食品中纳米二氧化钛的毒性效应及机制研究进展

傅伊婧, 黄超, 巴乾, 王慧*

中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所; 中国科学院食品安全重点实验室(筹); 国家食品安全风险评估中心中国科学院上海生命科学研究院分中心, 上海 200031

*通讯作者, E-mail: huiwang@sibs.ac.cn

收稿日期: 2015-10-22; 接受日期: 2015-11-13; 网络版发表日期: 2016-01-25

摘要 随着科技的发展, 纳米二氧化钛(TiO_2)在食品行业被广泛应用, 其安全性也引起人们的普遍关注. 本文综述了国内外关于食品中纳米 TiO_2 颗粒的毒性研究进展, 介绍了纳米 TiO_2 的理化特点、代谢途径、毒性效应和作用机制. 本文将为纳米 TiO_2 的安全性研究及其在食品领域的应用提供参考.

关键词 纳米二氧化钛, 毒性效应, 作用机制

1 引言

纳米材料是指物质结构在三维空间中至少有一维处于纳米尺度, 或由纳米结构单元构成的具有特殊性质的材料^[1]. 目前常见的纳米材料包括碳纳米管、金属氧化物、量子点等. 纳米材料颗粒直径范围一般在 100 nm 以内, 比表面积大、尺寸小, 因而具有独特的理化活性(如吸附能力强、熔点低、吸光率高等), 使其在机械、化工材料、生物医药、食品、化妆品等多个领域被广泛应用. 纳米二氧化钛(TiO_2)主要被应用于涂料、油墨、玻璃、造纸等化工制造业, 化妆品、防晒霜、牙膏、抗菌药等日化行业, 药物传输系统等医药行业, 以及食物色素、营养补充剂等食品行业. 本文主要总结了目前食品中纳米 TiO_2 的体内代谢情况、细胞和动物水平的毒性效应及相关机理研究, 从而探讨食品纳米 TiO_2 对机体健康的潜在影响.

2 纳米 TiO_2 的理化性质

地壳中存在大量钛元素(Ti), 一般以化合物的形式存在, TiO_2 是最常见的一种. TiO_2 白色、无味、不易燃, 分子量为 79.9 g/mol, 25℃时相对密度为 4.26 g/cm³, 沸点为 2972℃, 熔点为 1843℃^[2]. 微米级 TiO_2 被认为具有化学惰性, 而纳米颗粒的物理化学形态和性质则完全不同. 影响颗粒理化性质的重要因素包括形状、尺寸、表面性能(如能量水平、电子结构、活动性)、内部结构、晶体相等. 传统上认为纳米 TiO_2 难溶于水, 低毒性, 但由于其独特的纳米效应(尺寸效应、表面效应、量子效应、自组装等), 可能存在一些独特的生物活性^[3]. Sayes 等^[4]发现, 紫外照射的纳米 TiO_2 颗粒比微米级颗粒能产生更多的活性氧. 在多种理化性质中, 粒径越小, 比表面积越大, 也越可能与机体发生反应^[5,6]. 不同的表面修饰如涂层、二次包覆等也能改变纳米 TiO_2 的活性, 如疏醇催

引用格式: 傅伊婧, 黄超, 巴乾, 王慧. 食品中纳米二氧化钛的毒性效应及机制研究进展. 中国科学: 化学, 2016, 46: 263–267

Fu YJ, Huang C, Ba Q, Wang H. Review on the toxicological effects and molecular mechanisms of nano titanium dioxide in food. *Sci Sin Chem*, 2016, 46: 263–267, doi: 10.1360/N032015-00212

