

纳米材料对斑马鱼的氧化损伤及应激效应研究

熊道文^{1,2}, 方涛^{1*}, 陈旭东¹, 司马小峰^{1,2}, 朱文涛^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以斑马鱼(*Danio rerio*)为受试动物,研究了纳米及常规 TiO₂、ZnO 悬浮液对其鳃、消化道及肝脏的氧化损伤及应激效应,同时对纳米及常规 TiO₂、ZnO 悬浮液中的颗粒形貌特征及·OH生成量进行了测定.结果发现,虽然纳米 TiO₂、ZnO 颗粒与其常规颗粒在溶液中的粒径分布接近,但 50 mg/L 纳米 TiO₂、ZnO 悬浮液中·OH产生量(96 h 光照下,分别为 2.17 mmol/L、0.72 mmol/L)远远高于 50 mg/L 常规颗粒(未检测到).50 mg/L 纳米 TiO₂ 处理下,斑马鱼肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、蛋白质羰基含量分别为对照的 70.2%、65.4%、53%、178.1%;消化道中 SOD 活性及 GSH、丙二醛(MDA)含量分别为对照的 149.6%、212.9%、217.2%;鳃中 MDA 含量为对照的 160.9%.而 50 mg/L 常规 TiO₂ 悬浮液对斑马鱼没有产生毒理效应.5 mg/L 纳米及常规 ZnO 对斑马鱼肝脏的氧化伤害最强,其中 5 mg/L 纳米 ZnO 处理组中 SOD、CAT 活性及 GSH、MDA 含量分别为对照的 62.9%、53.1%、45.2%、204.2%,5 mg/L 常规 ZnO 处理组中 SOD、CAT 活性及 GSH、MDA 含量分别为对照组 48.3%、51.8%、34.6%、289.6%;虽然斑马鱼鳃及消化道也受到明显氧化应激效应($p < 0.05$),但并没有受到氧化损伤.研究表明,团聚作用对不同化学组成纳米颗粒的毒性影响程度不同;且不同化学组成纳米颗粒在生物体内可能通过不同机制产生了不同种类的 ROS,从而对不同细胞组分产生的氧化损伤及应激效应是其重要的毒理机制.

关键词:纳米颗粒;TiO₂;ZnO;斑马鱼;氧化应激;氧化损伤

中图分类号:X171.5 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2010)05-1320-08

Oxidative Stress Effects and Damage of Nanoscale TiO₂ and ZnO on Zebrafish

XIONG Dao-wen^{1,2}, FANG Tao¹, CHEN Xu-dong¹, SIMA Xiao-feng^{1,2}, ZHU Wen-tao^{1,2}

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The oxidative stress effects and damage of nanoscale zinc oxide (nZnO), titanium dioxide (nTiO₂) and their bulk counterparts (i. e., ZnO/bulk, TiO₂/bulk) suspension on gill, intestine and liver of zebrafish (*Danio rerio*) were studied, as well as the characterization of nZnO, nTiO₂ ZnO/bulk and TiO₂/bulk and the amount of ·OH in suspension in the presence of light were studied. The results show that the size distribution of nanoparticle and bulky particle are similar in suspension, while the amount of ·OH in 50 mg/L nTiO₂, nZnO suspension are 2.17 mmol/L, 0.72 mmol/L respectively in the presence of 96 h illumination, which is much higher than that of 50 mg/L bulky particle suspension(not detected). As exposed to 50 mg/L nTiO₂ suspension, in contrast to control, the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and reduced glutathione (GSH), protein carbonyl content in liver tissue of zebrafish are 70.2%, 65.4%, 53%, 178.1% respectively, and the SOD activity and GSH, malondialdehyde (MDA) content in digestive tract are 149.6%, 212.9% and 217.2% respectively. The MDA content in gill is 160.9% than that of control as exposed to 50 mg/L nTiO₂ suspension. However, there are no toxic effects on zebrafish after 96 h exposure to 50 mg/L TiO₂/bulk suspension. The strongest oxidative damage is found in liver tissue of zebrafish as exposed to 5 mg/L nZnO and ZnO/bulk suspension for 96 h. In contrast to control, the SOD, CAT activity and GSH, MDA content are 62.9%, 53.1%, 45.2% and 204.2% after 96 h exposure to 5 mg/L nZnO suspension, and 48.3%, 51.8%, 34.6%, 289.6% after 96 h exposure to 5 mg/L ZnO/bulk suspension. Significant oxidative stress is also found both in gill and intestine. However, there is no oxidative damage on gill and intestine. The experiment results indicated that the effects of agglomeration on nanoparticle of different chemical composition are various. The oxidative stress and damages induced by reactive oxygen species (ROS) which generated through different way by nanoparticle of different chemical composition might play a role in the bio-toxicity of nanoparticle.

Key words: nanoparticle; TiO₂; ZnO; zebrafish; oxidative stress; oxidative damage

纳米金属氧化物(如纳米 TiO₂、ZnO)由于具有光催化、光电化学等特殊的理化性质而被广泛应用于生产及生活的各个领域.但同时纳米颗粒也可通过生活及工程应用等途径^[1-3]进入水环境,并对水生生物产生一定的毒性作用.毒理学实验表明纳米

收稿日期:2009-07-23;修订日期:2009-09-22

基金项目:国家水体污染控制与治理科技重大专项(2008ZX07103-001)

