

# 用 SRXRF 研究纳米 TiO<sub>2</sub> 颗粒沿小鼠嗅觉神经系统的迁移\*

王江雪<sup>1,2</sup> 陈春英<sup>1;1)</sup> 孙瑾<sup>1,2</sup> 喻宏伟<sup>1,2</sup> 李玉锋<sup>1,2</sup> 李柏<sup>1</sup> 邢丽<sup>1</sup>  
黄宇营<sup>1</sup> 何伟<sup>1</sup> 高愈希<sup>1</sup> 柴之芳<sup>1</sup> 赵宇亮<sup>1</sup>

1 (中国科学院高能物理研究所 北京 100049)

2 (中国科学院研究生院 北京 100049)

**摘要** 利用同步辐射 X 射线荧光技术 (SRXRF) 的微区(达十几微米)分析特性分析了小鼠经不同尺寸的 TiO<sub>2</sub> 染毒后, 钛元素在嗅球和大脑切片中的空间微区分布状况, 结果表明吸入的 TiO<sub>2</sub> 能够通过鼠的嗅觉神经系统进入到嗅球的外部嗅觉神经层、内部粒状细胞层、嗅觉脑室区, 并进一步迁移至大脑的皮质、海马和丘脑区, 且微米尺寸的 TiO<sub>2</sub> 分布范围比纳米尺寸的更大一些.

**关键词** SRXRF 纳米 TiO<sub>2</sub> 鼠脑 元素分布 纳米安全性

## 1 引言

纯净的钛是银白色的金属. 天然的钛主要以钛铁矿 (FeTiO<sub>3</sub>) 和金红石 (TiO<sub>2</sub>) 等化合物形式存在. 钛的矿物在自然界中分布很广, 约占地壳重量的 0.6%. 二氧化钛 (TiO<sub>2</sub>, 又名钛白粉) 是世界上最好的白色无机颜料, 具有无毒、最佳不透明性、最佳白度和光亮度. 我国钛白粉工业自 1956 年生产搪瓷和电焊条钛白粉起步, 到现在已有将近 50 年的历史. 其生产产量也随着现代科技的进步得到了很大的提高. 纳米 TiO<sub>2</sub> 因具有良好的光学催化特性、耐化学腐蚀性和热稳定性等特征, 被广泛用于抗菌杀菌、防晒化妆品、塑料薄膜、涂料和功能陶瓷材料及生物陶瓷等领域.

随着 TiO<sub>2</sub> 的大量生产和广泛使用, TiO<sub>2</sub> 纳米粒子也会逐渐地被排放到大气中, 同时人们在工作和生活环境中接触到 TiO<sub>2</sub> 粒子的机会越来越多, 这是否对人类健康和环境带来影响, 引起了科学界的广泛关注. 流行病学研究表明环境大气颗粒物 PM10 可引起肺脏的发病率增高, 甚至导致死亡. 据报道, 超细颗粒物(粒径小于 100nm) 比细颗粒物更易于引起肺部炎症反应和病理学改变<sup>[1, 2]</sup>. 当吸入颗粒物的量超出肺部

巨噬细胞的吞噬能力时, 过载的颗粒物与肺上皮细胞相互作用诱发肺部肿胀. 超细颗粒物(包括超细 TiO<sub>2</sub>) 则会穿过肺上皮细胞组织, 进入肺间质组织内, 引起肺疾病<sup>[3, 4]</sup>. 大鼠暴露在纳米尺度的放射性同位素 <sup>13</sup>C 颗粒物粉尘中 6h 后, 解剖发现大脑、小脑和嗅小球中 <sup>13</sup>C 的浓度随代谢时间的延长有所提高. 这说明超细颗粒物可以通过鼻粘膜, 随着呼吸道和嗅觉神经通路进入嗅球和大脑的中枢神经系统中<sup>[5]</sup>. 关于广泛使用的非水溶性纳米金属氧化物 TiO<sub>2</sub> 是否可以经过嗅觉神经通路进入大脑中, 尚未发现有关报道.

常规的 X 射线荧光分析 (XRF) 技术光斑大小一般为几微米, 难以实现对小鼠嗅球和脑的微区范围内多元素无损分析. 同步辐射 X 射线荧光 (SRXRF) 利用同步辐射光作为 XRF 的激发光源, 其光源与普通的 X 光管相比, 具有波带宽、亮度高、波长连续可调、偏振性好、高准直性等优点, 使得该分析技术的空间分辨率达十几微米, 并可进行多元素同时无损测定. 本研究就利用其良好的空间分辨率这一特性分析了 TiO<sub>2</sub> 经小鼠鼻腔滴注后在嗅球和大脑切片中的分布状况.

