

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00869

纳米级二氧化钛对体外大鼠腔前卵泡生长发育成熟的影响

侯娟, 万旭英, 王飞, 许桂凤, 刘珍, 张天宝*

第二军医大学基础部卫生毒理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 采用大鼠腔前卵泡体外培养方法研究纳米级二氧化钛(TiO_2)对大鼠卵泡发育及卵母细胞成熟的影响, 揭示纳米 TiO_2 有无雌性生殖毒性, 为其安全性评价提供依据。 **方法:** 机械性分离大鼠腔前卵泡, 单个卵泡在 96 孔板中连续培养。将卵泡随机分为 5 组: 3 个 25 nm TiO_2 (12.5、25 和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组、阴性对照组、微米级 TiO_2 对照组。培养第 10 天诱导排卵, 观察卵泡发育和卵母细胞成熟情况。 **结果:** 随着纳米级 TiO_2 剂量增加, 卵泡存活率、有腔形成率及卵丘-卵母细胞复合体(COCs) 排出率呈下降趋势 ($P < 0.05$); 与阴性对照组相比, 微米级 TiO_2 组对卵泡发育与卵母细胞成熟无明显影响; 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上剂量纳米级 TiO_2 组卵泡形态学明显异常, 卵泡存活率及有腔形成率明显下降; 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 纳米级 TiO_2 可使处于成熟阶段的卵母细胞数减少。 **结论:** 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量以上 25 nm TiO_2 可以抑制体外大鼠腔前卵泡的生长发育与卵母细胞成熟, 而微米级 TiO_2 在相同剂量下对卵泡的生长发育和卵母细胞的成熟无明显影响。提示纳米级 TiO_2 有不同于微米级 TiO_2 的毒作用性质, 可能有雌性生殖毒性, 应引起关注。

[关键词] 卵泡; 卵母细胞; 纳米级二氧化钛; 毒性试验

[中图分类号] R 965.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)08-0869-05

Effects of titanium dioxide nanoparticles on development and maturation of rat preantral follicle *in vitro*

HOU Juan, WAN Xu-ying, WANG Fei, XU Gui-feng, LIU Zhen, ZHANG Tian-bao*

Department of Health Toxicology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[ABSTRACT] **Objective:** To study the influence of titanium dioxide nanoparticle (TiO_2) on follicle development and oocyte maturation of rats using *in vitro* rat preantral follicle culture system, so as to know whether TiO_2 can cause female reproductive toxicity and provide evidences for evaluating its safety. **Methods:** Rat ovaries were mechanically dissected to obtain preantral follicles and the individual preantral follicle was cultured in 96-well plates. The study was divided into 5 groups: three 25 nm TiO_2 groups (12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), one negative control group (treated with culture medium), and one micron TiO_2 control group. Ten days after culture, the ovulation was induced and the follicle development and oocyte maturation were observed. **Results:** The survival rate of follicles, formation rate of antral follicles and release rate of cumulus-oocyte cell complexes (COCs) all decreased with the increase of 25 nm TiO_2 ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, micron TiO_2 group had no obvious changes in the follicle development and oocyte maturation. Compared with the two control groups, 25 nm TiO_2 caused obvious morphological changes of follicles and obvious decrease in follicle survival and formation rate of antral follicles. 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 25 nm TiO_2 reduced the number of mature oocytes. **Conclusion:** 25 nm TiO_2 at 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or above can inhibit rat follicle development and oocyte maturation *in vitro*, while the micron TiO_2 at the same dose has no obvious influence on follicle development and oocyte maturation, suggesting different toxic properties between nm TiO_2 and micron TiO_2 . Titanium dioxide nanoparticle may have female reproductive toxicity and should be given more attention.

[KEY WORDS] ovarian follicle; oocytes; titanium dioxide nanoparticles; toxicity test

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(8): 869-873]

纳米级二氧化钛(TiO_2)作为一种新型光催化 剂、抗紫外线剂和光电效应剂等, 在抗菌防霉、排气

[收稿日期] 2009-03-02 **[接受日期]** 2009-05-21

[基金项目] 国家自然科学基金(30571587), 国家重大科学计划子课题(2006CB932505), 上海市科委纳米专项基金(0752nm020). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571587), Project of National Major Science Program of China(2006CB932505) and the Nanotechnology Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(0752nm020).