作者简介:熊道文(1984~),男,硕士研究生,主要研究方向为水污染控制化学,E-mail: todxiong53@163.com

* 通讯联系人, E-mail: fangt@ihb.ac.cn

TiO₂、ZnO 对水体中的微囊藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)^[4]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[5]、大型溞 (*Daphnia magna*)^[6-8] 及斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎^[9,10] 等水生生物具有不同程度的抑制及致死效应,其中纳米 ZnO 的毒性明显高于纳米 TiO₂,且处理方式对纳米 TiO₂ 的毒性影响较大^[11]. 同时纳米 TiO₂ 对虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*)^[12] 多个组织器官及金鱼 (*Carassius auratus*) 表皮细胞^[13] 也有脂质及 DNA 氧化损伤作用. 纳米颗粒的这种毒性一般认为是由其尺寸小及比表面积大引起的^[11,14],但团聚作用使纳米 TiO₂ 及 ZnO 在水中的实际尺寸与其常规颗粒十分接近^[15],因此不能简单地将其毒性作用归结为由粒径小、比表面积大所引起^[16]. 深入研究发现纳米金属氧化物颗粒(如纳米 TiO₂)能通过光照^[17,18] 及干扰细胞代谢及细胞间相互作用^[19] 等过程促进 ROS 生成,过量生成 ROS(如·OH)可能会破坏机体本身的抗氧化机制^[20],从而对生物产生毒理效应^[19,21]. 研究发现纳米颗粒能致使实验动物脑部^[22]、肝脏^[23] 等组织器官受到过氧化损伤. 但目前对纳米材料的水生态毒理学研究(特别是其机制的研究)尚处于起步阶段. 纳米 TiO₂ 及 ZnO 对成年斑马鱼的氧化损伤及应激效应研究还很少有报道,相关的毒理学资料也十分缺乏. 为此本实验表征了纳米 TiO₂ 及 ZnO 水溶液的形貌并测定了纳米 TiO₂ 及 ZnO 水溶液中·OH的产生量,同时以斑马鱼 (*Danio rerio*) 为实验动物研究了纳米颗粒对其组织器官的氧化损伤及应激效应,以探讨并初步揭示金属纳米氧化物颗粒的毒性效应机制.

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年斑马鱼 (*Danio rerio*) 由中国科学院水生生物研究所鱼类分子病理学学科组提供. 成年斑马鱼(鱼龄 120 d 左右)平均全长为 3.02 cm ± 0.33 cm,平均体重为 0.223 g ± 0.05 g,在实验室内驯养 7 d 后用于急性毒性实验(驯养期间无斑马鱼死亡),驯养期间养殖水为曝气自来水,控制水温为 23℃ 左右,光照/黑暗周期为 12 h:12 h,每日喂食 2 次人工孵化的丰年虫.

1.2 试剂与仪器

试剂:纳米 TiO₂(锐钛矿 30 nm)和纳米 ZnO(30 nm)购自南京工业大学纳米应用研究中心,常规 TiO₂(分析纯)购自天津市科密欧化学试剂开发中

心,常规 ZnO(分析纯)购自天津市广成化学试剂有限公司. 纳米及常规 TiO₂、ZnO 颗粒悬浮液采用透射电镜进行表征,并采用激光动态光散射系统测定粒径分布. 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)及丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物研究所. 盐酸胍及硫酸链霉素分别购自 Amresco 公司及 Duchefa 公司,其它化学试剂均为分析纯试剂.

仪器:JEM-100CXII 型透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)、JL-360 型超声波清洗仪(上海杰理科技有限公司)、3000HS 型纳米粒度分析仪(英国马尔文公司)、752 型分光光度计(上海精密仪器仪表有限公司)、SP3400 型气相色谱仪(北京瑞利分析仪器厂).

毒性实验用水为曝气单蒸水,采用超声分散(20 min)配制不同浓度的暴露液. 为了尽量减小纳米颗粒团聚对其毒性的影响,毒性实验用水中不再加入其他营养盐,所有暴露液均为当天配制.

1.3 毒性实验及生理生化指标测定

由于纳米 ZnO 的毒性明显高于纳米 TiO₂^[9,10],另外通过预实验发现当纳米 ZnO 及 TiO₂ 的浓度分别高于 5 mg/L 及 50 mg/L 时就能造成斑马鱼死亡,因此本实验中选择纳米 ZnO 及 TiO₂ 的浓度分别为 5 mg/L 及 50 mg/L. 斑马鱼毒性实验参照 GB/T 13276-1991,水量以鱼的负荷计算约 1 L 水中暴露 1 g 鱼,实验中每 1.5 L 试液中随机暴露 7 尾驯养后的斑马鱼(约 1.561 g),同时暴露期间对水质监测表明暴露液中 DO 均在 4.10 mg/L 以上,因此认为本实验中可以忽略缺氧对实验结果的影响. 实验采取半静态方式,每天更换全部试液以确保适宜的水质和稳定的暴露浓度. 以常规 TiO₂、ZnO 悬浮液及实验用水作对照,所有实验组设 3 个平行. 实验结束后立即将斑马鱼处死,解剖取肝脏、腮及消化道组织,冷生理盐水漂洗,滤纸充分吸干水分,称湿重. 加入预冷的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH = 7.8),冰浴中用玻璃匀浆器制成 1% 组织匀浆,10 000 r/min 离心,取上清, -20℃ 冷藏,1 d 内测定 SOD、CAT 的活性,1 周内测定 MDA、GSH 及蛋白质羰基含量. SOD、CAT、MDA 及 GSH 的测定参照试剂盒说明,蛋白质含量用考马斯亮兰法测定,蛋白质羰基测定方法见文献[23].

SOD 酶活力单位定义为:每 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个酶活力单位(U). CAT 酶活力单位定义为:

每 g 组织蛋白中 CAT 每 s 分解吸光度为 0.50 ~ 0.55 的底物中的过氧化氢相对量为 1 个 CAT 的酶活力单位(U). GSH 以每 g 组织蛋白中 GSH 的 mg 数来表示. MDA 及蛋白质羰基以每 mg 组织蛋白中 MDA 及蛋白质的 nmol 数表示.

