



勞工安全衛生研究報告

極細微粒二氧化鈦之細胞毒性與 基因毒性之探討

A Study on the Genotoxicity and Cytotoxicity of Ultrafine
 TiO_2 in Human Cells



極細微粒二氧化鈦之細胞毒性與基因毒性 之探討

A Study on the Genotoxicity and Cytotoxicity of Ultrafine TiO_2 in Human Cells

研究主持人：熊映美、莊曜宇、蔡孟勳

計畫主辦單位：行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所

研究期間：中華民國 94 年 1 月至 94 年 12 月

行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所

中華民國 95 年 3 月

國家圖書館出版品預行編目資料

極細微粒二氧化鈦之細胞毒性與基因毒性之探討
= A study on the genotoxicity and cytotoxicity
of ultrafine TiO₂ in human cells / 熊映美, 莊曜

字, 蔡孟勳研究主持. -- 初版.--

臺北縣汐止市：勞委會勞安所, 民 95

面； 公分

參考書目：面

ISBN 986-00-4887-8 (平裝)

1. 勞工衛生

412.53

95006389

極細微粒二氧化鈦之細胞毒性與基因毒性之探討

著(編、譯)者：熊映美、莊曜宇、蔡孟勳

出版機關：行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所

221 台北縣汐止市橫科路 407 巷 99 號

電話：02-26607600 <http://www.iosh.gov.tw/>

出版年月：中華民國 95 年 3 月

版(刷)次：1 版 1 刷

定價：150 元

展售處：

國家書坊台視總店

<http://www.govbooks.com.tw/>

台北市松山區八德路三段 10 號 B1

電話：02-25781515#643

五南文化廣場

台中市中區中山路 6 號

電話：04-22260330

印刷者：冠順印刷事業有限公司

台北市和平東路一段 87 號 2 樓 電話：(02)3322-2236

- 本書同時登載於本所網站之「出版中心」，網址為 <http://www.iosh.gov.tw/>。
- 本所保留所有權利。欲利用本書全部或部分內容者，須徵求行政院勞工委員會勞工安全衛生研究所同意或書面授權。

【版權所有，翻印必究】

GPN：1009500863

ISBN：986-00-4887-8

摘要

奈米科技已開始迅速的發展，揭開產業新局，動物實驗顯示其可能造成健康危害，然而可能引發的職業疾病與安全衛生等相關研究卻少之又少。二氧化鈦奈米粒子 (titanium dioxide nano particle) 是一種廣為使用的奈米材料，由於其尺寸縮小到奈米等級，致使其物理化學性質與其塊材 (bulk material) 性質大不相同。二氧化鈦塊材性質穩定、不具生物活性，而其奈米粒子可能造成的生物毒性，至今仍未完全研究清楚。

本研究目的在找出二氧化鈦奈米粒子對人類細胞株的細胞毒性 (cytotoxicity)，並利用基因晶片 (DNA microarray) 分析其所誘發之特定基因，以篩選二氧化鈦奈米粒子之生物指標 (biomarker)，並進而研究二氧化鈦奈米粒子對人體細胞的生理機制之影響，以求能早期偵測並預防二氧化鈦奈米粒子的生物毒性，希望能減低甚或避免二氧化鈦奈米粒子所可能造成的勞工健康危害，加強安全衛生防護。

實驗所採用的二氧化鈦奈米粒子為 40 nm 的銳鈦礦 (Anatase) 粒子，經過電子顯微鏡實際測量，確認其粒徑大小為奈米尺寸，因此細胞毒性確為二氧化鈦奈米粒子暴露造成。實驗以淋巴球母細胞 TK6 細胞株與人類肺部上皮細胞 A549 細胞株為研究對象，利用 Colony formation assay 與 MTT assay 評估二氧化鈦奈米粒子暴露對人類淋巴球母細胞及人類肺部上皮細胞的細胞毒性，實驗結果顯示二氧化鈦奈米粒子暴露會造成長期性的影響，於短期內並無法觀察到任何細胞毒性。得到此初步分析之結果後，未來仍要配合職業場所的環境監測與遭受暴露人員之流行病學調查與基因表現型分析，才能建立完整二氧化鈦奈米粒子暴露所引起之細胞毒性的模型。

