

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01091

纳米二氧化钛颗粒体外对人肺腺癌 A549 细胞的毒性效应

李晓林¹, 张艳芳^{1,2}, 唐凯^{1,2}, 汤莹¹, 晋若冰¹, 叶煦亭¹, 金婵¹, 杨勇骥^{1*}

1. 第二军医大学基础部生物物理学教研室, 上海 200433
2. 河南师范大学物理与信息工程学院, 新乡 453007

[摘要] **目的** 探讨不同作用时间下粒径为 25 nm 的锐钛矿型二氧化钛(TiO₂)颗粒对人肺腺癌 A549 细胞的毒性效应。**方法** 将 100 μg/ml 的纳米 TiO₂ 颗粒悬液与 A549 细胞在 37℃、5%CO₂ 的细胞培养箱中分别孵育 1 h、4 h、8 h 和 24 h 后, 收集细胞。通过乳酸脱氢酶(LDH)检测实验检测纳米 TiO₂ 颗粒对细胞膜的损伤情况; 通过 ATP 检测实验检测纳米 TiO₂ 颗粒对线粒体产生的影响; 通过超氧化物歧化酶(SOD)活性检测实验检测纳米 TiO₂ 颗粒对细胞的氧化损伤情况; 采用透射电子显微镜观察纳米 TiO₂ 颗粒引起细胞超微结构的变化; 利用 CCK-8 法检测纳米 TiO₂ 颗粒对细胞存活率的影响。**结果** 随着纳米 TiO₂ 颗粒作用时间的延长, 细胞外液中 LDH 活性增强, 细胞内 ATP 浓度降低, SOD 活性降低, 细胞存活率呈现明显下降($P < 0.05$), 且细胞线粒体和内质网出现不同程度的肿胀和扩张。**结论** 纳米 TiO₂ 颗粒体外能够引起肺腺癌细胞氧化损伤, 抑制细胞生长, 且对细胞的毒性效应存在时间依赖性。

[关键词] 纳米粒子; 二氧化钛; 肺肿瘤; 细胞毒性

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)10-1091-05

Toxic effect of TiO₂ nanoparticles against human lung cancer cell line A549

LI Xiao-lin¹, ZHANG Yan-fang^{1,2}, TANG Kai^{1,2}, TANG Ying¹, JIN Ruo-bing¹, YE Xu-ting¹, JIN Chan¹, YANG Yong-ji^{1*}

1. Department of Biophysics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. College of Physics and Information Engineering, Henan Normal University, Xinxiang 453007, Henan, China

[Abstract] **Objective** To investigate the toxic affects of 25 nm TiO₂ nanoparticles in anatase crystal against human lung cancer cell line A549 after different exposure periods. **Methods** A549 cells were incubated with 100 μg/ml TiO₂ nanoparticle suspension for 1 h, 4 h, 8 h and 24 h at 37°C and 5% CO₂. Then the damage degrees of cell membrane caused by TiO₂ nanoparticle were assessed by LDH assay. ATP assay was used to evaluate the influence of TiO₂ nanoparticle on mitochondria. SOD activity test was used to detect the oxidative damage of the cells caused by TiO₂ nanoparticles. The cellular ultrastructure changes of A549 cells were observed by transmission electron microscopy. CCK-8 assay was performed to evaluate the viability of TiO₂-treated cells after 1 h, 4 h, 8 h and 24 h exposure. **Results** With the prolongation of exposure time, the activity of extracellular LDH was increased and that of SOD was decreased; the concentration of intracellular ATP was reduced and the survival rate of cells was significantly decreased ($P < 0.05$). The mitochondria and endoplasmic reticulum were swollen and expanded to different degrees. **Conclusion** TiO₂ nanoparticles can result in oxidative damage and inhibit the growth of A549 cells, and the effects are in a time-dependent manner.