化聚合物修饰后的纳米 TiO_2 毒性降低^[7,8]。此外,不同晶型的效应也不同,Xue 等^[9]发现锐钛矿比金红石纳米 TiO_2 的毒性更大。

3 纳米 TiO_2 在食品中的应用

近年来,食品行业越来越多地使用纳米 TiO_2 作为食品添加剂、食品包装或饮食辅料^[10,11]。欧盟将 TiO_2 列为食品着色剂,我国将 TiO_2 作为增白剂可直接掺入面粉中。虽然美国食品药品监督管理局(FDA)要求 TiO_2 在食品中用量不得超过食品总量的 1%,我国也规定了不同的限量范围(0.05%~1%),但目前都缺乏专门针对颗粒形态和粒径的限量规定。2012 年,Weir 等^[12]研究发现,糖果、口香糖和蛋糕等甜食类副食品中含有高剂量纳米 TiO_2 颗粒,约 1/3 颗粒的粒径处于纳米尺度。由于纳米 TiO_2 独特的生物活性,人们越来越关注食品中纳米 TiO_2 对人体的潜在危害^[13,14],然而目前仍缺乏足够的流行病学数据。

4 纳米 TiO_2 的体内代谢

食品中的纳米 TiO_2 主要以经口暴露的方式,由胃肠道吸收进入循环系统,与血浆蛋白、凝血因子、血小板、红细胞和白细胞等发生作用^[15],后者可能对纳米 TiO_2 的分布、代谢、排泄产生影响^[16]。纳米 TiO_2 分布于不同的组织和器官^[17],有研究表明,纳米 TiO_2 在体内的分布为肝>肾>脾>肺>脑>心^[18];而另一研究发现,纳米 TiO_2 在脾中聚积最多,肝、肾、肺逐次递减^[19];此外也有研究表明,纳米 TiO_2 能进入中枢神经系统^[20]。然而这些研究采用的浓度大大超过了预期的现实暴露水平,此外人体中的吸收暴露情况也不明确,因此纳米 TiO_2 的体内分布情况仍需进一步研究。纳米 TiO_2 的排泄主要有两种方式:肾脏/尿液排出和胆汁/粪便排泄。大部分摄入的 TiO_2 通过肾脏从尿液排出^[19,21],而未被肠上皮吸收的纳米 TiO_2 以及肝中的纳米颗粒可经胆汁进入粪便排出体外^[22]。一般而言,纳米 TiO_2 的吸收、分布、代谢和排泄受到颗粒直径、聚集度等多种因素的影响。高浓度暴露的纳米 TiO_2 会分布在肝、脾、肾、淋巴、脑等脏器和组织,且能穿过血脑屏障和胎盘屏障^[23]。纳米 TiO_2 可通过肾/尿和胆汁/粪便两种途径排泄,虽然大

量纳米 TiO_2 会迅速地排出,但体内仍会有部分留存。

5 纳米 TiO_2 毒性效应

纳米 TiO_2 的毒性研究主要集中在体外实验、细胞实验和动物模型实验等层面。食品纳米主要以膳食摄入的方式经口暴露,经消化道上皮吸收后进入循环系统,甚至穿透生物膜屏障在体内组织和器官中蓄积,改变机体器官功能,产生潜在的毒性效应。

5.1 急性毒性

动物实验表明,纳米 TiO_2 单次暴露虽不造成动物体重降低或死亡,但能改变一些机体血液生化指标,如造成反映肝肾功能和心肌损伤的指标升高^[24,17],说明纳米 TiO_2 具有一定的急性毒性。细胞实验方面,用纳米 TiO_2 处理红细胞可造成红细胞发生不正常的沉积、凝聚和剂量依赖性溶血^[25],纳米 TiO_2 暴露于鼠源巨噬细胞(Ana-1 和 MH-S 细胞)可产生活性氧(reactive oxidative species, ROS)从而发挥一定的低毒性作用^[26]。Qi 等^[27]研究发现,25 和 80 nm TiO_2 会抑制肺成纤维细胞的间隙连接。此外,还有一些体外实验表明,纳米 TiO_2 对循环系统细胞的毒性作用,如用纳米 TiO_2 处理循环成血管细胞会加速细胞凋亡,增强氧化^[28]。