近年來基因晶片已經被廣泛應用在同時觀察大量的基因之表現，為找出特定基因調控極為方便、快速與可靠的方法。因此，本研究同時利用基因晶片分析二氧化鈦奈米粒子對人類肺部上皮細胞或人類淋巴球母細胞之基因毒性 (genotoxicity)，並找出二氧化鈦奈米粒子所誘發之特定基因，以建立二氧化鈦奈米粒子之生物指標。經過基因晶片實驗結果證實，二氧化鈦奈米粒子暴露會造成細胞內生成反應性氧族 (reactive oxygen species, ROS)，使氧化壓力昇高，細胞受損，並進而引起發炎反應，造成凝血機制異常。其實驗結果仍有待以即時聚合酶連鎖反應 (real-time PCR) 作進一步的確認。

關鍵詞：二氧化鈦奈米粒子、細胞毒性、基因毒性、基因晶片、生物指標、ROS、
氧化壓力、免疫反應、即時聚合酶連鎖反應

Abstract

With the rapid development of nanotechnology, there were only few studies to investigate the potential of which to be harmful to human health and occupational safety and to cause industrial disease. Titanium dioxide nano particle is already a widely-applied nano material. Because of nano size, the physic-chemical property of titanium dioxide nano particle is extremely different from that of bulk material. The property of bulk material of titanium dioxide is very stable and biologically inert; nevertheless, the biological toxicity that titanium dioxide nano particle may cause is still not completely realized yet.

In an attempt to understand the pathogenesis of titanium dioxide nano particle, we studied the cytotoxicity and genotoxicity caused by titanium dioxide nano particle to human cells and develop a detectable molecular marker by microarray. Our results provide a useful tool for elimination of industrial harzard and occupational diseases caused by titanium dioxide nano particle.

A human lymphoblastic cell line, TK6, and a human pulmonary epithelial cell line, A549, were used to investigate the cytotoxicity and genotoxicity caused by titanium dioxide nano particle in initial study. In order to assess the cytotoxicity caused by titanium dioxide nano particle, colony formation assay and MTT assay were applied after treatment of titanium dioxide nano particle for 24 hours. It showed obvious cytotoxicity caused by titanium dioxide nano particle by colony formation assay in TK6 and A549 cell lines, whereas it showed no cytotoxicity by MTT assay in both cell lines. The results showed that titanium dioxide nano particle can make long-term effects to cells and the cytotoxicity could not be measured in a short time. With the preliminary results, it should be proceeding to moniter of occupational environment as well as the epidemiologic study and analysis of gene expression induced by titanium dioxide nano particle.

In recent years, DNA microarray is used to be a high-throughput analysis for expression levels of multiple genes and is assumed a convenient, easy-to-use, and reliable method. Therefore, DNA microarray was used simultaneously to analyze the genotoxicity

caused by titanium dioxide nano particle and develop a detectable molecular marker in initial study. The results showed that several molecular adverse effects could be caused by titanium dioxide nano particle, including production of ROS, raise of oxidative stress, damage of cell, and inflammation response as well as unusual coagulation. However, real-time PCR and western blotting are still in demand to further confirm the results acquired by DNA microarray and to develop a detectable molecular marker induced by titanium dioxide nano particle.

Key Words: titanium dioxide nano particle, cytotoxicity, genotoxicity, DNA Microarray, ROS, oxidative stress, inflammation response, real time PCR