1.4 纳米及常规颗粒悬浮液中 $\cdot\text{OH}$ 的测定方法

纳米悬浮液中 $\cdot\text{OH}$ 的测定方法见文献[24], 并略做修改. 超声分散配制 50 mg/L 及 5 mg/L 的纳米及常规 TiO_2 、 ZnO 悬浮液, 置于 50 mL 比色管中, 分别于上述悬浮液中加入 5 mL 1% 异丙醇及 100 μL 10 mmol/L 的 FeCl_3 , 置于与毒性实验相同的环境条件中(温度、光照强度), 于不同时间取 2 mL 悬浮液, 经 10 000 r/min 离心分离, 取上清液过 0.22 μm 滤膜, GC/FID 测定丙酮及异丙醇含量. 由于异丙醇对 $\cdot\text{OH}$ 的捕获效率为 86.7%^[25], 因此, $c_{\cdot\text{OH}} = c_{\text{丙酮}}/0.867$.

气相色谱条件: FFAP 30 m $\times$ 530 μm , 升温程序为: 70 $^{\circ}\text{C}$ 保持 4 min, 以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温到 250 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min, 进样口温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 载气: N_2 , 40 mL/min, FID 检测器温度 300 $^{\circ}\text{C}$.

1.5 数据处理与统计分析

毒理实验均设 3 个平行, 实验结果表示为平均数 $\pm$ 标准误差 (Mean $\pm$ SD), 实验数据采用 SPSS16.0 统计软件进行方差分析 (One Way ANOVA), 并以 Tukey's test 进行各组均数的多重比较, $p < 0.05$ 表示有显著性差异, $p < 0.01$ 表示差异极显著.

2 结果与分析

2.1 纳米悬浮液的表征

纳米及常规颗粒悬浮液中颗粒的粒径分布见表 1, 透射电镜结果见图 1.

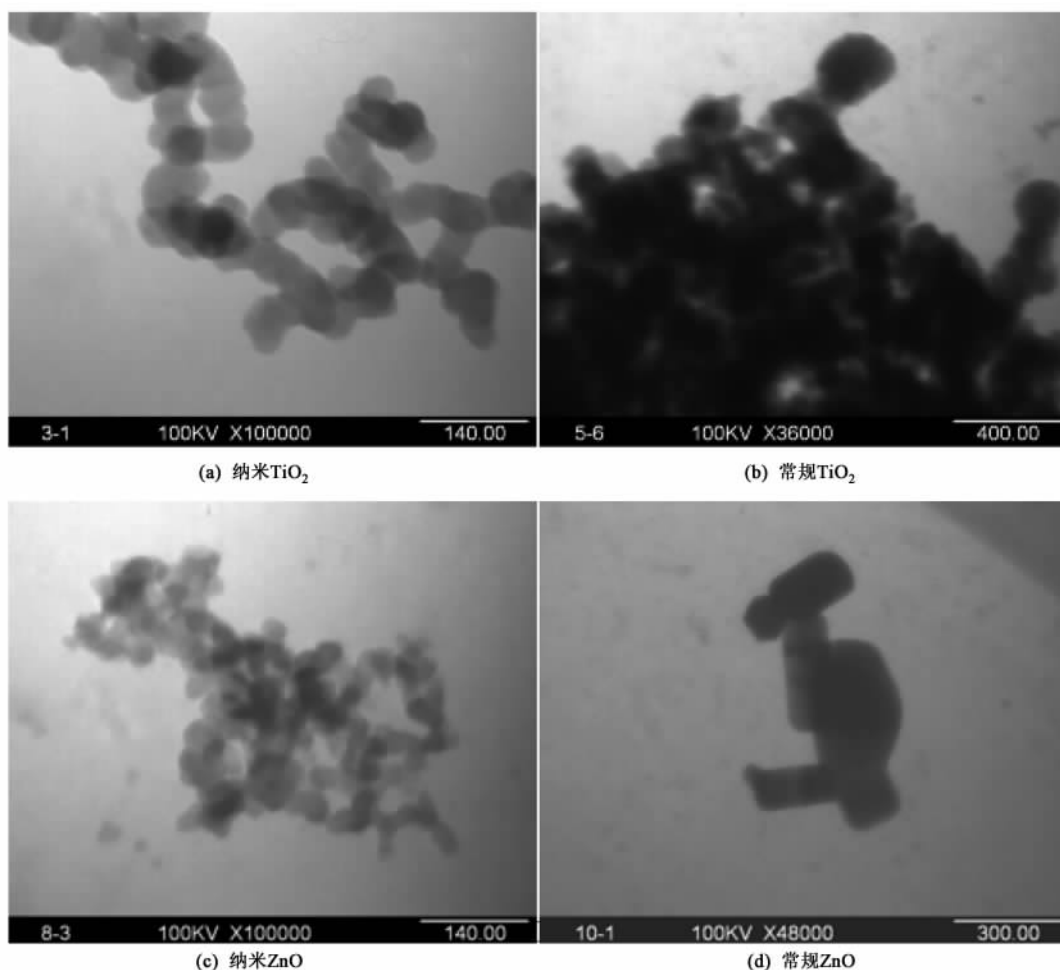


图 1 纳米及常规 TiO_2 、 ZnO 悬浮液透射电镜照片

Fig. 1 TEM images of nTiO_2 , ZnO and their bulk counterparts in suspension

表 1 纳米及常规 TiO₂ 及 ZnO 在水溶液中的粒径分布

Table 1 Size distribution of nTiO₂, nZnO, TiO₂/bulk and ZnO/bulk particles in aqueous suspension

材料	浓度 /mg · L ⁻¹	平均粒径 /nm	分布范围 /nm
纳米 TiO ₂ (锐钛矿)	50	403	251 ~ 630
纳米 TiO ₂ (锐钛矿)	5	371	249 ~ 488
常规 TiO ₂	50	438.7	272 ~ 597
常规 TiO ₂	5	440	358 ~ 516
纳米 ZnO	50	658.3	423 ~ 1 722
纳米 ZnO	5	449.1	201 ~ 1 269
常规 ZnO	50	744.4	428 ~ 1 076
常规 ZnO	5	810.7	708 ~ 971

从图 1 及表 1 可以看出纳米颗粒在溶液中大部分以团聚体形式存在,且团聚体半径在几百 nm 范围内,与常规颗粒在水中的粒径分布十分相近.从透射电镜照片可以看出,本实验中所使用的纳米 TiO₂ 及 ZnO 颗粒的初始颗粒粒径大致为 30 nm 左右,与厂家提供的数据(平均粒径为 30 nm)基本一致.