[Key words] nanoparticles; TiO₂; lung neoplasms; cytotoxicity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(10):1091-1095]

纳米二氧化钛(TiO₂)是一种新型的无机化工材料, 具有很大的比表面积和表面原子数, 独特的表面效应、小尺寸效应、量子尺寸效应及宏观量子隧道效应等使其热、磁、光、敏感特性和表面稳定性等不同

于常规粒子, 因而在涂料、颜料、陶瓷、防晒化妆品、空气净化、污水处理、抗菌除毒、食品包装等方面得到广泛应用^[1-2]。由于与人体接触比较密切, 所以在广泛应用的同时, 它所带来的潜在危害也日益引起

[收稿日期] 2011-02-08 **[接受日期]** 2011-07-19

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2006CB932505), 上海市科学技术委员会纳米专项(0752nm020)。Supported by State Key Development Program for Basic Research of China(2006CB932505) and Special Fund for Nano Research of Shanghai Committee of Science and Technology(0752nm020)。

[作者简介] 李晓林, 硕士生。E-mail: Lucylixiaolin@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81870923, E-mail: yjyang22@163.com

人们的广泛关注,尤其是粒径为 25 nm 左右的 TiO₂ 颗粒,通过呼吸道进入人体后约 50% 左右首先会沉积在肺泡中^[3],之后才会穿透肺部组织的细胞膜进入循环系统,纳米颗粒在肺部沉积,可能引起严重的上皮细胞增生、肺部纤维化、肺部炎症及肺部肿瘤等^[4-6];微观上还能损害细胞膜^[7-8],扰乱细胞周期^[9],诱导氧化应激,抑制细胞生长,导致细胞凋亡^[10]。因此,目前对纳米 TiO₂ 毒性的研究多集中在被肺吸收的粒径为 25 nm 左右的纳米 TiO₂ 上。

尽管纳米 TiO₂ 的生物学效应已有上述的相关报道,但研究还不够深入,有关纳米 TiO₂ 对人体的影响是否具有明显的时间依赖性,还有待进一步探讨。因此,本实验选用 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒作为实验材料,以容易培养且对外加作用因子较为敏感的肺腺癌 A549 细胞^[11]为研究对象,探讨 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒体外作用的时间效应,为纳米 TiO₂ 材料的安全使用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂及仪器 A549 细胞购于武汉大学中国典型培养物保藏中心;25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒购于 Sigma 公司;MEM 培养基购于吉诺生物医药技术有限公司;新生小牛血清购于上海微科生化试剂有限公司;胰蛋白酶购于上海博光生物科技有限公司;血浆由上海长海医院血站提供;LDH 检测试剂盒购于上海杰美基因医药科技有限公司;ATP 检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所以;CCK-8 试剂盒购于碧云天生物技术研究所以;数控超声波仪为昆山超声仪器公司产品(型号 KQ-300DB);超薄切片机为德国 Leica 公司产品(型号 UC-6);透射电子显微镜为日本 Hitachi 公司产品(型号 H-7650);酶联免疫检测仪为 Bio-Rad 公司产品(型号 Model 500);多功能酶标仪为 Biotec 公司产品(型号 Synergy2)。

1.2 A549 细胞的培养 用含 10% 新生小牛血清的 MEM 培养基,在 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养 A549 细胞。待细胞生长至约 70% 时,用 0.25% 胰酶消化,然后接种于直径为 10 cm 的培养皿中,待细胞生长至对数期时进行实验。

1.3 纳米 TiO₂ 颗粒与 A549 细胞共培养 锐钛矿型纳米 TiO₂ 颗粒,120℃ 高温灭菌 2 h 后,配成 1 mg/ml 的母液,用数控超声波仪在功率为 300 W、25℃ 的条件下超声 10 min,连续 3 次^[12],然后用无血清的 MEM 细胞培养液配成终浓度为 100 μg/ml 的纳米 TiO₂ 颗粒悬液,将其加入到培养皿中与 A549 细胞在 37℃ 细胞培养箱中共孵育,孵育时间分