[作者简介] 侯娟, 硕士生. E-mail: houjuan6@126.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871025, E-mail: tbzhang2001@yahoo.com.cn

净化、脱臭、水处理、防污、抗老化方面和汽车面漆、化妆品等领域显示了广泛的应用前景。TiO₂作为食品着色添加剂已获得美国食品药品监督管理局批准。但纳米级 TiO₂对环境和人体健康的影响目前尚不完全清楚。

现有研究显示不同尺寸的 TiO₂的毒性可能不同,纳米级 TiO₂可以使前胶原表达增加而诱致纤维化,后者是引起慢性阻塞性肺疾病的部分原因^[1-2]。Wang 等^[2]研究表明,纳米级 TiO₂急性毒性可见多种毒性表现,并且可见肝、肾损伤。而刘清等^[3]发现,纳米级 TiO₂对小鼠未见明显的急性毒性表现,组织与脏器也未见明显异常改变。在雌性生殖毒性方面,非纳米级的可溶性钛盐可影响大鼠的生殖能力^[4];而在雄性生殖毒性方面,有报道称纳米级 TiO₂可以被睾丸间质细胞摄取,降低细胞存活率^[5]。因此有必要对纳米级 TiO₂的雌性生殖毒性进行研究。本研究采用大鼠腔前卵泡体外培养方法观察纳米级 TiO₂对卵泡发育及卵母细胞成熟的影响,以揭示纳米级 TiO₂有无雌性生殖毒性,为其安全性评价和生殖毒性作用机制的研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 性成熟期 SD 大鼠购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司(合格证号:SCXK2003-0002)。动物饲养在 SPF 级动物房,保持 12 h 照明/12 h 黑暗的光照周期,温度为(23±1)℃,湿度(60±10)%,自由饮水进食。适应性饲养 1 周后,按雌雄 2:1 比例合笼获取取孕鼠。记出生当天为出生后第 0 天,出生后第 12~14 天雌性仔鼠用于分离卵泡培养。

1.2 受试物、试剂 微米级 TiO₂及 25 nm TiO₂均为 Sigma-Aldrich 公司产品;L15 培养液、含谷氨酰胺的 α -最低必需培养液(α -MEM-glutamax)、人卵泡刺激素(hFSH)、人黄体生成素(hLH)、胰岛素-转铁蛋白-硒混合物(ITS-mix)、重组绒毛膜促性腺激素(rhCG)、重组表皮生长因子(rEGF)均为 Gibco-In-vitrogen 公司产品;胎牛血清购自上海阿敏生物技术有限公司,石蜡油购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 受试物的处理及培养液的配置 称取微米及纳米级 TiO₂于称量瓶中,120℃加热 2 h(灭菌),-20℃冰箱中保存备用。临用前用 M1 培养液(在 α -MEM-glutamax 培养液中加入 5%热灭活胎牛血清、100 mIU/ml hFSH、10 mIU/ml hLH 和 1%ITS-mix 制成)配置成各种浓度,用超声震荡仪(DL-720)处理 20 min。将 10%热灭活胎牛血清、100 IU/

ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素加入 L15 培养液中配成卵泡分离液。

1.4 卵泡分离及培养^[6]

1.4.1 腔前卵泡的分离 采用颈椎脱臼法处死出生后 12~14 d 雌性大鼠。无菌条件下剖腹取出双侧卵巢,清洗后将卵巢置入含有卵泡分离液(37℃预热)的培养皿中;在解剖显微镜(Leica S6D)下将卵巢组织分成小块,用直径 0.15 mm 的眼科显微镊轻轻分离 130~150 μ m 腔前卵泡。

1.4.2 腔前卵泡的体外培养 收集分离的腔前卵泡,用 M1 培养液清洗 1~2 次,随机分在 96 孔培养板中,每孔一个卵泡。每孔加 6 μ l M1 培养液,用石蜡油 50 μ l 覆盖在培养液表面,置于 CO₂细胞培养箱(Heraeus),在 5%CO₂、饱和湿度、37℃条件下培养。培养 24 h 后在相差倒置显微镜(Leica DMIRB)下观察,淘汰不符合标准的卵泡。入选卵泡标准:有较完整的基底膜;有卵泡膜细胞,2~3 层颗粒细胞;中央有一个圆形的卵母细胞;卵泡直径为 130~150 μ m。隔日换 1/2 培养液,培养第 10 天加 M2 培养液(M1 培养液中加入 1.5 IU/ml rhCG 和 5 ng/ml rEGF 制成),经诱导排卵 20 h 后观察卵泡的排卵情况,将卵丘-卵母细胞复合体(COCs)收集在培养皿中,然后用吸管轻轻吹打,去除卵丘细胞,观察卵母细胞成熟情况。