2.2 纳米悬浮液对斑马鱼组织器官的氧化应激效应及氧化损伤

不同处理条件下,斑马鱼鳃、消化道及肝脏中 SOD、CAT 活性及 GSH、MDA、蛋白质羰基含量见图 2 ~ 4.

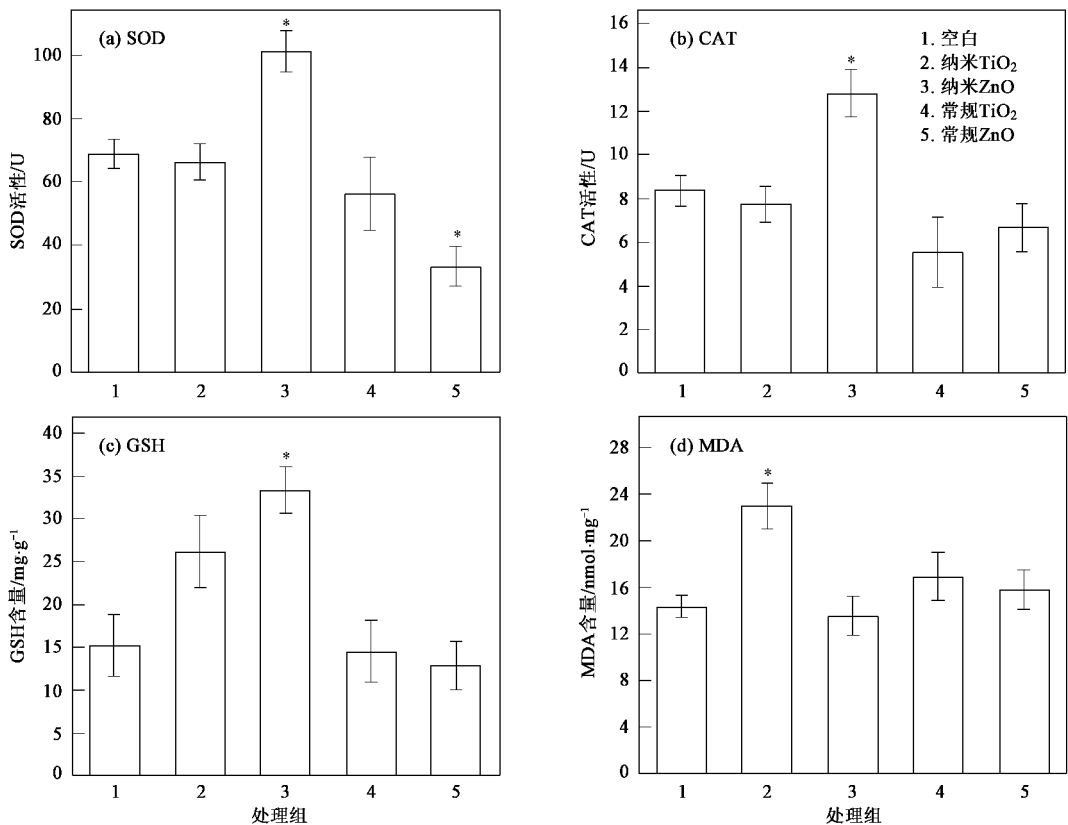


图 2 斑马鱼鳃中各生化指标 (*表示 $p < 0.05$)

Fig. 2 Activity of SOD & CAT and amount of GSH & MDA in gill of zebra fish

从图 2 可以看出 50 mg/L 纳米 TiO₂ 悬浮液暴露下斑马鱼鳃中 MDA 含量为空白对照的 160.9% ($p < 0.05$),表明其对斑马鱼鳃造成了脂质过氧化反应.但同样实验条件下 50 mg/L 常规 TiO₂ 悬浮液对斑马鱼鳃各生理生化指标没有影响.5 mg/L 纳米及常规 ZnO 悬浮液对斑马鱼鳃均有一定影响,具体为 5 mg/L 纳米 ZnO 对 SOD、CAT 及 GSH 均表现出明显的诱导效应,分别为对照的 146.6%、153.6%、219.1% ($p < 0.05$);而 5 mg/L 常规 ZnO 对 SOD 活

性(为对照组的 48.7%)具有抑制作用, ($p < 0.05$).表明 5 mg/L 纳米及常规 ZnO 对斑马鱼鳃产生了氧化应激效应,但均没有对斑马鱼鳃造成明显的脂质过氧化损伤.

从图 3 可以看出,纳米颗粒悬浮液对斑马鱼消化道产生了明显的毒理效应.50 mg/L 纳米 TiO₂ 悬浮液 96 h 暴露下,斑马鱼消化道中 SOD 活性及 GSH 含量分别为对照的 149.6%、212.9% ($p < 0.05$),5 mg/L 纳米 ZnO 悬浮液导致斑马鱼消化道