目 錄

摘 要.....	i
Abstract.....	iii
目 錄.....	v
圖目錄.....	vii
表目錄.....	viii
第一章 計畫概述.....	1
第一節 前言.....	1
第二節 目的.....	3
第三節 工作項目.....	3
第二章 文獻回顧.....	5
第一節 奈米粒子的生物毒性.....	5
第二節 奈米粒子造成生物毒性的分子機制.....	5
第三節 奈米粒子進入生物體的途徑與其目的地.....	7
第四節 奈米粒子的粒徑大小與其在呼吸道的沈降分布.....	7
第五節 呼吸道的清理機制.....	8
第六節 奈米粒子進入血液循環系統.....	8
第七節 奈米粒子進入神經系統.....	9
第八節 奈米粒子進入消化道與經由表皮吸收.....	9
第三章 二氧化鈦奈米粒子的物質特性.....	11
第一節 二氧化鈦奈米粒子.....	11
第二節 奈米粒子的特性.....	11
第三節 二氧化鈦奈米粒子的製造方法.....	12
第四節 二氧化鈦粒子之來源.....	13
第五節 二氧化鈦奈米粒子粒徑測量.....	13
第六節 以電子顯微鏡觀察二氧化鈦奈米粒子.....	14
第四章 二氧化鈦奈米粒子的細胞毒性.....	18
第一節 人類細胞株培養.....	18
第二節 二氧化鈦奈米粒子的暴露.....	18
第三節 Colony formation assay.....	19
第四節 Colony formation assay 之結果.....	20
第五節 MTT assay.....	21
第六節 A549 細胞株與巨噬細胞共同培養暴露在不同濃度 TiNano 40 下	

24 小時所產生之細胞毒性 23

第五章 二氧化鈦奈米粒子的基因毒性 25

 第一節 基因晶片 25

 第二節 利用基因晶片所做之初步分析 27

第六章 討論 33

 第一節 二氧化鈦粒子粒徑大小 33

 第二節 二氧化鈦奈米粒子暴露所引起之細胞毒性 34

 第三節 二氧化鈦奈米粒子暴露所引起之基因毒性 35

 第四節 未來之展望 38

第七章 結論與建議 42

誌謝 39

參考文獻 42

附錄 具 2 倍變化基因列表 53

圖目錄

圖 1	C ₆₀ 奈米粒子受到光照產生電子電洞對，並釋放出自由電子.....	6
圖 2	奈米粒子造成氧化壓力昇高，並引起發炎反應.....	6
圖 3	奈米粒子經由呼吸道進入人體與其代謝途徑.....	7
圖 4	奈米粒子粒徑大小與其在呼吸道的沈降分布關係圖.....	8
圖 5	奈米粒子經由嗅覺神經元進入神經系統.....	9
圖 6	表皮組織.....	10
圖 7	奈米粒子在人體內完整的生物動力性路徑.....	10
圖 8	表面原子比例與粒徑關係.....	12
圖 9	微米級二氧化鈦粒子之外觀.....	15
圖 10	25 nm 銳鈦礦二氧化鈦粒子 (T 廠) 之外觀.....	15
圖 11	25 nm 金紅石二氧化鈦粒子 (T 廠) 之外觀.....	16
圖 12	TiNano 40 之外觀.....	16
圖 13	二氧化鈦奈米粒子暴露濃度與 TK6 細胞株存活率關係.....	20
圖 14	二氧化鈦奈米粒子暴露濃度與 A549 細胞株存活率關係.....	21
圖 15	二氧化鈦奈米粒子暴露濃度與 TK6 細胞株細胞活性關係.....	22
圖 16	二氧化鈦奈米粒子暴露濃度與 A549 細胞株細胞活性關係.....	23
圖 17	二氧化鈦奈米粒子暴露濃度和 A549 細胞株與巨噬細胞共同培養 之細胞活性關係(暴露 4 小時).....	24
圖 18	二氧化鈦奈米粒子暴露濃度和 A549 細胞株與巨噬細胞共同培養 之細胞活性關係(暴露 20 小時).....	24
圖 19	基因晶片的完整製作流程.....	25
圖 20	基因晶片偵測基因表現的原理.....	27
圖 21	經過二氧化鈦奈米粒子處理 24 小時後所得的晶片影像.....	28
圖 22	晶片影像經過 PCA 轉換所得結果.....	31
圖 23	TK6 細胞株所表現基因經過分群的結果.....	30
圖 24	A549 細胞株所表現基因經過分群的結果.....	30

表目錄

表 1	目前已經商品化且廣泛應用的奈米化產品	1
表 2	原子分子與生物細胞粒徑之比較	11
表 3	二氧化鈦奈米粒子粒徑測量結果	13
表 4	超音波震盪與加入表面分散劑前後二氧化鈦奈米粒子粒徑測量結果比較 同功能分群結果	31

