 对各种细胞可能与 nano-TiO₂单独作用时不同的毒性作用。为探讨双酚 A(BPA)对 nano-TiO₂理化性质的影响, 以及 BPA 和 nano-TiO₂联合暴露对人胚肝 L-02 细胞的 DNA 损伤效应。用不同缓冲液, 测定不同浓度的 BPA(0、0.1、1、10 mol·L⁻¹)对不同浓度 nano-TiO₂(0、0.1、1、10 mg·L⁻¹)的粒径、表面电位和吸附能力的影响; 然后测定不同浓度 BPA 和 nano-TiO₂联合暴露对人胚肝 L-02 细胞 DNA 双链断裂、DNA 损伤关键修复酶 hMsh2 基因(hMsh2)、O⁶-甲基鸟嘌呤甲基转移酶(MGMT)和 DNA 依赖蛋白激酶复合物催化亚基(DNA-PKcs)的 mRNA 表达水平表达的影响。结果表明在不同缓冲液中, 随着 BPA 浓度的增加, nano-TiO₂粒径增加, 表面电位上升, 在细胞培养液 DMEM 中这一变化趋势最为明显; 但在不同缓冲液中 nano-TiO₂对 BPA 的吸附能力无明显差异。单独 nano-TiO₂暴露不引起 DNA 双链断裂, 对 DNA 损伤修复关键酶的表达也无明显影响, 但 nano-TiO₂可加重 BPA 的 DNA 双链断裂效应。与相应剂量的 BPA 单独染毒组比较, nano-TiO₂与 BPA 混合染毒组的细胞 DNA 双链断裂损伤加重($P < 0.05$), hMsh2、MGMT 和 DNA-PKcs 的基因表达水平明显上升($P < 0.05$)。上述研究结果显示 BPA 可促进 nano-TiO₂团聚, 但团聚的 nano-TiO₂仍可吸附 BPA。单独 nano-TiO₂暴露无 DNA 损伤作用, 但 nano-TiO₂可加重 BPA 的 DNA 双链断裂效应。其中 hMsh2、MGMT 和 DNA-PKcs 都参与 2 种污染物联合暴露所致的 DNA 损伤修复。

关键词: 纳米二氧化钛; 双酚 A; 理化性质; 联合暴露; DNA 损伤

文章编号: 1673-5897(2015)2-224-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Impacts of Bisphenol A on Physicochemical Properties and DNA Damage Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Embryo Liver Cell

Liu Yanjie^{1,2}, Zhang Yanhong², Lu Bin^{2,*}

1. Laboratory Department, General Hospital of Yangtze River Shipping/Wuhan Brain Hospital, Wuhan 430015, China

2. School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Received 2 November 2014 accepted 4 February 2015

Abstract: Titanium dioxide nanoparticles (nano-TiO₂) have been used widely and may react with a wide range of organic and biological molecules and then exhibit toxic effects in various cell lines, with or without photo activation. The effects of the interaction of TiO₂ nanoparticles (nano-TiO₂) with bisphenol A (BPA) on their

基金项目: 国家 863 项目(No. 2012AA06A304); 国家自然科学基金项目(No. 21277054); 交通运输部长江航务管理局科技项目(No. 201410015)

作者简介: 刘燕婕(1967-), 女, 博士, 研究方向为环境毒理学, E-mail: liuyanjie0411@aliyun.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: lubin@mails.tjmu.edu.cn

physicochemical properties and DNA damage effects in human embryo L-02 hepatocytes were evaluated. Different concentrations of BPA (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and nano-TiO₂ (0, 0.1, 1, 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) were mixed to analyze the size distribution, zeta potential and adsorption capacity of nano-TiO₂ in different media. Then L-02 cells were exposed to different concentration of BPA (0, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and nano-TiO₂ (0, 0.1, 1, 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 hours, respectively. DNA damage and the expression of DNA repair enzymes O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT), DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) and hMSH2 in L-02 cells were analyzed. Results indicated that addition of BPA to nano-TiO₂ dispersions increased the aggregation level and zeta potential of nano-TiO₂ in all media. Nano-TiO₂ had a similar adsorption capacity in different media, although a higher aggregation level was observed in cell culture medium. Obviously, Interactions of nano-TiO₂ with BPA increased agglomeration and zeta potential, but did not influence the adsorption capacity of nano-TiO₂. The aggregated nano-TiO₂ can enrich BPA effectively. Toxicity analysis showed that nano-TiO₂ did not induce significant DNA damage, but the mixture of nano-TiO₂ and BPA increased DNA double strand breaks and the expression of three DNA repair enzymes. It is clear that BPA and nano-TiO₂ mixture induce synergistic DNA damage effects. And hMSH2, MGMT and DNA-PKcs all participated in the DNA damage repair pathway induced by the mixture of BPA and nano-TiO₂.