1.5 实验设计 实验共设 5 组:阴性对照组、微米级 TiO₂对照组(50 μ g/ml)、3 个 25 nm TiO₂组(I 组 12.5 μ g/ml;II 组 25 μ g/ml;III 组 50 μ g/ml)。于培养第 2 天加入受试物,受试物持续作用,直到实验结束。

1.6 卵泡发育和卵子成熟参数及评价标准^[6] (1) 卵泡形态学变化。在倒置显微镜下观察换液后卵泡轮廓和卵母细胞形态、基底膜和颗粒细胞增殖分化、窦腔形成、卵丘颗粒细胞扩展和黏液化及 COCs 排出、有无卵母细胞的逸出、卵泡闭锁等。(2) 卵泡存活率。只要卵母细胞被正常分化的颗粒细胞包裹,形成卵泡样结构并贴在培养板即可认为卵泡存活;基底膜模糊、缺损或消失,颗粒细胞松散或游离到卵泡外,卵泡轮廓不规则、卵泡内出现黑色坏死区,卵母细胞逸出卵泡、变形、萎缩或崩解等即可认为卵泡退化。(3) 有腔卵泡形成率。完整的卵泡结构中紧邻卵母细胞区出现半透明、充满液体的窦腔腔样结构即可认为有窦腔形成。(4) COCs 排出率。COCs 排出于卵泡外即为 COCs 排出。(5) 卵母细胞成熟阶段。显微镜下观察卵母细胞成熟情况,区分生发泡期(GV)、生发泡破裂期(GVBD)和排出第一极体

(PB), 测定 GV、GVBD 和 PB 形成率。体外培养卵母细胞出现生殖泡破裂和排出第一极体即可认为是成熟卵母细胞。卵母细胞成熟阶段分析: GV 为卵母细胞核内的生发泡未破裂; GVBD 为卵母细胞核内的生发泡发生破裂, 是第一次减数分裂(M I); PB 为第二次减数分裂(M II)。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。对卵泡存活率、有腔形成率和 COCs 排出率与剂量之间的关系采用 χ^2 趋势检验(界值为 0.05), 卵母细胞成熟阶段构成比的总体比较采用 χ^2 检验(界值为 0.05)。各组间两两比较采用 χ^2 分割法(界值为 0.0125)。

2 结果

2.1 纳米级 TiO₂ 的分散效果 纳米级 TiO₂ 临用前用超声震荡仪处理 20 min, 在电镜下可见纳米级 TiO₂ 分散效果较好(图 1)。

2.2 微米及纳米级 TiO₂ 对卵泡形态学的影响 阴性对照组为卵泡生长和分化从腔前卵泡发育到完全成熟的排卵前阶段。第 2 天卵泡贴壁生长, 结构清晰; 第 6 天卵泡内颗粒增殖分化成壁层颗粒细胞和

卵丘颗粒细胞, 中间出现卵泡腔; 第 10 天发育为成熟卵泡, 卵泡液不断增多, 形成更大的卵泡腔, 卵母细胞居于卵泡的一侧, 形成卵丘(图 2)。微米级 TiO₂ 组与阴性对照组相比, 卵泡形态无明显异常(图 2)。纳米级 TiO₂ 随着剂量增加, 卵泡的毒性增加, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上纳米级 TiO₂ 可出现明显的形态学异常, 表现为卵泡的生长发育受到抑制, 如基底膜模糊、缺失, 卵泡从开始的贴壁变为不贴壁; 颗粒细胞不能增殖分化成壁层颗粒细胞和卵丘颗粒细胞; 卵泡轮廓不清, 内部出现黑色坏死区; 卵母细胞逸出, 卵泡退化或闭锁(图 2)。