\* 国家自然科学基金(10490180, 90406024)和中国科学院重要方向性项目 (KJCXN-01) 资助

1) E-mail: chenchy@mail.ihep.ac.cn

## 2 材料和方法

TiO<sub>2</sub> 粉体, 尺寸分别为纳米尺寸(约80nm)(杭州大洋纳米技术有限公司)和微米尺寸(200—300nm)(购自中联化学药品公司). 用Milli-Q水系统(Millipore, Bedford, MA)制备的超纯水配制TiO<sub>2</sub>悬浮液, 浓度为0.1 g/ml.

15只CD雌性小鼠(维通利华实验动物技术有限公司), 体重20±2g. 实验前随机分为纳米组和微米组和对照组. 每隔一天为每只小鼠进行鼻腔滴注10μl TiO<sub>2</sub>悬浮液, 对照组给予等量的超纯水. 给药一个月后宰杀小鼠, 迅速剥离脑组织进行冰冻切片. 嗅球和大脑切片厚度分别为120μm和100μm. 将切片直接平放在聚碳酸酯薄膜上, 空气中晾干, 保存在阴凉干燥处待测. 选择图1所示的嗅球和大脑位置切片进行SRXRF扫描.

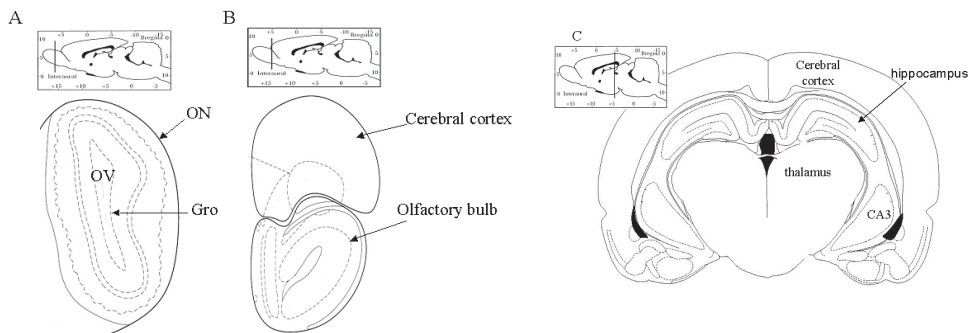


图1 嗅球和大脑切片位置(矢状图中以竖线显示)及相应的轮廓图(冠状图)

A: 嗅球中部; B: 嗅球后部(含大脑皮质部分); C: 大脑切片位置和轮廓图; 均仅分析右半部.

## 3 结果和讨论

在生产和使用TiO<sub>2</sub>的过程当中, 含有TiO<sub>2</sub>的粉尘可能经各种途径进入人体内部, 如经鼻、经口、经皮肤暴露等途径. 一般来说, 以经鼻吸入为最普遍的人类暴露方式. 因此, 本文采用鼻腔滴注法利用实验动物模型模拟了人类的暴露情况, 并利用SRXRF技术分析了钛及生物体内的其它必需微量元素Fe, Cu, Zn在小鼠嗅球和大脑切片中的分布. 对照组小鼠嗅球和大脑切片中钛元素的计数很低, 与本底值接近有的甚至探测不出. 图2和图3分别为钛元素在纳米组和微米组小鼠嗅球和大脑中的分布, 此即为小鼠吸入的TiO<sub>2</sub>. 从图中可以看出, 钛元素在嗅球的中后部都有一定的分布, 且能够在嗅球的外部嗅觉神经层(ON)深入到内部粒状细胞层(Gro), 并进入嗅觉脑室(OV)区. 从纳米组和微米组结果对比可以看出, 微米尺寸的钛

本实验在北京同步辐射实验室(BSFL)4W1B的X射线荧光分析实验站完成. 该站由计算机控制的X, Y, Z三维步进马达驱动机可以控制样品台自由移动, 最小移动步长可控制在几微米范围内, 样品的面扫描技术和XRF的光谱分析技术相结合可以直观的给出所扫描范围内感兴趣元素的空间分布情况.

储存环光子束流能量2.2GeV, 50—100mA的光子束流首先经铝吸收片滤掉低能光子, 以降低光谱本底, 然后经狭缝准直, 用K-B镜将白光聚焦后以45°入射角激发样品. 扫描时采用矩阵方式, 逐点进行扫描. 光斑大小为60μm×80μm, 扫描步长为400μm—600μm.