Keywords: titanium dioxide nanoparticles; bisphenol A; physicochemical characters; combined exposure; DNA damage

纳米二氧化钛(nano-TiO₂)是最常使用的纳米材料之一,广泛应用于牙膏、防晒霜、化妆品、食品、药物中^[1]。nano-TiO₂由于具有粒径小、比表面积大、表面原子暴露等特点,可穿透细胞膜进入细胞内,产生大量活性氧(ROS),对细胞造成不同程度的氧化应激损伤,包括 DNA 损伤和染色体断裂等^[2-4]。近年来随着 nano-TiO₂ 的应用日渐增多,大量进入环境中的 nano-TiO₂ 很容易吸附环境中的不同污染物,可能产生与 nano-TiO₂ 单独作用时不同的毒性作用^[5]。

双酚 A(BPA)广泛用于塑料瓶、食品和饮料容器制备及罐头内侧涂层等^[6]。BPA 具有雌激素效应,属于环境雌激素,不但会干扰体内雌激素平衡,还可通过氧化应激导致机体损伤^[7]。由于 BPA 在环境中广泛存在,极易与 nano-TiO₂ 产生联合作用,影响两者的理化特性,并进一步影响其联合毒性效应。

纳米颗粒物与有机物的相互作用可影响纳米颗粒的物理化学特性和吸附性能,并进一步影响联合暴露的毒性效应^[8]。BPA 和 nano-TiO₂ 均可导致 DNA 损伤, DNA 损伤也是肿瘤等多种慢性毒性效应的主要早期生理和病理改变之一。为此,本研究以人胚肝 L-02 细胞的 DNA 损伤作为毒性评价指标,首先研究了 BPA 对 nano-TiO₂ 理化性质的影响,然后分析 BPA 和 nano-TiO₂ 联合暴露对人胚肝 L-02

细胞 DNA 断裂和修复的影响,为深入了解纳米材料的生态效应提供实验依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 主要试剂和细胞株

纳米粒度分析仪 Delsa NanoC, 购自美国 Beckman 公司; Waters Micromass-quattro Micro 三重四级杆串联质谱仪(HPLC-MS/MS), 购自美国 Waters 公司; Nano-TiO₂ (Degussa P25 型, 锐钛矿型/金红石型 = 8/2), 购自德国 Degussa 公司; BPA 为化学纯, 购自美国 Sigma 公司; 细胞培养液 DMEM, 购自美国 Sigma-aldrich 公司; 人胚肝细胞 L-02, 购于武汉大学典型培养物收藏中心, 本实验室保存。胎牛血清, 购自美国 Gibco 公司; Trizol 试剂, 购自美国 invitroge 公司; M-MLV 逆转录试剂, 购自 Promega 公司; PCR 引物由上海博亚生物技术公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 粒径和 Zeta 电位检测

在纯水、CaCl₂ 和 DEME 培养基中, 分别配制 nano-TiO₂ (1、5、10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 BPA (0、0.1、1、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的混合溶液, 然后用纳米粒度分析仪在不同时间内 (0 ~ 60 min 内) 测定粒径和 Zeta 电位。

1.2.2 nano-TiO₂ 对 BPA 的吸附实验

在纯水、CaCl₂ 和 DEME 培养基中, 分别配制含 10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nano-TiO₂ 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPA 的混合溶

液,混合后不同时间段内分别取 1 mL 混合溶液, 12 000 r·min⁻¹离心 5 min 后取上清液,0.22 μm 滤膜过滤后用 HPLC-MS/MS 检测。以未加入 nano-TiO₂ (10 mg·L⁻¹)的不同浓度 BPA 作对照组检测。为防止 BPA 光降解 nano-TiO₂,整个实验需避光检测。