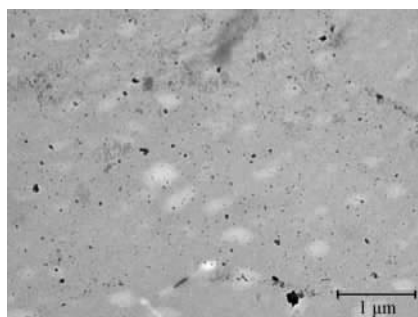


图 1 25 nm TiO₂ 分散状况

Fig 1 Dispersion of 25 nm TiO₂ particles in medium

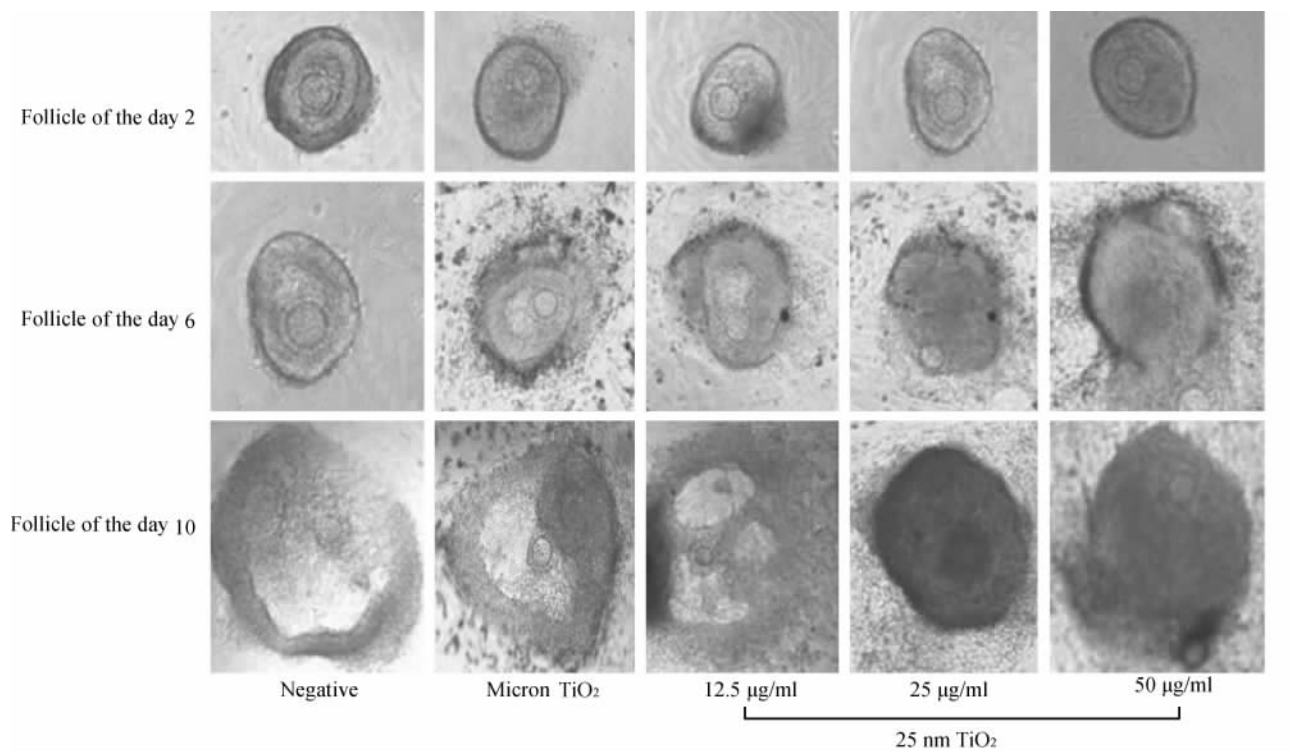


图 2 各组卵泡第 2、6、10 天形态变化

Fig 2 Follicle morphologic changes in each group on day 2, 6 and 10 of culture

Original magnification: $\times 100$

2.3 微米及纳米级 TiO₂ 对卵泡存活和发育的影响 (表 1) 对阴性对照组, 25 nm TiO₂ I 组、II 组和 III 组进行 χ^2 趋势检验, 结果表明卵泡存活率有随着纳米级 TiO₂ 剂量的增加而降低的趋势 ($\chi^2 = 26.553, P < 0.05$); 卵泡有腔形成率有随着纳米级 TiO₂ 剂量的增加而降低的趋势 ($\chi^2 = 22.179, P < 0.05$); 卵泡 COCs 排出率有随着纳米级 TiO₂ 剂量的增加而降低的趋势 ($\chi^2 = 4.921, P < 0.05$)。微米级 TiO₂