第一章 計畫概述

第一節 前言

早在二十世紀中期，Dr.Feynman (Richard P.Feynman) 便開始倡導奈米科技。時至今日，奈米科技更是以驚人的速度不斷成長，從半導體產業、生物科技到民生工業，隨處可見奈米科技的蹤跡。根據統計，至 2005 年，全球的奈米科技產值已突破十億美金，美國國家科學基金會 (The US National Science Foundation) 甚至估計到 2015 年時，全世界的奈米科技產值將達一兆美金。可想而知，奈米科技將在我們的生活中佔有越來越重要的地位。

表 1簡單列出部份目前已經商品化且廣泛應用的奈米化產品：

表1 目前已經商品化且廣泛應用的奈米化產品

A partial list of nanoparticle manufacturers and a sampling of commercial products containing nanoparticles

Nanoparticles	Manufacturer	Brand Names / Products
Sunscreens and Cosmetics		
Titanium Dioxide	Altair Nanotechnologies	Microsun, Sunsob, Nanosun
	Chengyin Technologies	
	Micronisers	
	Nanophase	
	Nanosource	
	Oxonica	
	Particle Sciences, Inc. (T-Cote 031)	Vanicream Sunscreens, Skin Doctrine Sun Protector
	Sachtleben / Merck (Eusolex)	
	Showa Denka (Maxlight FTS)	
Zinc Oxide	Advanced Powder Technologies (ZinClear)	Bare Zone, Bare Zone Nippers, Wet Dreams, Wild Child
	Micronisers	Microsun, Sunsob, Nanosun
	Nanophase/ BASF "Z-Cote"	All Terrain Terrasport, Australian Gold, Dermatone, SPF To Go, Skin Doctrine Sun Protector, Skinceuticals, Sun Smart, Vanicream Sunscreens, NuCelle
	Oxonica	Sunsense
	Showa Denko (Maxlight ZS)	
"Nanocapsules" filled with various nutrients (130-600 nm)	L'Oréal	Lancôme Flash Bronzer Self-Tanning Face Gel, L'Oréal Plenitude Futur-E Moisturiser
Textiles		
Teflon®	DuPont	Some stain-resistant apparel sold by: Levi Dockers, J. Crew, London Fog, Marks and Spencer, Ralph Lauren, Regatta, Liz Claiborne, Pendleton