1.2.3 细胞培养及处理

L-02 细胞于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中,5% CO₂、37 ℃ 常规培养,取对数生长期细胞进行染毒,分组见表 1,阴性对照组只加培养基,以 300 μmol·L⁻¹ H₂O₂ 为阳性对照组。各组在无血清的培养液中继续培养 24 h。

1.2.4 中性彗星实验

首先将 1% 正常熔点琼脂糖 100 μL 铺于磨砂载玻片上,室温下固化 1.5 h 后,加上混有 1.0 × 10⁵ 个细胞的 0.50% 低熔点琼脂糖 100 μL,盖上盖玻片 4 ℃ 条件下放置 10 min,去掉盖玻片后在避光的条件下,在裂解液 (2.5 mol·L⁻¹ NaCl、100 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA、10 mmol·L⁻¹ Tris base、1% Triton-X 100 and 10% DMSO)裂解 1 h 后,置于新鲜冰冷电泳缓冲液 (0.3 mol·L⁻¹ CH₃COONa,pH = 8.5)中电泳 40 min (电压 25 V,电流 300 mA)。停止电泳后,10 μg·mL⁻¹ 的溴化乙锭染色拍照。用 CASP 软件分析细胞,以 Oliver 尾矩 (Olive Tail Moment, OTM, 即尾部 DNA 百分含量 × (尾光密度中心-头光密度中心)为评价指

标,每个样本随机分析 100 个细胞)。

1.2.5 RT-PCR 实验

Trizol 提取细胞总 RNA,采用 M-MLV 逆转录试剂扩增目的基因。扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶中电泳 (含 0.5 μg·mL⁻¹ 的溴化乙锭),并分析光密度,PCR 产物量以积分光密度 × 面积表示。以 GAPDH 为对照,目的条带与对照组的灰度值的比值表示 mRNA 的表达水平。

1.3 统计学方法

实验数据均使用 $x \pm s$ 表示, $\bar{x}$ 为每个实验组或对照组的平均值, s 为标准差。所有数据均使用 SPSS 12.0 进行统计, $P < 0.05$ 时为统计结果的差异有显著性。

2 结果 (Results)

2.1 BPA 对 nano-TiO₂理化特性的影响

2.1.1 BPA 对 nano-TiO₂粒径和 Zeta 电位的影响

在 pH = 7.7 时,nano-TiO₂ 表面带负电荷,加入 BPA 后,nano-TiO₂ 粒径增加,表面 Zeta 电位升高,其中 nano-TiO₂ 在含 Ca²⁺ (0.2 g·L⁻¹ CaCl₂)的 DMEM 培养基中的粒径最大 (表 1)。此外,在任意介质中,随着时间和 BPA 浓度的增加,nano-TiO₂ 的粒径增大,Zeta 电位上升 (图 1)。显示 BPA 能促进 nano-TiO₂ 团聚,具剂量-效应关系。

表 1 在不同缓冲液中 BPA 对 nano-TiO₂ 粒径和 Zeta 电位的影响 (n = 3)

Table 1 Average particle size and zeta potential of nano-TiO₂ and BPA mixture in different solutions (n = 3)