的卵泡存活率、有腔形成率和 COCs 排出率与阴性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。纳米级 TiO₂ 在 25 $\mu\text{g/ml}$ 以上剂量组的卵泡存活率及有腔形成率明显下降, 与阴性对照组及微米级 TiO₂ 对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.0125$)。各组 COCs 排出率之间两两相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.0125$)。

表 1 微米及纳米级 TiO₂ 对卵泡发育的影响

Tab 1 Effects of 25 nm and micron TiO₂ on follicle development

Group	Number of follicle	Survival [n(%)]	Antrum [n(%)]	COCs release [n(%)]
Negative	57	52(91.23)	46(80.70)	33(57.89)
Micron TiO ₂	62	54(87.10)	49(79.03)	35(56.45)
25 nm TiO ₂				
12.5 $\mu\text{g/ml}$	58	48(82.76)	42(72.41)	30(51.72)
25 $\mu\text{g/ml}$	57	35(61.40) * Δ	30(52.63) * Δ	25(43.86)
50 $\mu\text{g/ml}$	57	30(52.63) * Δ	24(42.11) * Δ	22(38.60)

Partitions of χ^2 method. * $P < 0.0125$ vs negative group; $\Delta P < 0.0125$ vs micron TiO₂ group

2.4 微米及纳米级 TiO₂ 对卵母细胞成熟的影响 (表 2) 微米级 TiO₂ 对照组各阶段卵母细胞所占的比例与阴性对照组相比, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 纳米级 TiO₂ 随着剂量的增加, 处于生发泡期 (GV) 的卵母细胞比例有逐渐增加的趋势, 而处于生

发泡破裂期 (GVBD) 和排出第一极体 (PB) 的卵母细胞有逐渐减低的趋势, 其中 50 $\mu\text{g/ml}$ 纳米级 TiO₂ 组各阶段卵母细胞所占的比例与 2 个对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P < 0.0125$)。

表 2 微米及纳米级 TiO₂ 对卵母细胞成熟的影响

Tab 2 Effects of 25 nm and micron TiO₂ on oocyte maturation

Group	Number of oocyte	Stage of oocyte maturation [n(%)]		
		GV	GVBD	PB
Negative	53	5(9.43)	21(39.62)	27(50.94)
Micron TiO ₂	55	4(7.27)	26(47.27)	25(45.45)
25 nm TiO ₂				
12.5 $\mu\text{g/ml}$	49	7(14.29)	23(46.94)	19(38.78)
25 $\mu\text{g/ml}$	46	13(28.26)	18(39.13)	15(32.61)
50 $\mu\text{g/ml}$	43	20(46.51) * Δ	13(30.23) * Δ	10(23.26) * Δ

GV: Germinal vesicle; GVBD: Germinal vesicle breakdown; PB: Polar body. Partitions of χ^2 method. * $P < 0.0125$ vs negative group; $\Delta P < 0.0125$ vs micron TiO₂ group

3 讨论

以往的毒性资料表明 TiO₂ 是一种基本无毒的物质。当物质的直径在纳米级别时, 其理化性质将发生根本性的改变。纳米级 TiO₂ 作为一种新型物质, 由于其广泛的应用前景, 其毒性和安全性问题引起人们的广泛关注。

Ferin 等^[7]发现 20 nm 的 TiO₂ 引起的大鼠肺部炎症比同浓度的微米级 TiO₂ 更为严重。Renwick 等^[8]发现 29 nm TiO₂ 与微米级 TiO₂ 相比, 可以使巨

噬细胞的吞噬能力明显降低。Oberdörster 等^[9]通过大鼠亚慢性吸入实验发现: 20 nm 和 200 nm 的 TiO₂ 都可出现下呼吸道沉积, 但 20 nm 组的炎症反应显著高于 200 nm 组。Kumazawa 等^[10]发现: 70 nm 的 TiO₂ 可以进入到肺泡表面; 50 nm 的可以进入细胞; 30 nm 的可以进入中枢神经系统。这些研究说明纳米级 TiO₂ 与微米级 TiO₂ 的毒作用性质和毒性大小可能不同。