5.2 亚急性毒性

用 500 mg/kg 的纳米 TiO_2 连续饲喂雄鼠 21 d,可导致雄鼠大脑、红细胞和肝脏中 ROS 增强,且大脑皮层中多巴胺和去甲肾上腺素升高,这表明亚急性暴露纳米 TiO_2 可产生神经毒性^[29]。Bu 等^[30]以不同浓度的纳米 TiO_2 进行亚急性毒性实验,发现纳米 TiO_2 对大鼠的能量和氨基酸代谢有干扰作用,对肝脏、心肌等功能也有影响。这些亚急性毒性研究结果表明,纳米 TiO_2 可能具有损伤神经及肝脏等器官的毒性,干扰机体代谢,导致发生炎症。在生殖毒性方面,研究发现孕鼠产前暴露纳米 TiO_2 可导致后代生殖器和脑神经系统损伤^[31],成年斑马鱼暴露于高浓度(1.0 mg/L)纳米 TiO_2 14 d 后,其生产的可存活胚胎数量少于低浓度(0.1 mg/L)暴露组^[32]。

5.3 亚慢性毒性

Hu 等^[33]用纳米 TiO_2 (5 nm, 0、5、10、50 mg/kg)

持续 60 d 给小鼠灌胃, 发现暴露后大脑中有 TiO_2 积聚, 脑组织异常, 脑重量减少, 导致神经系统功能持续改变. 用 Y-迷宫实验测试后, 发现小鼠的空间识别记忆能力受损. 此外, 研究人员还发现, 大脑中的 Ca、Mg、K 等多种元素含量显著变化. 纳米也显著改变了钠泵、 Ca^{2+} -ATP 酶、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶、乙酰胆碱酯酶、一氧化氮合成酶的含量. 一些单胺类神经递质(如 DOPAC、5-HIAA)显著降低, 而乙酰胆碱、谷氨酸盐、一氧化氮含量显著上升, 说明纳米 TiO_2 干扰了机体内神经递质系统、酶、微量元素的平衡. 以上结果表明, 纳米 TiO_2 的亚慢性毒性对机体的损伤可能更大.

5.4 慢性毒性

Sang 等^[34]用纳米 TiO_2 (5~6 nm, 2.5、5、10 mg/kg) 以灌胃的方式进行 90 d 小鼠喂养实验, 发现小鼠慢性脾损伤, 红细胞、血小板、血红蛋白、免疫球蛋白、淋巴细胞(CD3、CD4、CD8、B、NK)数量等显著下降, 且 NF- κ B、TNF- α 、mMIF、IL-1 β 、交叉反应蛋白、IL-2 等炎症细胞因子分泌, 以及 TGF- β 、IFN- γ 、Bax、CYP1A1 等基因表达均增加, 而 Bcl-2 和 Hsp70 表达降低, 表明长期暴露于低浓度纳米 TiO_2 可能引起脾损伤, 降低免疫功能, 发生炎症反应, 增加凋亡相关因子表达及抑制凋亡因子的表达.

大部分毒性测试结果表明, 纳米 TiO_2 在体内外暴露条件下对机体肝、肾、免疫等有一定程度损害, 但仍难以准确评估纳米 TiO_2 的安全性, 一方面是由于缺乏人群的研究数据, 一方面则是因为纳米 TiO_2 颗粒在体内环境中的状态存在不确定性, 如在胃液中会形成凝聚体(>100 nm)^[35], 这些凝聚体结构不稳定, 又可能分散成不规则大小的凝聚体或颗粒, 从而增加了准确评估纳米 TiO_2 毒性的难度.

6 纳米 TiO_2 的毒性机制

6.1 诱发氧化损伤

当纳米 TiO_2 颗粒经血液循环和淋巴循环进入组织后, 由于其具有超微结构, 能够直接穿透细胞膜, 甚至穿透核膜进入细胞核干扰稳态. 纳米 TiO_2 颗粒进入细胞后, 引起氧化应激, ROS 水平以剂量和时间依赖方式升高, ROS 清道夫和抗氧化酶水平降低^[36].