溶液类型 Solution	BPA 浓度/(μmol·L ⁻¹) BPA concentration /(μmol·L ⁻¹)	粒径 ^a Particle size ^a			Zeta 电位 Zeta potential		
		nano-TiO ₂ 浓度/(mg·L ⁻¹)			nano-TiO ₂ 浓度/(mg·L ⁻¹)		
		nano-TiO ₂ concentration/(mg·L ⁻¹)			nano-TiO ₂ concentration/(mg·L ⁻¹)		
		1	5	10	1	5	10
纯水 water	0	210.40 ± 7.29	275.50 ± 7.25	304.80 ± 8.18	- 31.44 ± 1.38	- 27.64 ± 1.14	- 26.82 ± 1.38
	0.1	220.10 ± 9.75	278.60 ± 7.30	313.27 ± 8.65	- 31.43 ± 0.80	- 27.55 ± 1.79	- 26.33 ± 1.08
	1	221.85 ± 7.00	320.50 ± 13.89	324.00 ± 8.23	- 30.89 ± 1.61	- 26.09 ± 1.37	- 23.90 ± 1.08
	10	224.70 ± 12.71	334.07 ± 3.99	337.00 ± 14.64	- 30.63 ± 0.93	- 25.85 ± 1.43	- 23.27 ± 0.75
CaCl ₂ *	0	312.60 ± 6.99	414.90 ± 12.80	431.30 ± 2.72	- 16.60 ± 1.06	- 11.60 ± 0.56	- 10.32 ± 0.87
	0.1	371.30 ± 12.75	422.90 ± 7.24	448.40 ± 6.87	- 14.21 ± 1.03	- 11.18 ± 0.89	- 9.06 ± 1.00
	1	389.80 ± 4.11	448.70 ± 14.47	455.10 ± 6.01	- 13.19 ± 0.81	- 9.29 ± 1.18	- 8.83 ± 0.72
	10	404.90 ± 14.97	456.43 ± 13.49	478.30 ± 7.05	- 12.99 ± 0.49	- 7.20 ± 0.75	- 6.92 ± 0.13
DMEM *	0	322.30 ± 8.84	367.00 ± 9.03	482.45 ± 3.06	- 25.27 ± 0.94	- 12.73 ± 0.66	- 8.02 ± 0.27
	0.1	341.00 ± 9.39	390.90 ± 2.25	496.80 ± 5.34	- 16.94 ± 1.53	- 11.69 ± 1.22	- 7.49 ± 0.43
	1	380.20 ± 0.92	402.90 ± 4.95	517.70 ± 6.69	- 12.15 ± 1.03	- 10.87 ± 0.47	- 6.15 ± 0.35
	10	457.40 ± 5.92	481.50 ± 8.67	561.00 ± 5.28	- 11.56 ± 0.77	- 8.07 ± 0.32	- 5.94 ± 0.29

注: * 与纯水组比较, $P < 0.05$; a 所用数据为动态光散射 3 次平均值。

Note: * compared with pure water, $P < 0.05$; a, Data were the average value of three measurements by the dynamic light scattering.

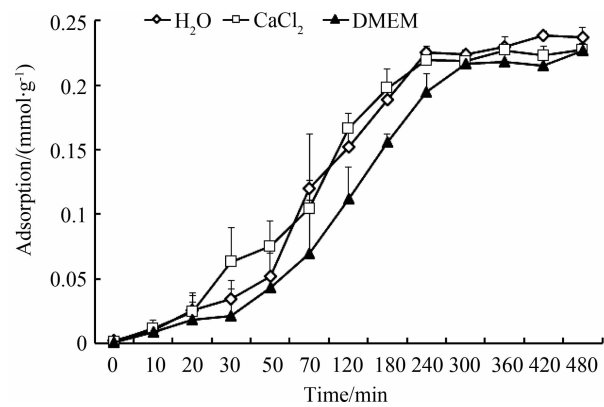


图 1 不同介质中 nano-TiO₂对 BPA 的吸附动力学曲线

Fig. 1 Adsorption kinetics of BPA by nano-TiO₂ in different media

2.1.2 BPA 对 nano-TiO₂吸附特性的影响

在任意 pH = 7.7 的介质中,10 mg·L⁻¹ nano-TiO₂与 10 μmol·L⁻¹ BPA 混合时,nano-TiO₂可有效吸附 BPA,在 300 min 左右达到吸附平衡,平衡时 BPA 吸附率为 22% 左右。nano-TiO₂吸附 BPA 的量在各个

介质中无显著差异(图 1)。

2.2 nano-TiO₂和 BPA 联合暴露对 DNA 的损伤效应

中性彗星试验显示的是 DNA 双链断裂效应,结果显示本实验 nano-TiO₂剂量下单独作用不引起明显 L-02 细胞 DNA 断裂损伤($P > 0.05$);而 10 μmol·L⁻¹ BPA 单独作用可显著性增加 L-02 细胞 DNA 双链断裂($P < 0.001$);BPA 与 nano-TiO₂联合染毒可显著增加 L-02 细胞 DNA 断裂损伤,并且随着 BPA 浓度的升高,Olive 尾矩增加,呈现剂量 - 效应关系。二因子析因分析,二者混合染毒有显著效应,存在协同作用($F = 213.93, P < 0.001$)(表 2)。