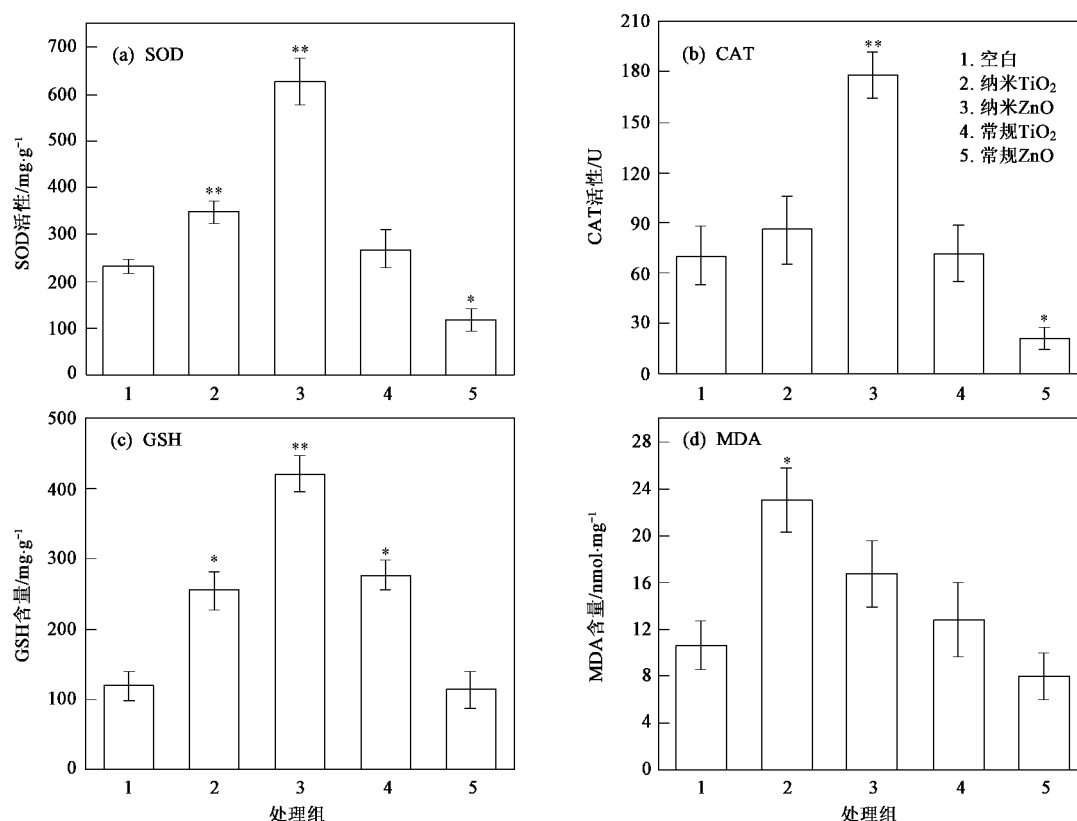


图3 斑马鱼消化道中各生化指标 (*表示 $p < 0.05$, **表示 $p < 0.01$)

Fig. 3 Activity of SOD & CAT and amount of GSH & MDA in intestine of zebra fish

中 SOD、CAT 活性及 GSH 含量分别为对照的 269.2%、253.0%、350.8% ($p < 0.01$), 表明纳米颗粒产生了一定量的 ROS, 并造成了氧化应激效应; 另外 50 mg/L 纳米 TiO₂ 悬浮液暴露下消化道中 MDA 含量 (为对照的 217.2%) 也明显升高 ($p < 0.05$), 造成了消化道脂质过氧化损伤。50 mg/L 常规 TiO₂ 悬浮液暴露下斑马鱼消化道中仅 GSH 含量明显升高 ($p < 0.05$)。而 5 mg/L 常规 ZnO 悬浮液暴露下, SOD、CAT 活性受到明显的抑制作用 ($p < 0.05$), 造成了强烈的氧化应激效应, 这可能是纳米 ZnO 颗粒在消化道内积累过高的缘故。但 5 mg/L 纳米及常规 ZnO 悬浮液暴露下, 均没有造成斑马鱼消化道产生过氧化损伤。

从图 4 可以看出肝脏中各指标对纳米颗粒悬浮液 (50 mg/L 纳米 TiO₂ 及 5 mg/L 纳米 ZnO) 十分敏感。其中 50 mg/L 纳米 TiO₂ 处理组中, 斑马鱼肝脏中 SOD、CAT、GSH 及蛋白质羰基含量分别为对照的 70.2%、65.4%、53%、178.1% ($p < 0.05$); 5 mg/L 纳米 ZnO 处理组中 SOD、CAT 活性及 GSH、MDA 含量分别为对照的 62.9%、53.1%、45.2%、204.2%

($p < 0.05$)。表明斑马鱼肝脏抗氧化系统受到严重影响, 可能是由于纳米颗粒产生了过量的 ROS, 而对肝脏造成了强烈的氧化应激效应, 破坏了抗氧化机制。而从 MDA 及蛋白质羰基含量可以看出, 50 mg/L 纳米 TiO₂ 及 5 mg/L 纳米 ZnO 悬浮对斑马鱼肝脏分别产生了蛋白质过氧化损伤和脂质过氧化损伤。同时 50 mg/L 常规 TiO₂ 悬浮液对斑马鱼肝脏并没有产生明显的影响, 各指标与空白组相比无统计学意义 ($p > 0.05$)。而 5 mg/L 常规 ZnO 对斑马鱼肝中的 SOD、CAT 活性及 GSH 含量产生了抑制作用 (分别为对照的 48.3%、51.8%、34.6%, $p < 0.05$), 且 MDA 含量为空白对照的 289.6% ($p < 0.05$), 表明肝组织细胞受到了过氧化损伤。

2.3 纳米悬浮液中 ·OH 的测定

毒性实验条件下, 纳米悬浮液中 ·OH 含量测定结果见图 5。

从图 5 可以看出 50 mg/L 的纳米 TiO₂ 及 ZnO 悬浮液中 ·OH 含量随时间的延长而不断的增加, 光照 96 h 时 50 mg/L 纳米 TiO₂、ZnO 悬浮液中 ·OH 的含量分别为 2.17 mmol/L、0.72 mmol/L。50 mg/L