别为 1 h、4 h、8 h 和 24 h,以不加纳米颗粒的细胞为对照。

1.4 细胞膜损伤的检测 采用 LDH 比色法检测细胞膜损伤。将处于对数生长期的 A549 细胞接种于 96 孔培养板中,待细胞贴壁生长后,每孔加入 100 μl 终浓度为 100 μg/ml 的纳米 TiO₂ 颗粒悬液与 A549 细胞在 37℃ 细胞培养箱中分别共孵育 1 h、4 h、8 h 和 24 h,以不加纳米颗粒的细胞为对照。培养规定的时间后,按照试剂盒的说明进行操作,用酶标仪在 490 nm 波长处测定光密度(D)值,D 值越大,细胞膜损伤越严重。

1.5 线粒体损伤的检测 采用 ATP 浓度检测法来检测线粒体的损伤情况。待 A549 细胞生长至对数生长期,将其接种于 6 孔培养板中,细胞贴壁生长后,每孔均加入 2 ml 浓度为 100 μg/ml 的锐钛矿型纳米 TiO₂ 颗粒悬浮液与 A549 细胞在 37℃ 细胞培养箱中分别培养 1 h、4 h、8 h 和 24 h,以不加纳米颗粒的细胞为对照。培养规定的时间后,按照 ATP 检测试剂盒说明进行操作,使用 Biotec 多功能酶标仪对结果进行检测。

1.6 超氧化物歧化酶(SOD)活力的检测 采用氮蓝四唑(NBT)显色法检测染毒后 A549 细胞内 SOD 的活力,反应液蓝色愈深,说明 SOD 活性愈低,反之则愈高。待 A549 细胞生长至对数生长期时,将其接种于 6 孔细胞培养板中,细胞贴壁生长后,每孔均加入 2 ml 浓度为 100 μg/ml 的锐钛矿型纳米 TiO₂ 颗粒悬浮液与 A549 细胞在 37℃ 细胞培养箱中分别培养 1 h、4 h、8 h 和 24 h,以不加纳米颗粒的细胞为对照。培养规定时间后,采用细胞裂解液裂解细胞,4℃ 离心取上清作为待测样品,然后按照试剂盒说明进行操作,用酶标仪在 560 nm 处测定光密度值。

1.7 细胞超微结构的观察 将染毒后的 A549 细胞用 0.1 mol/L PBS 洗涤 3 次,然后用 0.25% 胰酶消化收集,加入 4% 多聚甲醛,4℃ 固定过夜。固定后的 A549 细胞离心弃固定液,0.1 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 15 min,最后加入血浆离心,弃上清,再加入 3% 戊二醛使细胞凝块,4℃ 过夜。将凝块后的细胞切成 1 mm³ 的小块,再用 0.1 mol/L PBS 充分漂洗,饿酸固定 2 h 后,梯度乙醇、丙酮脱水,浸透,环氧树脂包埋,超薄切片机切片,经醋酸铀-枸橼酸铅染色后,在透射电镜下观察细胞超微结构。

1.8 细胞存活率的检测 采用 CCK-8 法检测染毒后 A549 细胞的存活率,活细胞的数量与测得的 D 值成正比。对数生长期的 A549 细胞用 0.25% 胰酶消化后,用 MEM 培养液配制细胞悬液,调整细胞密度为 5×10⁴/ml 接种于 96 孔板,37℃ 恒温培养至对

数期进行实验。对照组每孔加入 100 μl 的无血清 MEM 培养液, 实验组每孔加入 100 μl 的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的锐钛矿型纳米 TiO_2 颗粒悬浮液, 分别培养 1 h、4 h、8 h 和 24 h 后加入 CCK-8 溶液 10 $\mu\text{l}/\text{孔}$, 继续培养 1 h 后用酶标仪在 490 nm 处测量各孔的 D 值。同时设置调零孔(培养液、CCK-8 溶液)和对照孔(细胞、培养液、CCK-8 溶液), 每组设定 5 个复孔。

1.9 统计学处理 采用 t 检验和单因素方差分析对实验数据进行统计学处理, 检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 锐钛矿型纳米 TiO_2 颗粒在无血清 MEM 中的分散状态 25 nm 锐钛矿型 TiO_2 颗粒在无血清 MEM 中经超声分散后, 分散状况良好(图 1)。25 nm TiO_2 颗粒的比表面积为 200 m^2/g , 如此大的比表面积易在培养基中重新团聚。因此, 解聚后 TiO_2 颗粒应立即使用, 以保证其良好的分散状态。同时, 该过程也可能导致活性氧(ROS)的产生^[13-14], 会对细胞产生一定的影响。