2.3 nano-TiO₂和 BPA 联合暴露对 DNA 损伤修复关键酶 mRNA 表达的影响

RT-PCR 实验表明 DNA 损伤修复关键酶 mRNA 的表达水平。结果表明高浓度(10 μmol·L⁻¹)的 BPA 与 nano-TiO₂共同作用于 L-02 细胞时,均可明显升高 MGMT、hMsh2 和 DNA-PKcs 的 RNA 表达量,低浓度 BPA 与 nano-TiO₂的相互作用对各个酶活性无明显的影响($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 BPA 与 nano-TiO ₂ 联合暴露对 DNA 断裂损伤效应 (Oliver tail ($\bar{x} \pm s$))				
Table 2 Combined effect of BPA and nano-TiO ₂ exposure on DNA damage (Oliver tail ($\bar{x} \pm s$))				
BPA 浓度/(μmol·L ⁻¹)	nano-TiO ₂ 浓度/(mg·L ⁻¹)			
BPA concentration/(μmol·L ⁻¹)	nano-TiO ₂ concentration/(mg·L ⁻¹)			
	0	1	5	10
0	0.31 ± 0.47	0.50 ± 0.49	0.81 ± 1.01	1.13 ± 0.89
0.1	0.44 ± 0.44	0.85 ± 1.35	1.32 ± 0.81*	1.55 ± 1.49*
1	1.17 ± 0.69	1.76 ± 1.73*	2.33 ± 1.10*	3.42 ± 1.94*
10	3.90 ± 2.50*	4.03 ± 1.35*	5.15 ± 7.74*	5.50 ± 2.47*

注: * 与阴性对照组(0.31 ± 0.47)比较, $P < 0.05$ 。

Note: * compared with negative control group (0.31 ± 0.47), $P < 0.05$.

表 3 BPA 与 nano-TiO ₂ 联合暴露对 DNA 损伤修复关键酶 mRNA 表达的影响					
Table 3 Combined effect of BPA and nano-TiO ₂ exposure on the expression level of DNA damage repair enzymes					
酶名称 Enzymes	BPA 浓度/(μmol·L ⁻¹)	nano-TiO ₂ 浓度/(mg·L ⁻¹)			
	BPA concentration	nano-TiO ₂ concentration/(mg·L ⁻¹)			
	/(μmol·L ⁻¹)	0	1	5	10
hMSH2	0	1.63 ± 0.13	1.44 ± 0.72	1.27 ± 0.65	1.04 ± 0.81
	0.1	1.47 ± 0.12	1.41 ± 0.30 [*]	1.29 ± 0.30 [*]	1.19 ± 0.30 [*]
	1	1.58 ± 0.31	1.28 ± 0.7	1.20 ± 0.89	1.04 ± 0.68
	10	3.22 ± 0.41 [*]	4.14 ± 0.61 [*]	4.87 ± 0.69 [*]	5.77 ± 0.31 [*]
DNA-PKcs	0	1.69 ± 0.53	1.26 ± 0.69	1.49 ± 0.80	1.79 ± 0.72
	0.1	1.59 ± 0.13	1.55 ± 0.77	1.27 ± 0.41	2.60 ± 0.60 [#]
	1	2.09 ± 0.15 [#]	1.98 ± 0.41 [#]	2.48 ± 0.47 [#]	2.55 ± 0.61 [#]
	10	3.18 ± 0.14 [#]	4.04 ± 0.97 [#]	4.65 ± 0.67 [#]	4.78 ± 0.75 [#]
MGMT	0	1.82 ± 0.42	1.72 ± 0.84	2.01 ± 0.39	2.48 ± 0.36
	0.1	1.53 ± 0.72	1.68 ± 0.15	1.12 ± 0.16	3.36 ± 0.14 [※]
	1	1.21 ± 0.33 [※]	1.82 ± 0.92	2.04 ± 0.49	3.55 ± 0.69 [※]
	10	2.59 ± 0.14 [※]	3.02 ± 0.92 [※]	3.49 ± 0.45 [※]	5.17 ± 0.69 [※]