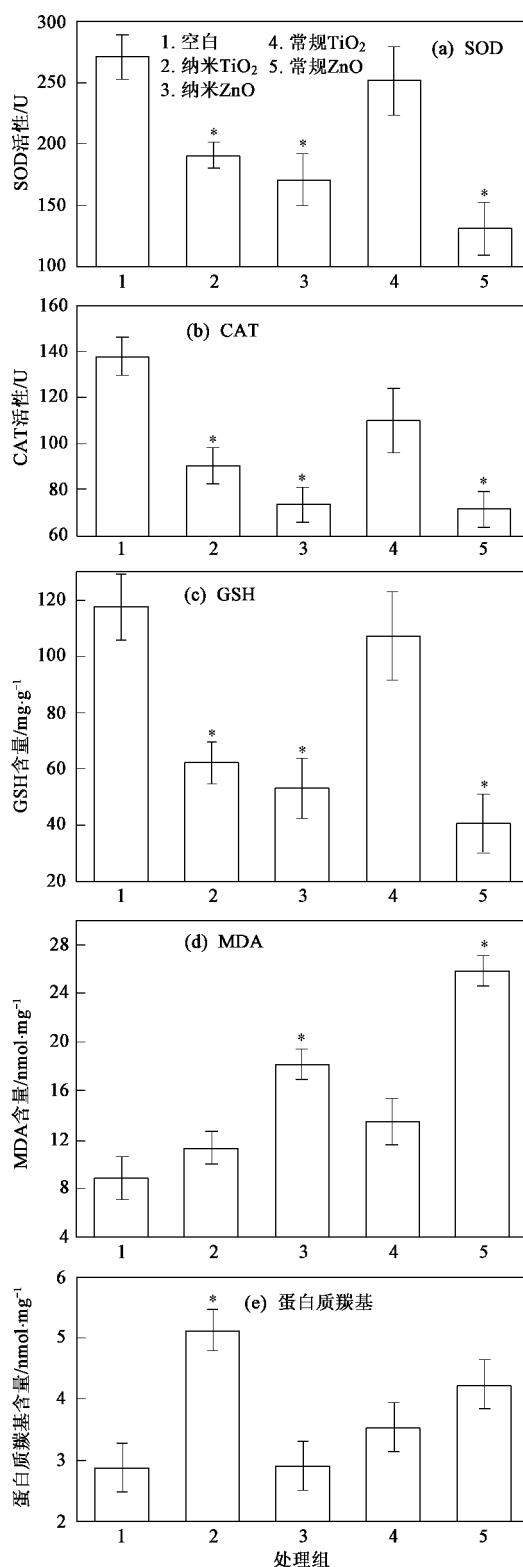


图4 斑马鱼肝脏中各生化指标 (*表示 $p < 0.05$)

Fig. 4 Activity of SOD&CAT and amount of GSH,MDA and protein carbonyl content in liver of zebra fish

常规 TiO₂、ZnO 及 5 mg/L 纳米及常规 TiO₂、ZnO 悬浮液中均没有检测到 ·OH; 同时异丙醇浓度 (数据

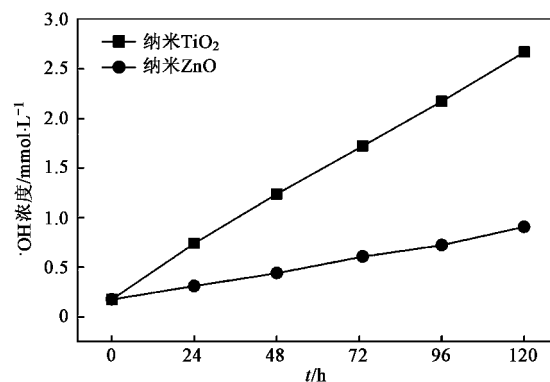


图5 50 mg/L 纳米悬浮液中 ·OH 含量与时间关系

Fig. 5 Interrelationship histogram of the concentration of ·OH with time in 50 mg/L nanoparticle suspension

未给出) 在 120 h 内也没有发生变化, 表明没有 ·OH 产生或产生量低于检测限。

3 讨论

超氧化物歧化酶 (SOD) 是清除超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 的专一性酶, 在生物体内最先与 $O_2^{\cdot-}$ 作用, 将其分解为 H_2O_2 和 O_2 , 其是最重要的抗氧化酶之一; 过氧化氢酶 (CAT) 可以将 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 , 从而降低 ROS 含量; 还原性谷胱甘肽 (GSH) 作为抗氧化剂, 在清除活性氧 (如 H_2O_2) 的过程中发挥着重要作用^[26]. SOD、CAT 及 GSH 既可由于轻度暴露而产生适应性诱导反应, 也可由于重度污染 (过量的 ROS) 产生中毒反应, 即受到抑制. 丙二醛 (MDA) 及蛋白质羰基作为脂质及蛋白质过氧化损伤的产物, 其含量的高低直接指示了过氧化损伤的程度。

粒径分布结果表明纳米颗粒在溶液中的粒径分布与常规颗粒十分接近, 但是不同化学组成的纳米颗粒与常规颗粒对斑马鱼鳃部的毒性作用各不相同. 其中暴露于 50 mg/L 纳米 TiO₂ 悬浮液下, 斑马鱼鳃受到了脂质过氧化损伤; 而 50 mg/L 常规 TiO₂ 悬浮液对斑马鱼鳃没有影响. 5 mg/L 纳米及常规 ZnO 悬浮液虽都能对斑马鱼鳃造成了明显的氧化应激效应, 但二者均没有造成过氧化损伤. 同时 ·OH 测定结果表明仅 50 mg/L 的纳米 TiO₂ 及 ZnO 中有 ·OH 产生, 这说明 50 mg/L 纳米 TiO₂ 悬浮液对斑马鱼鳃造成的过氧化损伤可能是其在光照下产生的 ·OH (96 h 时悬浮液中的 ·OH 含量为 2.17 mmol/L) 造成的. 这是因为 ·OH 是 ROS 中毒性最强的一种自由基^[27], 几乎可以和所有的细胞组分反应^[26,28]. 虽