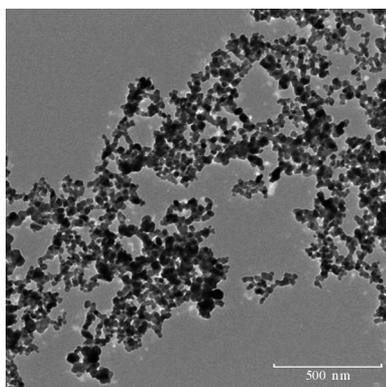


图 1 锐钛矿型纳米 TiO_2 颗粒在无血清 MEM 中的分散状态

Fig 1 TEM image of the anatase TiO_2 NPs dispersed in serum-free MEM
Bar=500 nm

2.2 锐钛矿型纳米 TiO_2 颗粒对细胞膜的影响 乳酸脱氢酶(LDH)是胞质的标志酶, 细胞正常时不能释出, 只有细胞膜受损后才被释出, 细胞外液中 LDH 活性是反映细胞膜损伤的较敏感指标。LDH 实验检测结果(图 2A)表明: 随着纳米 TiO_2 作用时间的延长, 测得的 D 值逐渐增大, 表明细胞外液中 LDH 的活性逐渐升高。由此说明, 随着纳米 TiO_2 作用时间的延长, 其对 A549 细胞膜的损伤程度逐渐增大。

2.3 锐钛矿型纳米 TiO_2 颗粒对线粒体的影响 线粒体是细胞内能量供应的动力工厂, 能为机体提供

生命活动所必需的大量 ATP, ATP 水平的下降表明线粒体的功能受损或下降。对各实验组 A549 细胞中 ATP 浓度的检测结果显示, 随着纳米 TiO_2 作用时间的延长, ATP 的浓度逐渐降低(图 2B)。

2.4 锐钛矿型 TiO_2 颗粒对细胞中 SOD 活力的影响 SOD 活力的检测结果显示(图 2C): 随着纳米 TiO_2 作用时间的延长, SOD 活力逐渐降低。由此说明, 纳米 TiO_2 颗粒能够导致 A549 细胞的氧化损伤, 且随着纳米 TiO_2 作用时间的延长, 对细胞的氧化损伤逐渐加剧。