使用AXIL软件包分析光谱. 解谱后所获得各元素峰面积计数均进行测量时间、电离室计数、康普顿散射强度等测量条件的归一, 然后去除本底(空白的聚碳酸酯薄膜)<sup>[6]</sup>, 最后将所得数据用Origin 6.1绘图软件绘制元素的等高线分布图.

元素分布范围比纳米尺寸的更大一些. 另外, 在小鼠大脑皮质(cerebral cortex)、海马(hippocampus)、丘脑(thalamus)和海马的CA3区均有一定的钛元素富集, 其中以大脑皮质区, 海马的CA3区和齿状回神经细胞区含量较高, 说明鼻腔滴注TiO<sub>2</sub>悬浮液后, TiO<sub>2</sub>能够通过小鼠的嗅觉神经通路由鼻腔到达嗅球和大脑内部.

微量元素Fe, Cu, Zn在生物体内起着相当重要的作用. 它们是各种酶的重要组成成分和激活剂, 直接参与酶的生成和代谢, 能协助宏量元素的运输, 并可调节核酸代谢<sup>[7]</sup>. 如铁是各种细胞色素、过氧化酶的必要成分, 含铁血红蛋白有输氧功能. 脑内铁含量低时, 可通过影响神经递质的产生损害脑功能. 从纳米和微米组小鼠大脑中微量元素Fe, Cu, Zn的分布(图略)发现, 它们的分布状况并没有因为钛元素的引入而发生明显的改变.

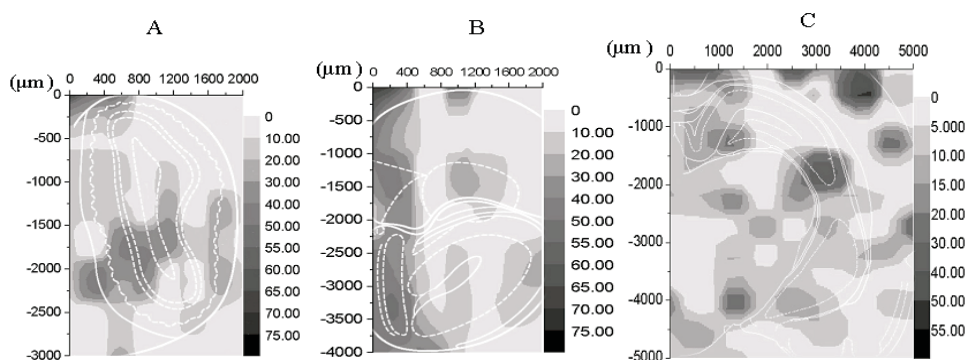


图 2 纳米组中钛元素在小鼠嗅球和大脑中的分布

A: 嗅球中部; B: 嗅球后部(含大脑皮质); C: 大脑.

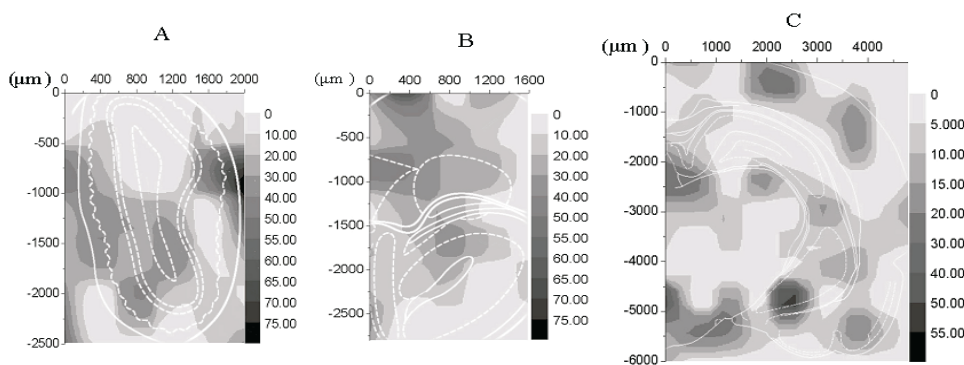


图 3 微米组中钛元素在小鼠嗅球和大脑中的分布

A: 嗅球中部; B: 嗅球后部(含大脑皮质); C: 大脑.