然·OH 的寿命很短(一般 $<10^{-4}$ s)^[29],但斑马鱼鳃能与纳米 TiO₂ 悬浮液直接接触,所以光照下纳米悬浮液中及粘附在斑马鱼鳃上的纳米颗粒产生的·OH可能会直接作用于鳃,从而对斑马鱼鳃造成脂质过氧化反应. Federici 等^[12]也发现纳米 TiO₂ 悬浮液能造成虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)腮脂质过氧化损伤. 另外本研究中 50 mg/L 纳米 TiO₂ 暴露下斑马鱼鳃中的 SOD、CAT 及 GSH 指标均没有变化. Oberdörster 等^[22]也发现用 H₂O₂ 作为阳性对照暴露大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)时,对其鳃部产生了明显的脂质过氧化反应,但对鳃部其他生化指标没有影响. 表明·OH 可能只是作用于细胞外,并没有进入细胞内.

通过摄食等途径摄取的纳米金属氧化物颗粒不仅可以在斑马鱼消化道表面沉积^[30],还可以通过渗透、血液循环等方式进入其他组织器官中^[31]. 因此纳米颗粒对斑马鱼消化道及肝脏均能造成毒理效应. 同时纳米颗粒除了在光照下产生 ROS 外,还可能有以下 2 种机制:纳米 TiO₂、ZnO 颗粒干扰细胞代谢活动产生 ROS^[19];干扰细胞之间的相互作用促进 ROS 的生成^[32],因此即使没有光照纳米 TiO₂ 也能对斑马鱼体内组织器官造成过氧化伤害. 斑马鱼消化道中 CAT、SOD 活性及 GSH 含量表明纳米 TiO₂、ZnO 在肠道中产生了过量的 ROS,造成了肠道的氧化应激效应;同时 50 mg/L 纳米 TiO₂ 及 5 mg/L 纳米 ZnO 对斑马鱼肝脏中所有被测指标都产生了明显毒理作用,这可能是因为肝脏是纳米颗粒毒性作用的主要靶器官之一^[33]. 各个组织器官中抗氧化系统的失衡可能导致 ROS 生成量的进一步提高^[34]. 表明 ROS 的过量生成是纳米 TiO₂ 及 ZnO 的重要毒理作用机制. 同时 50 mg/L 纳米 TiO₂ 对斑马鱼消化道造成了脂质过氧化损伤,对肝脏造成了蛋白质过氧化损伤;而 5 mg/L 纳米及常规 ZnO 仅对斑马鱼肝脏造成了脂质过氧化损伤. 表明不同化学组成的纳米颗粒可能通过不同的 ROS 生成机制产生了不同种类的 ROS;另外也可能是不同化学组成的纳米颗粒分别作用于不同的细胞组织,从而纳米 TiO₂ 及 ZnO 对斑马鱼肝细胞造成了不同细胞组分的过氧化损伤,具体作用机制还需要深入研究.

粒径分布结果表明纳米 TiO₂、ZnO 在溶液中均团聚为与常规 TiO₂、ZnO 十分接近的团聚体. 但毒理学实验表明,50 mg/L 纳米 TiO₂ 对斑马鱼各组织器官有过氧化损伤及氧化应激效应,而 50 mg/L 常规 TiO₂ 对斑马鱼基本没有影响. 相对的,5 mg/L 纳

米及常规 ZnO 对斑马鱼各组织器官的影响程度十分接近. 从此可以看出团聚对纳米 ZnO 的毒性影响较大,对纳米 TiO₂ 的影响很小. 说明团聚作用对不同化学组成的纳米颗粒的影响程度不同,这可能与不同化学组成颗粒的表面特征及晶体结构有关,也可能是不同化学组成的纳米颗粒的毒理作用机制不同所致. 因为 ZnO 的主要毒理机制可能主要是由本身的物理化学性质^[9,10]及 ZnO 中溶出部分 Zn²⁺^[35]所形成的.

4 结论

(1) 50 mg/L 纳米 TiO₂ 及 ZnO 悬浮液在普通日光灯照射下·OH 产生量随着时间延长而增加;而 5 mg/L 的纳米 TiO₂、ZnO 及常规颗粒悬浮液中·OH 的生成量低于检测限. 光照下 50 mg/L 纳米 TiO₂ 悬浮液中生成的·OH 能直接作用于斑马鱼鳃细胞,并不需要进入细胞就能对斑马鱼鳃造成过氧化损伤,这可能是其重要毒理效应机制之一.

(2) 粒径分布结果表明 50 mg/L、5 mg/L 纳米 TiO₂ 及 ZnO 在溶液中均存在团聚作用. 但团聚作用对 50 mg/L 纳米 TiO₂ 悬浮液的毒性影响明显不同于其对 5 mg/L 纳米 ZnO 悬浮液的毒性影响. 表明团聚作用对纳米颗粒的毒性具有一定程度的影响,但对不同化学组成纳米颗粒的水生态毒性的影响程度有所不同.

(3) 50 mg/L 纳米 TiO₂ 及 5 mg/L 纳米 ZnO 悬浮液对斑马鱼消化道及肝脏均产生了严重氧化应激效应,同时 50 mg/L 纳米 TiO₂ 及 5 mg/L 纳米 ZnO 悬浮液对斑马鱼肝细胞造成了不同细胞组分的过氧化损伤. 表明纳米颗粒在生物体内产生 ROS 对斑马鱼造成的毒理作用是其重要毒理效应机制. 但不同化学组成成分的纳米颗粒在细胞内产生 ROS 的机制可能各不相同而产生的 ROS 种类也不同;同时不同化学组成成分的纳米颗粒对细胞的毒性作用机制也可能各不相同.