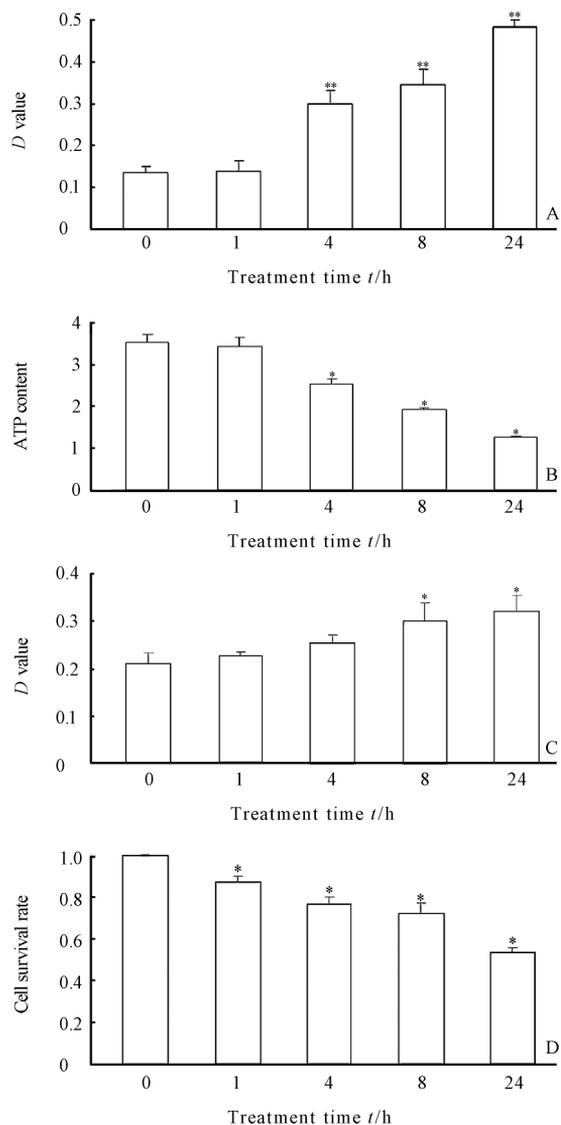


图 2 纳米 TiO_2 作用不同时间对 A549 细胞产生的影响

Fig 2 The effect of TiO_2 nanoparticles on A549 cells after different treatment periods

A: Damage of cell membrane detected by LDH colorimetric assay; B: Effect of TiO_2 nanoparticles on ATP production at different incubation time points; C: Effect of TiO_2 nanoparticles on SOD activity at different incubation time points; D: Survival rate of A549 cells after treatment with TiO_2 nanoparticles for different periods. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; $n=5$, $\bar{x} \pm s$

2.5 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒对细胞超微结构的影响 不同作用时间下 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒对 A549 细胞超微结构作用的 TEM 图像如图 3 所示。对照组中 A549 细胞形态完整,细胞表面有大量突起,细胞内线粒体丰富,嵴清晰可见(图 3A)。经 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒作用 1 h 后,A549 细胞伸出伪足将纳米 TiO₂ 颗粒包裹,吞噬的 TiO₂ 纳米颗粒成簇分布于细胞质中,部分颗粒无膜包裹,线粒体轻度肿胀,仍可见少量嵴,少量内质网扩张(图 3B);

经 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒作用 4 h 后,内质网明显扩张,部分溶酶体中可见少量纳米 TiO₂ 颗粒(图 3C);经 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒作用 8 h 后,少量纳米 TiO₂ 颗粒进入部分线粒体,线粒体肿胀,嵴溶解现象严重(图 3D);经 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒作用 24 h 后,较多溶酶体中可见大量纳米 TiO₂ 颗粒,细胞中出现电子密度很高的团状结构,有些有膜包裹,有些没有(图 3E)。

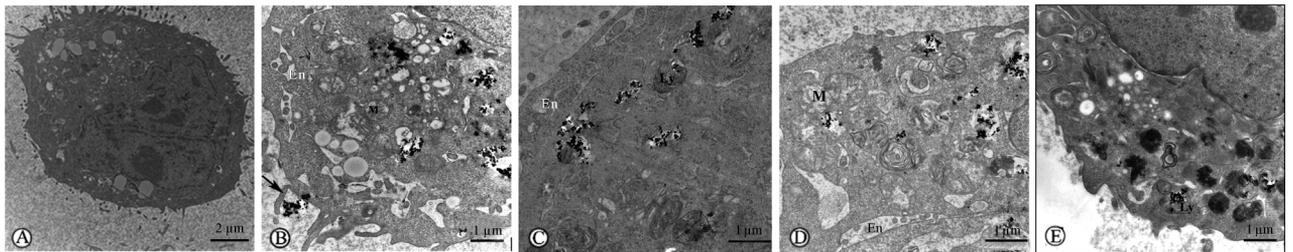


图 3 不同作用时间下 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒对 A549 细胞超微结构的影响

Fig 3 TEM image of A549 cells after exposure to TiO₂ nanoparticles for different time periods

A: In control group, cells were with intergraded shape and abundant mitochondria; the cristae was distinct(Bar=2 μm). B: In 1 h group, TiO₂ nanoparticles were wrapped by cell pseudopia(↑); the mitochondria(M) was a little dilated with some endoplasmic reticulum(En) stretched(Bar=1 μm). C: In 4 h group, the endoplasmic reticulum(En)stretched obviously and a small amount of TiO₂ nanoparticles entered into lysosome(Ly)(Bar=1 μm); D: In 8 h group, the crista of mitochondria(M) dissolved severely,the endoplasmic reticulum(En) stretched obviously(Bar=1 μm);E: In 24 h group, a large number of TiO₂ nanoparticles entered into lysosome(Ly), and higher electron density materials appeared in cells in bulk(Bar=1 μm)