注: * 与 hMSH2 阴性对照组(1.63 ± 0.13)比较, $P < 0.05$; [#] 与 DNA-PKcs 阴性对照组(1.69 ± 0.53)比较, $P < 0.05$; ^{**} 与 MGMT 阴性对照组(1.82 ± 0.42)比较, $P < 0.05$ 。

Note: * compared with hMSH2 negative control group (1.63 ± 0.13), $P < 0.05$; [#] compared with DNA-PKcs negative control group (1.69 ± 0.53), $P < 0.05$; ^{**} compared with MGMT negative control group (1.82 ± 0.42), $P < 0.05$.

3 讨论 (Discussion)

纳米材料在自然环境下易于聚集,从而影响纳米颗粒的分布和毒性。P25 nano-TiO₂的初始平均粒径为 25 ~ 50 nm,表面带负电荷。由于同种电荷之间互相排斥,nano-TiO₂的表面电荷可在一定程度上使其保持分散性。当 nano-TiO₂溶解在水溶液中,-OH 等溶解在水中的离子或分子会结合于 nano-TiO₂表面,改变 nano-TiO₂的表面电荷从而使颗粒有一定的团聚。BPA 的解离常数为 9.7,因此在 pH = 7.7 时,未解离的 BPA 可与覆盖于 nano-TiO₂表面的-OH 产生竞争,减少 nano-TiO₂表面的-OH,Zeta 电位上升,nano-TiO₂团聚程度增加,并呈现一定的时间和剂量关系。溶液中的离子浓度明显影响 nano-TiO₂的 Zeta 电位和团聚程度。nano-TiO₂和 BPA 在 CaCl₂和含大量离子的 DMEM 溶液中的 Zeta 电位和团聚程度明显高于纯水,说明溶液中的离子是影响团聚的主要因素。

虽然 nano-TiO₂在不同介质中的 Zeta 电位和团聚程度不同,但并不影响其对 BPA 的吸附能力,说明团聚状态并非影响纳米材料吸附性能的主要因素。团聚状态的 nano-TiO₂仍可以有效吸附 BPA,因此纳米材料在环境中的潜在毒性效应值得高度重视。

单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE),又称彗星实验(comet assay),能够灵敏地检测 DNA 断裂。其中中性彗星试验能测定 DNA 双链断裂等。本实验结果显示,高浓度 BPA(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)单独染毒可导致 DNA 双链断裂。nano-TiO₂单独染毒在本实验剂量下没有明显的 DNA 双链损伤效应,但联合染毒时可促进 BPA 的双链断裂损伤效应($P < 0.001$),两者具有协同效应。协同作用使混合暴露组在低浓度即发生了明显的 DNA 断裂损伤(表 2),显示低浓度 BPA 和 nano-TiO₂联合暴露时潜在的生态和健康风险增加。以往有研究表明纳米颗粒可穿透细胞膜,进入到细胞内线粒体膜,干扰线粒体功能产生 ROS^[9]。ROS 作为第二信使参与信号转导,启动多种细胞生物学效应。但当各种外源或内源性因素引起的 ROS 超过体内的清除能力时,则会导致细胞内的一些生物大分子(脂质、蛋白质、DNA 等)受到损伤。现认为在氧化应激条件下,细胞 ROS 水平升高,超过机体清除能力,可以攻击 DNA 分子中的单个碱基和核糖部分,造成 DNA 链断裂增加^[10]。Matsuoka 等^[11]发现 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 nano-TiO₂

与支气管上皮细胞作用,引起的氧化应激反应,ROS 的产生超过细胞抗氧化系统的清除能力。近期研究还表明 nano-TiO₂和一氧化碳联合暴露能加速 ROS 生成,最终导致脂质过氧化反应和 DNA 损伤^[12]。综合以上文献,本实验 nano-TiO₂与 BPA 联合染毒时,对 DNA 损伤的协同效应,很可能与 ROS 水平升高有关,但具体机制有待进一步阐释。