ROS 会引起蛋白、脂质及 DNA 非选择性损伤, 导致膜和细胞器功能损伤. 纳米颗粒可以与细胞膜作用产生 ROS, 引起细胞膜破裂. 研究发现, 纳米 TiO_2 颗粒处理后胞内 Ca^{2+} 上升, 乳酸脱氢酶(LDH)泄露至胞外, 说明纳米 TiO_2 损伤细胞膜^[37,38]. 体内研究发现, 纳米 TiO_2 处理导致组织线粒体损伤, 表现为线粒体膜电位降低, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)水平不足, 5'-二磷酸腺苷(ADP)低磷酸化, ROS 聚集增多^[39]. ROS 的聚集也可能伴随着活性氮(reactive nitrogen species, RNS)的产生, 如过氧亚硝基阴离子 ONOO^- (由 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 NO 迅速结合生成)^[40], 进一步造成氧化性损伤.

6.2 诱导炎症发生

许多研究表明, 纳米 TiO_2 暴露会引起炎症反应, 使相关信号通路发生变化, 影响细胞生长. 细胞因子在炎症发生和抗炎过程中变化显著, 是炎症反应的标志. 研究发现, 纳米 TiO_2 暴露导致 IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-18 等细胞因子升高和肺部炎症^[41]; 还有研究显示, 纳米 TiO_2 颗粒会导致肺部炎症和上皮细胞增殖^[42]. BAL 细胞暴露纳米 TiO_2 后会增强嗜中性粒细胞流, 导致巨噬细胞内炎症信号分子如 IL-1 β 、TNF- α 、MIP-2 的分泌及 mRNA 水平升高^[43]. 此外, 有研究显示, 纳米 TiO_2 能诱使肥大细胞分泌组胺, 通过激活膜上 L-型 Ca^{2+} 通道, 诱导 ROS 产生, 激活 PLC 活性^[44]. 胞外 Ca^{2+} 流增加与 IP3-IP3 受体通道结合会触发内质网 Ca^{2+} , 随后释放组胺. 因此纳米 TiO_2 能绕过传统的抗原-免疫激活途径, 直接触发炎症介质.

6.3 相关信号通路变化

纳米 TiO_2 能影响多种信号通路中关键蛋白的表达及活性. 研究发现, 纳米 TiO_2 能激活 p53、JNK、c-Src、p38 MAPK 和 NF- κ B 等信号通路. P53 和 JNK 通路的激活以及凋亡相关基因(Bax、caspase 3、caspase 9 等)介导纳米 TiO_2 引起的 G2/M 期细胞周期阻滞和细胞凋亡^[26]. ROS 增强会导致强 p38-Nrf-2 信号通路中的 HO-1 显著表达^[45], 增加胞外 ROS 与 HO-1 的结合, 促进 NOS mRNA 表达和 TNF- α 的释放^[46]. 而 NF- κ B、TNF- α 、p38 MAPK 等信号通路的激活及其诱导的 IL 家族细胞因子则主要参与了纳米 TiO_2 诱导炎症发生过程.

7 总结

总的来讲, 与微米级 TiO_2 颗粒相比, 食品中的纳米 TiO_2 由于不同的理化性质而具有更高毒性。纳米 TiO_2 通过消化道吸收进入血液循环和淋巴循环, 分布到不同器官, 可能使肝、肾、脾、脑或生殖发育系统发生局部病理改变。目前, 对纳米 TiO_2 毒性的研究主要集中于动物实验或体外细胞实验, 发现其在组织器官中的长时间积聚更易产生细胞结构破坏、

ROS 形成、炎症发生和细胞信号通路改变等不良健康效应。然而, 高剂量动物或细胞实验所得结果不足以证明在正常暴露条件下对人体的损伤作用, 因此为了明确其毒性效应, 未来的研究需要将细胞以及动物实验的结果与日常膳食摄入纳米 TiO_2 的人群数据相结合, 进行综合评估, 并能进一步建立标准化的评估策略和导则, 从而为食品领域中纳米 TiO_2 的安全性评估和合理使用提供更加可靠的科学依据。