2.6 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒对细胞存活率的影响 CCK-8 实验结果(图 2D)显示:随着纳米 TiO₂ 颗粒作用时间的延长,细胞存活率逐渐降低。当 25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒作用 24 h 后,A549 细胞的存活率降为 0.54。

3 讨论

随着纳米 TiO₂ 颗粒在工业、电子、化妆品及食品等领域的广泛应用,它的生物学效应也日渐受到关注。锐钛矿型纳米 TiO₂ 颗粒具有高化学活性,易以各种途径进入细胞,并与细胞内的亚细胞结构(如线粒体、溶酶体、细胞核等)发生作用^[15],从而对细胞的超微结构造成损伤,甚至引起细胞凋亡^[16]。本实验以 A549 细胞为研究对象,探讨随着作用时间的延长,25 nm 锐钛矿型 TiO₂ 颗粒对细胞膜通透性、线粒体功能、细胞超微结构、细胞存活率等方面造成的影响。

细胞膜是分隔细胞内外的物理屏障,其完整性对于维持细胞的正常生理功能具有重要作用。纳米 TiO₂ 颗粒对细胞的影响最是从攻击细胞膜开始的。本实验中 LDH 检测结果表明随着纳米 TiO₂ 作用时间的延长,细胞膜的损伤程度加剧。纳米

TiO₂ 颗粒吸附在细胞膜上时会氧化组成细胞膜的脂质分子^[17]和蛋白质^[18],导致细胞膜结构受损或通透性增加,从而对细胞的生存造成损害。本实验中 CCK-8 实验结果也证实了细胞的存活率呈现显著下降趋势。

纳米 TiO₂ 颗粒吸附于细胞膜以后,可通过胞吞方式进入细胞,从而可能导致细胞中的细胞器出现一些损伤性变化,尤其是线粒体的变化状况对细胞具有重要的影响。线粒体作为细胞内能量供应的动力工厂,不仅是机体所必需的大量 ATP 的主要来源,而且是细胞进行生物氧化和能量转换的主要场所,在正常生理状态下,大约有 2%~30%的氧被从线粒体电子传递链中漏出的电子还原产生超氧阴离子,并经歧化作用产生过氧化氢^[19]。因此,可以说线粒体是体内 ROS 的主要来源之一。本研究由电镜观察可知:纳米 TiO₂ 颗粒进入细胞后,随着时间的推移,线粒体的嵴逐渐消失,甚至出现空泡化;ATP 检测实验发现:随着纳米 TiO₂ 颗粒作用时间的延长,细胞内 ATP 的浓度逐渐下降,由此表明线粒体的功能也受到损伤。线粒体一旦损伤,电子传递链的活性下降,会产生更多的 ROS^[20-21],使细胞的氧化压力增加,从而会导致细胞的氧化损伤。

本研究通过 SOD 活力检测实验来检测染毒后细胞的氧化损伤情况, 结果显示: 随着纳米 TiO₂ 作用时间的延长, SOD 活力逐渐降低。SOD 作为内源性氧自由基清除剂的代表, 是细胞内一种重要的抗氧化酶, 可以特异性灭活超氧阴离子, 其活力在一定程度上反映了内源性氧自由基的清除活力。实验组 SOD 的活力显著低于对照组, 说明随着纳米 TiO₂ 作用时间的延长, 细胞本身可能受到了氧自由基的损伤, 产生氧化损伤, 使 SOD 清除氧自由基的能力降低。由此证实了纳米 TiO₂ 颗粒引起的氧化损伤可能是纳米颗粒产生细胞毒性的主要原因之一。

综上所述, 随着作用时间的增加, 锐钛矿型纳米 TiO₂ 颗粒能导致 A549 细胞超微结构发生改变, 细胞膜的通透性增加, 线粒体功能下降, 且使细胞产生大量的 ROS, 造成细胞氧化损伤, 从而导致细胞存活率下降。且锐钛矿型纳米 TiO₂ 颗粒对细胞的影响存在时间依赖性。