Nanoparticles	Manufacturer	Brand Names / Products
Unspecified polymer fibers	Nano-Tex, LLC/Burlington (Nano-Care, Nano-Dry, Nano-Pel, Nano-Touch)	Some stain/wrinkle-resistant apparel sold by: Bremen Trousers, Croft and Barrow, Dreamyland, Eddie Bauer, Elbeco, Gap, Haggar, Kathmandu, Lee Performance Khakis, Levi Dockers, Levi Strauss, Marks Work Warehouse, Savane, Sleepmaker
Titanium Dioxide (500 nm)	BASF - Ultramid BS416N	For use in UV-protected fabrics
Coatings		
Custom-made nanocomposites	Nanogate Technologies, GmbH	Schweizer Optik anti-scratch lenses
Titanium Dioxide	AFG Industries	Radiance Ti self-cleaning glass
	Pilkington	Pilkington Activ self-cleaning glass
	PPG Industries	SunClean self-cleaning glass
Custom-made nanocomposites	Nanogate Technologies, GmbH	WonderGliss anti-stick coating, Sekcid tile coating
Electronics		
Titanium Dioxide	Ntera Ltd.	NanoChromics displays
Carbon Nanotube	NEC	Flat-screen displays (not yet commercialized)
crystalline films	Optiva	Sony Liquid Crystal Displays
Energy storage		
Lithium Titanate nanoparticles	Altair Nanotechnologies, Inc./Ntera Ltd.	For use in rechargeable lithium ion batteries. Not yet commercialized.
Carbon Nanohorns	NEC	Fuel cells for mobile phones and notebook PCs. Not yet commercialized.
Sports goods		
Carbon Nanotube	Nanoledge	Babolat VS nanotube tennis racquet
Nanoclay particles, rubber polymers	InMat, LLC	Wilson Double Core tennis balls
Nanocomposites	Nanogate Technologies, GmbH	Cerax Racing Polymer (ski wax)
Military uses / Decontamination		
Aluminum	Argonide Metal Technologies (Alex)	rocket propellant booster
Titanium Dioxide	KES Science and Technology, Inc.	AiroCide TiO ₂ Filter to destroy airborne pathogens, such as anthrax
Various metal oxides	NanoScale Materials, Inc.	NanoActive remediation of hazardous chemical waste
Titanium Dioxide	Altair Nanotechnologies / Western Michigan University	Product for nuclear waste remediation and sensors to detect chemical and biological agents under development
Surface Disinfectant		
Lanthanum-based compound (40 nm)	Altair Nanotechnologies	Nanochek Algae Preventer for pools, aquariums
Nanoemulsions (170 nm)	EnviroSystems, Inc.	Ecotru Surface Disinfectant
Dental uses		
Hydroxyapatite crystals	BASF	Toothpaste with enamel - not yet commercialized
Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane	Hybrid Plastics	NanoBond bonding agent
Medical uses		
Silver	Nucryst (division of Westaim)	Smith & Nephew Acticoat Bandages
Silver	Institute for New Materials	Audio Service GmbH, antimicrobial coating on hearing aids
Automobile		
Carbon Nanotube	Hyperion Catalysis	Widely-used in automobile fuel lines and Renault Clio and Megane plastic panels
Nano Tracking Devices		
Various metals	Nanoplex Technologies, Inc.	Nanobarcodes used for bioanalysis, such as protein arrays

由表 1 中發現，目前的奈米化產品已普及於我們的生活之中，從化妝品、防曬用品、體育用品到電池、電子產品等，甚至軍事用途，其材料則以二氧化鈦 (titanium dioxide) 奈米粒子的用途最為廣泛。

然而，奈米粒子對生物體的毒性與危害至今仍未被研究的十分透徹。面對迅速發展的奈米科技，及其可能衍生的各種問題，我們無從因應，更無法防範。過去，有部份的研究利用老鼠等實驗動物證實，奈米粒子的確對生物體具有一定的毒性，此種危害到人體健康的負面效應，首先衝擊到的便是製造與操作奈米粒子的工作場所其職業安全與環境衛生等問題。可是，目前為止並無任何研究明確指出奈米粒子的生物毒性與劑量、組成與暴露時間等的關係為何，如此，很難針對奈米粒子所造成的勞工安全衛生的危害作風險評估與管理。

第二節 目的

有鑑於此，本研究以人類細胞株作為實驗材料，針對最廣為應用的二氧化鈦奈米粒子，找出其暴露劑量、暴露時間與生物毒性的關係。近年來基因晶片 (DNA microarray) 已經被廣泛應用在同時觀察大量的基因之表現，為找出特定基因調控極為方便、快速與可靠的方法。因此，本研究同時利用基因晶片大量分析基因表現之特性，分析二氧化鈦奈米粒子對人類肺部上皮細胞或人類淋巴球母細胞之細胞毒性 (cytotoxicity) 與基因毒性 (genotoxicity)，並找出二氧化鈦奈米粒子所誘發之特定基因，以建立二氧化鈦奈米粒子之生物指標 (biomarker)，並進而研究二氧化鈦奈米粒子對人體細胞的生理機制之影響，以求能早期偵測並預防二氧化鈦奈米粒子的生物毒性，希望能減低甚或避免二氧化鈦奈米粒子所可能造成的勞工安全衛生的危害。

第三節 工作項目

工作項目可概要的分為四大項：

1. 二氧化鈦奈米粒子的量測。

本研究分別採用“Coulter N4SD Submicron Particle Size Analyzer”與掃描式電子顯微鏡 (SEM, scanning electron microscope) 來量測二氧化鈦奈米粒子之粒徑大小。