参考文献:

- [1] Daughton C G, Ternes T A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? [J]. Environ Health Persp, 1999, 107 (Supplement 6): 907-938.
- [2] Ternes T A, Joss A, Siegrist H. Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38 (20), 392-399.
- [3] Handy R D, Shaw B J. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology [J]. Health Risk

- Soc, 2007, **9**(2):125-144.
- [4] Aruoja V, Dubourguier H C, Kasemets K, *et al.* Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* [J]. *Sci Total Environ*, 2009, **407**(4):1461-1468.
- [5] Adams L K, Lyon D Y, Alvarez P J J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions [J]. *Water Res*, 2006, **40**(19):3527-3532.
- [6] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, *et al.* Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus* [J]. *Chemosphere*, 2008, **71**(7):308-1316.
- [7] Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, *et al.* Acute and chronic effects of nano-and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2009, **76**(10):1356 -1365.
- [8] Zhu X S, Lin Z, Monishing C, *et al.* Acute toxicities of six manufactured nanomat suspensions to *Daphnia magna* [J]. *J Nanopart Res*, 2009, **11**(10):67-75.
- [9] Zhu X S, Zhu L, Duan Z H, *et al.* Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage [J]. *Environ Sci Health*, 2008, **43**(3):278-284.
- [10] 刘红云,白伟,张智勇,等. 纳米氧化物对斑马鱼胚胎孵化率的影响 [J]. *中国环境科学*, 2009, **29**(1):53-57.
- [11] Lovern S B, Klaper R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2006, **25**(4):1132-1137.
- [12] Federici G, Shaw B J, Handy R D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects [J]. *Aquat Toxicol*, 2007, **84**(4):415-430.
- [13] Reeves J F, Davies S J, Dodd N J F, *et al.* Hydroxyl radicals (·OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells [J]. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2008, **640**(1-2): 113-122.
- [14] 汪冰, 王伟悦, 赵宇亮, 等. 纳米材料的生物效应及其毒理学研究进展 [J]. *中国科学: B 辑*, 2005, **35**(1):1-10.
- [15] Zhang Y, Chen Y, Westerhoff P, *et al.* Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water [J]. *Water Res*, 2007, **42**(8/9):1-9.
- [16] Warheit D B, Webb T R, Sayes C M, *et al.* Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area [J]. *Toxicol Sci*, 2006, **91**(1):227-236.
- [17] Jiang J K, Oberdörster G, Eledr A, *et al.* Does nanoparticle activity depend upon size and crystal phase? [J]. *Nanotoxicology*, 2008, **2**(1): 33-42.
- [18] 任学昌,史载锋,孔令仁,等. TiO₂ 薄膜光催化体系中羟基自由基的水杨酸分子探针法测定 [J]. *环境科学学报*, 2008, **28**(4): 705-709.
- [19] Long T C, Saleh N, Tilton R D, *et al.* Titanium dioxide (P₂₅) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, **40**(14):4346-4352.
- [20] Brown D M, Donaldson K, Borm P J, *et al.* Calcium and ROS-mediated activation of transcription factors and TNF-alpha cytokine gene expression in macrophages exposed to ultrafine particles [J]. *Am J Physiol-Lung C*, 2004, **286**(2): 344-353.
- [21] Nel A, Xia T, Mädler L, *et al.* Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. *Science*, 2006, **311**(5761): 622-627.
- [22] Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induces oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass [J]. *Environ Health Persp*, 2004, **112**(10): 1058-1062.
- [23] 王江伟,崔萌萌,赵明明,等. 多壁碳纳米管对小鼠肝和肺细胞蛋白质氧化损伤作用研究 [J]. *医学研究杂志*, 2008, **37**(4):17-19.
- [24] 张琳,张喆,吴峰,等. 水中铁(Ⅲ)-草酸盐配合物光解产生羟基自由基的测定 [J]. *环境化学*, 2002, **21**(1):87-91.
- [25] Hislop K A, Bolton J R. The photochemical generation of hydroxyl radicals in the UV-Vis/Ferrioxalate/H₂O₂ system [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, **33**(18):3119-3126.
- [26] Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, *et al.* Active oxygen species generated from photo-excited fullerene (C₆₀) as potential medicines: O²⁻ · versus ¹O₂ [J]. *J Am Chem Soc*, 2003, **125**(42):12803-12809.
- [27] 谷利伟,翁新楚. 食用天然抗氧化剂的研究进展 [J]. *中国油脂*, 1997, **22**(3):37.
- [28] 文镜,张西,常平. 通过检测小鼠体内羟自由基含量评价保健食品的抗氧化功能 [J]. *食品科学*, 2008, **29**(1):286-291.
- [29] 姜艳丽,刘惠玲,姜兆华,等. TiO₂/Ti 光电催化体系中羟基自由基的测定 [J]. *材料科学与工艺*, 2006, **14**(2):162-170.
- [30] Zhang X Z, Sun H W, Zhang Z Y, *et al.* Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles [J]. *Chemosphere*, 2007, **67**(1): 160-166.
- [31] Wang H, Wang J, Deng X, *et al.* Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004, **4**(8):1019-1024.
- [32] Savic R, Luo L, Eisenberg A, *et al.* Micellar nanocontainers distribute to defined cytoplasmic organelles [J]. *Science*, 2003, **300**(5619): 615-618.
- [33] 朱小山,朱琳,郎宇鹏,等. 人工纳米材料富勒烯(C₆₀)低剂量长期暴露对鲫鱼的氧化伤害 [J]. *环境科学*, 2008, **29**(4): 855-861.
- [34] 崔萌萌,黄俊,王江伟,等. 多壁碳纳米管对小鼠肺脏和肝脏组织 SOD 活力 GSH 含量的影响 [J]. *生态毒理学报*, 2008, **3**(2):162-167.
- [35] 曲敏丽,姜万超. 纳米氧化锌抗菌机理探讨 [J]. *印染助剂*, 2004, **21**(6):45-46.