[参 考 文 献]

- [1] Guarino M, Costa A, Porro M. Photocatalytic TiO₂ coating to reduce ammonia and greenhouse gases concentration and emission from animal husbandries[J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99: 2650-2658.
- [2] 王江雪, 李 炜, 刘 颖, 劳 芳, 陈春英, 樊瑜波. 二氧化钛纳米材料的环境健康和生态毒理效应[J]. *生态毒理学报*, 2008, 3: 105-113.
- [3] Nel A. Air pollution-related illness: Effects of particles[J]. *Science*, 2005, 308: 804.
- [4] Nemmar A, Melghit K, Al-Salam S, Zia S, Dhanasekaran S, Attoub S, et al. Acute respiratory and systemic toxicity of pulmonary exposure to rutile Fe-doped TiO₂ nanorods[J]. *Toxicology*, 2011, 279(1-3): 167-175.
- [5] Kobayashi N, Naya M, Endoh S, Maru J, Yamamoto K, Nakanishi J. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results[J]. *Toxicology*, 2009, 264(1-2): 110-118.
- [6] Li N, Xia T, Nel A E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in toxicity of engineered nanoparticles[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44: 1689-1699.
- [7] Di Virgilio A L, Reigosa M, Arnal P M, Fernández Lorenzo de Mele M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells [J]. *J Hazard Mater*,

2010, 177(1-3): 711-718.

- [8] Braydich-Stolle L K, Schaeublin N M, Murdock R C, Jiang J K, Biswas P, Schlager J J, et al. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO₂ nanotoxicity[J]. *J Nanopart Res*, 2009, 11: 1361-1374.
- [9] Ding L, Stilwell J, Zhang T, Elboudwarej O, Jiang H, Selegue J P, et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast[J]. *Nano Lett*, 2005, 5: 2448- 2464.
- [10] Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis[J]. *Toxicol Lett*, 2006, 160: 121-126.
- [11] Bitterle E, Karg E, Schroepel A, Kreyling W G, Tippe A, Ferron G A, et al. Dose-controlled exposure of A549 epithelial cells at the air-liquid interface to airborne ultrafine carbonaceous particles[J]. *Chemosphere*, 2006, 65: 1784-1790.
- [12] 汤 莹, 羊富光, 杨勇骥, 于 洋, 雷长海, 范晓燕, 等. 二氧化钛纳米颗粒解聚方法[J]. *解剖学杂志*, 2009, 32: 632-634.
- [13] Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nano level [J]. *Science*, 2006, 311: 622-627.
- [14] Xia T, Kovochich M, Brant J, Hotze M, Sempf J, Oberley T. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm[J]. *Nano Lett*, 2006, 6: 1794-1807.
- [15] 王 燕, 康现江, 穆淑梅. 纳米二氧化钛的毒理学研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2008, 22: 77-80.
- [16] Gurr J R, Wang A S, Chen C H, Jan K Y. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells[J]. *Toxicology*, 2005, 213(1-2): 66-73.
- [17] Pan Y, Neuss S, Leifert A, Fischler M, Wen F, Simon U, et al. Size-dependent cytotoxicity of gold nanoparticles [J]. *Small*, 2007, 3: 1941-1949.
- [18] Lyon D Y, Alvarez P J. Fullerene water suspension (nC(60)) exerts antibacterial effects via ROS-independent protein oxidation[J]. *Environ Sci Technol*, 2008, 42: 8127-8132.
- [19] Cadenas E, Davies K J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29: 222-230.
- [20] Jin C, Tang Y, Yang F G, Li X L, Xu S, Fan X Y, et al. Cellular toxicity of TiO₂ nanoparticles in anatase and rutile crystal phase [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2011, 141(1-3): 3-15.
- [21] Shukla R K, Sharma V, Pandey A K, Singh S, Sultana S, Dhanwan A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25: 231-241.

[本文编辑] 贾泽军