2. 二氧化鈦奈米粒子細胞毒性的評估。

本研究採用 Colony formation assay[1-3] 二氧化鈦奈米粒子對人類細胞株的細胞毒性。不過由於其實驗頗耗時，用於初期測試適當的暴露濃度與暴露時間會耗去太多時間，因此改採用實驗進行速度較快的 MTT assay[4-6] 適當的暴露濃度與暴露時間，再以 Colony formation assay 來評估其細胞毒性。

3. 利用生物晶片分析二氧化鈦奈米粒子在人類肺部上皮細胞以及人類淋巴球母細胞所誘發之基因。

4. 利用分析軟體找出二氧化鈦奈米粒子所誘發之特定基因及其生物性標記。

第二章 文獻回顧

第一節 奈米粒子的生物毒性

空氣中的極細微懸浮粒子 (ultrafine particle) 是否會對人體造成不良影響，一直是環境毒物學家最關心的問題，目前已有流行病學研究認為其會影響人體肺部的健康狀況[7-12]。還有另外一些研究認為其會造成全身性發炎反應 (systemic inflammation) 與血栓形成 (thrombosis)，並導致心血管疾病[12-20]。尚有一些研究利用動物實驗證實奈米粒子會引起肺部嚴重的發炎反應 (inflammation response) [21-38]。使用細胞株在活體外進行實驗的研究則認為奈米粒子會使細胞進行導致發炎的反應，並釋放出促使細胞發炎的物質，如 IL-8 (interleukin-8) [39,40]。此外細胞的基因表現也指出細胞承受很大的氧化壓力 (oxidative stress) [41-43]。

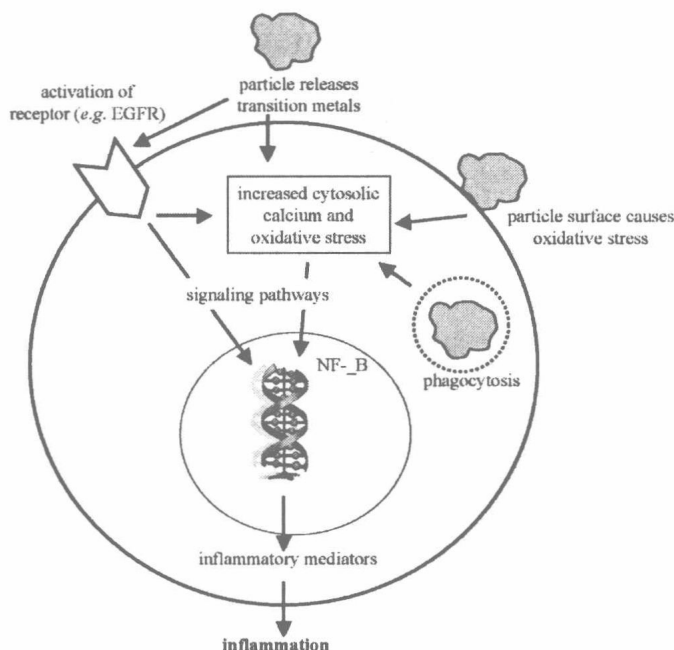
第二節 奈米粒子造成生物毒性的分子機制

到目前為止的研究認為，奈米粒子之所以具有生物毒性，主要是因為奈米粒子能產生反應性氧族 (Reactive Oxygen Species, ROS)。其產生 ROS 的方式有以下三種可能：

1. 奈米粒子受到光照或是接觸到過渡元素 (transition metal)，產生電子電洞對 (electron-hole pair)，並釋放出自由電子 (free electron)，進而形成 ROS [41-52]。圖 1 是以碳六十富勒烯 (fullerene C₆₀，化學式為 C₆₀H₆₀)，為例說明，其它如二氧化鈦奈米粒子以及量子點 (quantum dot) 等，也都會有類似的性質。
2. 奈米粒子在人體內藉由細胞色素 P450 (cytochrome P450) 代謝時，產生活性還原中間產物。
3. 奈米粒子引起的發炎反應也會導致巨嗜細胞 (macrophage) 釋放出 ROS。圖 2 說明奈米粒子如何引起發炎反應。



圖2 奈米粒子造成氧化壓力升高，並引起發炎反應



6