参考文献

- 1 Bahadar H, Maqbool F, Niaz K, Abdollahi M. *Iran Biomed J*, 2015, 20: 1–11
- 2 Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao JS. *Part Fibre Toxicol*, 2013, 10: 15
- 3 高国栋. 纳米二氧化钛暴露致小鼠生殖毒性及其基因表达的变化. 博士学位论文, 苏州: 苏州大学, 2013
- 4 Sayes CM, Wahi R, Kurian PA, Liu Y, West JL, Ausman KD, Warheit DB, Colvin VL. *Toxicol Sci*, 2006, 92: 174–185
- 5 Andersson PO, Lejon C, Ekstrand-Hammarström B, Akfur C, Ahlinder L, Bucht A, Osterlund L. *Toxicology*, 2011, 7: 514–523
- 6 Wang C, Li Y. *Sci Total Environ*, 2012, 429: 156–160
- 7 Tedja R, Lim M, Amal R, Marquis C. *ACS Nano*, 2012, 6: 4083–4093
- 8 Saber AT, Jensen KA, Jacobsen NR, Birkedal R, Mikkelsen L, Møller P, Loft S, Wallin H, Vogel U. *Nanotoxicology*, 2012, 6: 453–471
- 9 Xue C, Wu J, Lan F, Liu W, Yang X, Zeng F, Xu H. *J Nanosci Nanotechnol*, 2010, 10: 8500–8507
- 10 Rajakumar G, Rahuman AA, Roopan SM, Chung IM, Anbarasan K, Karthikeyan V. *Parasitol Res*, 2015, 114: 571–581
- 11 Kruger K, Cossais F, Neve H, Klemp M. *J Nanopart Res*, 2014, 16: 2402
- 12 Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, von Goetz N, Hristovski K, von Goetz N. *Environ Sci Technol*, 2012, 46: 2242–2250
- 13 Wang Y, Sui K, Fang J, Yao C, Yuan L, Wu Q, Wu M. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 171: 1568–1577
- 14 Tilly TB, Kerr LL, Braydich-Stolle LK, Schlager JJ, Hussain SM, Kerr LL. *J Nanopart Res*, 2014, 16: 2695
- 15 Deng ZJ, Mortimer G, Schiller T, Musumeci A, Martin D, Minchin RF. *Nanotechnology*, 2009, 20: 455101
- 16 Hagens WI, Oomen AG, de Jong WH, Cassee FR, Sips AJ. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2007, 49: 217–229
- 17 Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z. *Toxicol Lett*, 2007, 168: 176–185
- 18 Liu H, Ma L, Zhao J, Liu J, Yan J, Ruan J, Hong F. *Biol Trace Elem Res*, 2009, 129: 170–180
- 19 Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G. *J Appl Toxicol*, 2009, 29: 330–337
- 20 Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. *Toxicology*, 2008, 254: 82–90
- 21 World Health Organization (WHO). Environmental health criteria 24-titanium. In: *International Programme on Chemical Safety*. Geneva: World Health Organization, 1982
- 22 Huggins CB, Froehlich JP. *J Exp Med*, 1966, 124: 1099–1106
- 23 Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, Diener PA, Zisch A, Krug HF, von Mandach U. *Environ Health Perspect*, 2010, 118: 432–436
- 24 Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM. *Toxicol Lett*, 2007, 171: 99–110
- 25 Li SQ, Zhu RR, Zhu H, Xue M, Sun XY, Yao SD, Wang SL. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 3626–3631
- 26 Zhang J, Song W, Guo J, Zhang J, Sun Z, Li L, Ding F, Gao M. *Toxicol Ind Health*, 2012, 29: 523–533
- 27 祁琨, 邓芙蓉, 郭新彪. 北京大学学报(医学版), 2009, 41: 297–301
- 28 Spigoni V, Cito M, Alinovi R, Pinelli S, Passeri G, Zavaroni I, Goldoni M, Campanini M, Aliatis I, Mutti A, Bonadonna RC, Dei Cas A. *PLoS One*, 2015, 24: 1–15
- 29 Shrivastava R, Raza S, Yadav A, Kushwaha P, Flora SJ. *Drug Chem Toxicol*, 2014, 37: 336–347
- 30 Bu Q, Yan G, Deng P, Peng F, Lin H, Xu Y, Cao Z, Zhou T, Xue A, Wang Y, Cen X, Zhao YL. *Nanotechnology*, 2010, 21: 125105
- 31 Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabota M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M. *J Health Sci*, 2009, 55: 95–102