有关 TiO₂ 的生殖毒性, 在急性毒性实验中, 纳米级 TiO₂ 未发现生殖系统有病理改变^[2]。但是在

三代繁殖实验中,可观察到 TiO₂对大鼠生殖的有害效应,表现为子代存活率下降和雄雌比下降^[4]。Wang 等^[11]用秀丽隐杆线虫研究微米及纳米级 ZnO、Al₂O₃和 TiO₂的毒性,发现微米和纳米级别的 TiO₂均可影响到线虫的生殖能力,纳米级 TiO₂影响生殖能力的作用要比微米级 TiO₂强,二者间的差异有统计学意义。有报道^[5]纳米级 TiO₂可以被睾丸间质细胞摄取,降低细胞存活率。但目前尚未见常态的微米级 TiO₂和纳米级 TiO₂直接对雌性生殖功能影响的研究。

近年新发展起来的卵泡体外培养方法,在生殖生物学、生理学上显示了良好的应用前景,目前国外已建立了针对绵羊、猪、小鼠等的培养模型。近期我们建立了大鼠卵泡体外培养方法^[6],因其以卵巢的基本功能单位卵泡为研究对象,可直接观察受试物对卵泡发育与卵母细胞成熟的影响,有望成为毒理学的一个重要研究方法。

本研究采用大鼠卵泡体外培养方法,比较研究了微米和纳米级 TiO₂的卵泡毒性,结果显示微米级 TiO₂对从腔前卵泡发育到完全成熟的排卵前阶段的卵泡生长和分化无明显影响;25 μg/ml 以上纳米级 TiO₂可抑制卵泡的生长发育,导致卵泡存活率下降,并可抑制卵泡的分化(表现为颗粒细胞不能增殖分化成壁层颗粒细胞和卵丘颗粒细胞,卵泡有腔形成率和 COCs 排出率下降),影响卵母细胞成熟,使卵母细胞阻滞在生发泡期(GV)或生发泡破裂期(GVBD)。

本研究结果表明,微米级 TiO₂对卵泡发育与卵母细胞成熟无明显毒作用,而 25 nm TiO₂对卵泡发育与卵母细胞成熟均有明显的毒作用。结果提示,在评价纳米级 TiO₂对人体健康的危害性和危险度时应重视其生殖毒性。有关纳米级 TiO₂影响体外卵泡发育和卵母细胞成熟的机制有待今后进一步深

入研究。

[参考文献]

- [1] Chung A, Gilks B, Dai J. Induction of fibrogenic mediators by fine and ultrafine titanium dioxide in rat tracheal explants[J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(5 Pt 1):L975-L982.
- [2] Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 168:176-185.
- [3] 刘清, 治洪, 郭宝岗, 张月, 李毅民, 刘景兰, 等. 纳米 TiO₂毒性的试验研究[J]. *现代预防医学*, 2006, 33: 1211-1212.
- [4] Köpf-Maier P, Erkenwick P. Teratogenicity and embryotoxicity of titanocene dichloride in mice[J]. *Toxicology*, 1984, 33: 171-181.
- [5] Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki K, Nihei Y, et al. The effects of nanoparticles on mouse testis leydig cells *in vitro*[J]. *Toxicol In Vitro*, 2008, 22: 1825-1831.
- [6] 万旭英. 大、小鼠卵泡培养方法及其在雌性生殖毒性研究中的应用[D]. 上海: 第二军医大学, 2008.
- [7] Ferin J, Oberdörster G, Penney D P. Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1992, 6: 535-542.
- [8] Renwick L C, Donaldson K, Clouter A. Impairment of alveolar macrophage phagocytosis by ultrafine particles[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 172: 119-127.
- [9] Oberdörster G, Ferin J, Lehnert B E. Correlation between particlesize, *in vivo* particle persistence and lung injury[J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102: 173-179.
- [10] Kumazawa R, Watari F, Takashi N, Tanimura Y, Uo M, Totsuka Y. Effects of Ti ions and particles on neutrophil function and morphology[J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 3757-3764.
- [11] Wang H, Wick R L, Xing B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Environ Pollut*, 2009, 157: 1171-1177.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN 31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA

ISSN 1000-1948
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725