DNA 损伤修复酶在修复 DNA 断裂与维护细胞稳定方面具有重要作用。MGMT 是参与烷基化损伤的关键酶^[7];hMsh2 是一种重要的 DNA 错配修复基因,其产物参与错配修复途径中识别 DNA 错配并启动修复反应的作用^[13];DNA-PKcs 与 ku 蛋白结合形成 DNA 依赖的蛋白激酶全酶(DNA-PK),在双链 DNA 断裂的非同源末端结合修复途径中发挥重要作用,同时 DNA-PKcs 还可以通过磷酸化 Sp1、fos、P53 等一系列蛋白质底物广泛参与转录、信号传导及凋亡等细胞过程^[14]。本研究显示,nano-TiO₂单独作用,并不引起 DNA 断裂,也不影响 DNA 断裂相关酶的 RNA 表达水平,但 nano-TiO₂与不同浓度的 BPA 联合染毒,与相应剂量的 BPA 单独染毒比较,各种 DNA 修复酶表达水平均升高,说明 nano-TiO₂可增加 BPA 的 DNA 损伤及随后发生的 DNA 损伤修复水平。烷基化修复、错配修复和 DNA 断链修复等修复途径均可能参与 nano-TiO₂与 BPA 联合暴露所致 DNA 损伤的修复。

综上所述,nano-TiO₂在环境和生物介质中易于团聚,但团聚的 nano-TiO₂仍可有效吸附痕量 BPA,并增加 BPA 的 DNA 损伤效应。两者的 DNA 损伤作用具有协同效应,同时增加 DNA 修复酶的表。因此在考虑纳米材料的毒性效应时,需要进一步评价团聚的纳米材料的潜在毒性效应。

通讯作者简介:吕斌(1967-),女,博士,教授,主要研究方向为环境毒理学,发表论文 80 余篇。

参考文献(References):

- [1] Nel A, Xia T, Madler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. Science, 2006, 311(5761): 622-627
- [2] Karlsson H L, Gustafsson J, Cronholm P, et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size [J]. Toxicology Letters, 2009, 188(2): 112 - 118
- [3] Iavicoli I, Leso V, Fontana L, et al. Toxicological effects

- of titanium dioxide nanoparticles: A review of in vitro mammalian studies [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2011, 15(5): 481 – 508
- [4] Wiesner M R, Lowry G V, Jones K L, et al. Decreasing uncertainties in assessing environmental exposure, risk, and ecological implications of nanomaterials [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(17): 6458 – 6462
- [5] Bennetts L E, De Iuliis G N, Nixon B, et al. Impact of estrogenic compounds on DNA integrity in human spermatozoa: Evidence for cross-linking and redox cycling activities [J]. *Mutation Research*, 2008, 641(1 – 2): 1 – 11
- [6] Iyama T, Wilson D M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2013, 12(8): 620 – 636
- [7] Jiang J K, OberdOster G, Biswas P, et al. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, 11(1): 77 – 89
- [8] Long T C, Saleh N, Tilton R D, et al. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticle neurotoxicity [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(14): 4346 – 4352
- [9] Dianov G L, Parsons J L. Co-ordination of DNA single strand break repair [J]. *DNA Repair*, 2007, 6(4): 454 – 460
- [10] Knaapen A M, Borm P J, Albrecht C, et al. Inhaled particles and lung cancer. Part A. Mechanisms [J]. *International Journal of Cancer*, 2004, 109(6): 799 – 809
- [11] Cha M H, Rhim T Y. Proteomic identification of macrophage migration inhibitory factor upon exposure to TiO₂ particles [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(1): 56 – 63
- [12] Fang Q, Shi X, Zhang L, et al. Effect of titanium dioxide nanoparticles on the bioavailability, metabolism, and toxicity of pentachlorophenol in zebrafish larvae [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 11(283): 897 – 904
- [13] Edelbrock M A, Kaliyaperumal S, Williams K J, et al. Structure, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities [J]. *Mutation Research*, 2013, 743 – 744: 53 – 66
- [14] Vignard J, Mirey G, Salles B, et al. Ionizing-radiation induced DNA double-strand breaks: A direct and indirect lighting up [J]. *Radiotherapy and Oncology*, 2013, 108(3): 362 – 369 ◆