- 32 Ramsden CS, Henry TB, Handy RD. *Aquat Toxicol*, 2013, 126: 404–413
- 33 Hu R, Gong X, Duan Y, Li N, Che Y, Cui Y, Zhou M, Liu C, Wang H, Hong F. *Biomaterials*, 2010, 31: 8043–8050
- 34 Sang X, Zheng L, Sun Q, Li N, Cui Y, Hu R, Gao G, Cheng Z, Cheng J, Gui S, Liu H, Zhang Z, Hong F. *J Biomed Mater Res A*, 2012, 100: 894–902
- 35 Jones K, Morton J, Smith I, Jurkschat K, Harding AH, Evans G. *Toxicol Lett*, 2015, 233: 95–101
- 36 Waris G, Ahsan H. *J Carcinogen*, 2006, 14: 1–8
- 37 Wu J, Sun J, Xue Y. *Toxicol Lett*, 2010, 199: 269–276
- 38 Yu KN, Chang SH, Park SJ, Lim J, Lee J, Yoon TJ, Kim JS, Cho MH. *PLoS One*, 2015, 10: 1–17
- 39 Freyre-Fonseca V, Delgado-Buenrostro NL, Gutiérrez-Cirlos EB, Calderón-Torres CM, Cabellos-Avelar T, Sánchez-Pérez Y, Pinzón E, Torres I, Molina-Jijón E, Zazueta C, Pedraza-Chaverri J, García-Cuellar CM, Chirino YI. *Toxicol Lett*, 2011, 202: 111–119
- 40 Huang KT, Wu CT, Huang KH, Lin WC, Chen CM, Guan SS, Chiang CK, Liu SH. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28: 354–364
- 41 Gui S, Zhang Z, Zheng L, Cui Y, Liu X, Li N, Sang X, Sun Q, Gao G, Cheng Z, Cheng J, Wang L, Tang M, Hong F. *J Hazard Mater*, 2011, 195: 365–370
- 42 Dankovic D, Kuempel E, Wheeler M. *Inhal Toxicol*, 2007, 19(Suppl.1): 205–212
- 43 Moon C, Park HJ, Choi YH, Park EM, Castranova V, Kang JL. *J Toxicol Environ Health*, 2010, 73: 396–409
- 44 Chen EY, Garnica M, Wang YC, Mintz AJ, Chen CS, Chin WC. *Part Fibre Toxicol*, 2012, 9: 2
- 45 Wang J, Li N, Zheng L, Wang S, Wang Y, Zhao X, Duan Y, Cui Y, Zhou M, Cai J, Gong S, Wang H, Hong F. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 140: 186–197
- 46 Scherbart AM, Langer J, Bushmelev A, van Berlo D, Haberzettl P, van Schooten FJ, Schmidt AM, Rose CR, Schins RP, Albrecht C. *Part Fibre Toxicol*, 2011, 8: 31

Review on the toxicological effects and molecular mechanisms of nano titanium dioxide in food

Yijing Fu, Chao Huang, Qian Ba, Hui Wang*

Institute for Nutritional Sciences, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences; CAS Key Laboratory of Food Safety Research (under construction); Shanghai Institute for Biological Sciences Branch of China National Center for Food Safety Risk Assessment, Shanghai 200031, China

*Corresponding author (email: huiwang@sibs.ac.cn)

Abstract: With the development of science and technology, nano titanium dioxide is widely used in food industry, and its biosafety has drawn widespread concerns. This article reviewed the toxicity researches of nano titanium dioxide particles, including the physical and chemical characteristics, toxicity effects and mechanisms. This article will provide scientific support on safety evaluation of nano titanium dioxide and its applications in food industry.

Keywords: nano titanium dioxide, toxicological effects, molecular mechanisms

doi: 10.1360/N032015-00212