一般认为当材料的尺寸达到纳米量级时, 因颗粒小, 其物理化学特性也会随之发生改变, 表现为大的比表面积和量子尺寸效应、隧道效应等功能. 同样, 当  $\text{TiO}_2$  颗粒达到纳米尺寸时, 其表面表现出超强的亲水性, 使得其颗粒表面常常被水分子所覆盖, 在水溶液中不易分散而表现出极强的团聚能力<sup>[8]</sup>. 纳米组中钛元素在嗅球和大脑中的分布范围小于微米组很可能是由于多数的纳米  $\text{TiO}_2$  粒子被吸附在鼻腔内, 不能随着呼吸道和嗅觉神经系统进入嗅球和大脑内部所致. 有研究表明, 纳米颗粒经吸入进入机体以后并不只停

留在原地, 还可以向周围组织甚至更远的范围转移. 观察到的最多的转移方式是由呼吸道表面向粘膜内层组织转移, 进入到肺间质组织中或是进入体内的循环系统<sup>[9]</sup>, 进而对其他器官/组织产生影响.

本文采用 SRXRF 技术分析了  $\text{TiO}_2$  在小鼠嗅球和大脑切片中的分布情况, 结果发现  $\text{TiO}_2$  能够通过小鼠的嗅觉神经通路由鼻腔到达嗅球, 乃至大脑内部. 为我们进一步研究  $\text{TiO}_2$  可能引起的小鼠的脑功能损伤并进而引起机体生理功能损伤和相应的神经性疾病奠定了基础.

## 参考文献(References)

- 1 Ferin J, Oberdörster G, Penny D P. Am. J. Respir Cell Mol Biol, 1992, **6**: 535
- 2 Donaldson K, LI X Y, MacNee W. J. Aerosol Sci., 1998, **29**(5): 553
- 3 Oberdörster G, Ferin J, Lehnert B E. Environ Health Perspect, 1994, **102**(Supp.5): 173—179
- 4 ZHANG Q W, Kusaka Y, Donaldson K. Inhal Toxicol, 2000, **12**(Supp.3): 267
- 5 Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V et al. Inhal Toxicol, 2004, **16**(6-7): 437
- 6 ZHANG Zhi-Yong, LIU Nian-Qing, LI Fu-Liang et al. HEP & NP, 2003, **27**(Supp.): 114 (in Chinese)  
(张智勇, 刘年庆, 李福亮等. 高能物理与核物理, 2003, **27**(增刊): 114)
- 7 ZHANG Yu-Zhi. Studies of Trace Elements and Health, 2004, **21**(3): 56 (in Chinese)  
(张玉芝. 微量元素与健康研究, 2004, **21**(3): 56)
- 8 HUANG Yan-E. Hebei Journal of Industrial Science & Technology, 2001, **18**(2): 7 (in Chinese)  
(黄艳娥. 河北工业科技, 2001, **18**(2): 7)
- 9 Oberdörster G. Phil Trans R Soc Lond A, 2000, **358**: 2719

# Translocation of Inhaled TiO<sub>2</sub> Nanoparticles Along Olfactory Nervous System to Brain Studied by Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence\*

WANG Jiang-Xue<sup>1,2</sup> CHEN Chun-Ying<sup>1;1)</sup> SUN Jin<sup>1,2</sup> YU Hong-Wei<sup>1,2</sup> LI Yu-Feng<sup>1,2</sup> LI Bai<sup>1</sup>  
XING Li<sup>1</sup> HUANG Yu-Ying<sup>1</sup> HE Wei<sup>1</sup> GAO Yu-Xi<sup>1</sup> CHAI Zhi-Fang<sup>1</sup> ZHAO Yu-Liang<sup>1</sup>

1 (Institute of High Energy Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

2 (Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** Nanosized TiO<sub>2</sub> is widely used for cleaning air, antibacterial and decomposing organic in wastewater for its highly photocatalytic function. TiO<sub>2</sub> inhalation via respiratory tracts is the most common route of its exposure in industry and environment. After inhalation by human or rodents, TiO<sub>2</sub> can induce inflammation and pulmonary lesions, which was reported to even cause lung cancer by long-term exposure. In this paper, Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence was employed to investigate the distribution of TiO<sub>2</sub> in the olfactory bulb and brain of mice after inhalation of TiO<sub>2</sub> particles suspension. The results showed that TiO<sub>2</sub> could enter the olfactory nerve layer (ON), granular cell layer of olfactory bulb (Gro), and olfactory ventricle (OV) and further the hippocampus, thalamus, and CA3 area of the brain through the olfactory nervous system. The distribution area of microsized TiO<sub>2</sub> was wider than that of nanosized TiO<sub>2</sub>.

**Key words** SRXRF, nano-TiO<sub>2</sub>, mouse brain, elemental distribution, nanosafety

---

\*Supported by NSFC (10490180, 90406024) and Major Direction Project of Chinese Academy of Sciences (KJCX N-01)

1) E-mail: chenchy@mail.ihep.ac.cn