DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2013.07.030

不同纳米材料作用下菲对鲫鱼的毒性效应*

戴朝霞^{1,2**} 尹 颖¹ 王世和³

(1. 污染控制与资源化研究国家重点实验室,南京大学环境学院,南京,210093;2. 江苏城市职业学院城市科学系,南京,210017; 3. 东南大学土木工程学院,南京,210096)

摘 要 研究了纳米材料(多壁碳纳米管和纳米氧化锌)泄漏进入水环境后吸附多环芳烃(菲)对水生生态系统可能造成的影响及其影响机制,以便能及早采取相应的风险管理措施.实验结果表明,多壁碳纳米管(MWCNTs)显著降低了菲(Phe)在鲫鱼肌肉和肝脏中的富集,但增加了其在鱼脑中的富集量;C-Phe 组菲在眼部、胚胎和生殖腺中含量均高于 ZnO-Phe 组. MWCNTs、nZnO 与菲均诱导鲫鱼脑部和肝脏组织中自由基的生成.

关键词 鲫鱼,多壁碳纳米管,纳米氧化锌,菲,生物富集.

随着放射性示踪等技术的应用和纳米材料对小鼠等模式动物毒性效应过程机制研究的逐步深入, 纳米材料在环境中的迁移、转化以及进入水环境、土壤环境后的毒性效应逐渐引起学术界的兴趣^[13].一 般认为纳米材料的疏水性及其在天然水体中的强团聚沉淀作用有可能减轻了纳米材料及其他污染物的 生物毒性,但是也有学者认为纳米材料与污染物结合可能产生更加严重的损坏后果,如增加污染物的生 物活性及转移能力^[4-5].纳米材料在环境水体中不可能单独存在,水体中存在的其他物质会影响纳米材 料的水生毒性,而对纳米材料与其他环境污染物的交互作用的研究被认为是今后研究的重要方向^[6]. Yang 等^[7]研究了氧化铝纳米颗粒的植物毒性,发现未修饰的氧化铝纳米颗粒可以抑制多种植物根的延 长,而在氧化铝纳米颗粒表面吸附(或修饰)菲则可以显著降低这种抑制作用,这可能是由于菲的吸附 使纳米颗粒表面较难产生羟基自由基,从而改变了纳米材料表面特性.碳纳米材料和金属纳米材料在生 产和生活中的应用非常广泛,目前对其可能的生态毒性效应是纳米材料毒性的研究热点.

多环芳烃作为一种典型的持久性有机污染物,已经在世界各地被检出^[8],在中国的各大水体中都大量存在多环芳烃,而且其含量呈现逐渐增加的趋势.目前大量的实验证实了多环芳烃的生态毒性效应^[9-10].进入环境中的纳米材料会影响多环芳烃的水生毒性,纳米材料的性质差异可能引起生物种群或个体代谢速率、个体发育发展等方面的差异.

本研究主要借助¹⁴C同位素示踪和毒理学的方法,研究水环境中纳米材料(多壁碳纳米管(MWCNTs)和纳米氧化锌(nZnO))和多环芳烃(菲,Phe)相互作用导致各自生物有效性的改变以及引起这种改变的原因.重点阐明纳米材料与有机物共存对二者在鲫鱼体内富集分布的相互影响及其机制,并通过单独与共存条件下对生物体靶器官的毒理学指标的研究,探讨纳米材料和多环芳烃复合污染的毒性效应.在关注纳米材料自身生态安全问题的基础上,进一步研究纳米材料与有机污染物的复合生态效应,对水生态环境安全提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: OX500 液体闪烁仪(德国 Bruker 公司),电子顺磁共振仪(Bruker EMX10/12EPR); MICROFUGE22R 高速冷冻离心机(Beckman 公司);UV-1600 紫外可见分光光度计(北京瑞丽);岛津

²⁰¹³年3月21日收稿.

^{*}污染控制与资源化研究国家重点实验室开放基金项目(PCRRF06001);江苏省高等学校大学生实践创新训练计划(2010768)资助.

^{**}通讯联系人, E-mail:77946664@qq.com

RF-5000 型荧光分光光度计(日本岛津公司);DK-S24 恒温水浴锅;Labconco 冷冻干燥仪;超声清洗机;分析天平,BT224S,北京赛多利斯仪器系统有限公司;超纯水系统,Milli-Q,Millipore 公司.

试剂:菲(纯度为 99.99%,购自 Sigma 公司);nZnO(纯度 > 99.9%,粒径 < 50 nm),多壁碳纳米管(MWCNTs,20-40 nm,购自深圳纳米港公司);放射性菲、闪烁液(生物碱,德国 Bruker 公司). 1.2 受试生物

实验对象为幼龄鲫鱼,平均体长9 cm 左右,平均体重(23.4±0.3)g. 鲫鱼在曝气水中驯养7 d 后,随机分出6组,每组10条,放入玻璃鱼缸中(实验前用10% 硝酸和30% 双氧水浸泡2 d),实验用水pH(7.3±0.3),水温(22.2±1)℃,驯养及实验期间幼鱼生长无异常.

1.3 富集实验

纳米材料水悬浮液:MWCNTs 和 nZnO 分别加入到超纯水中,快速(200—300 r·min⁻¹)搅拌 10 min, 再超声 30 min 后,得到相应纳米材料水悬浮液储备液,置于棕色玻璃瓶中,待用.使用前超声 10 min.

选取健康的无体表损伤的幼龄鲫鱼作为实验用鱼,实验分为对照组和实验组.对照组暴露于除氯自来水,实验组分别暴露于 0.1 mg·L⁻¹菲-水溶液(Phe),1 mg·L⁻¹ MWCNTs 和 0.1 mg·L⁻¹菲-水溶液(C-Phe),1 mg·L⁻¹ nZnO 和 0.1 mg·L⁻¹菲-水溶液中(ZnO-Phe),根据动态实验结果选择 4 d 为暴露时间^[11].pH 值为 7.1 ± 0.4,水温(21 ± 1) \mathbb{C} . 驯养及实验期间鲫鱼生长正常,每天定时投放商品鱼食. 隔 1 d换一次测试悬浮液,每个鱼缸保证足够曝气,在暴露 4 d 后,活体解剖,取肝脏、脑、肠、鳃、眼和肌肉组织 – 50 \mathbb{C} 冰箱中保存备用.

将鲫鱼肝脏,脑,肠,鳃,眼和肌肉组织冻干至恒重后,按计量0.2g组织干重,放射性菲均使用液体闪烁仪测定.经测定液体闪烁仪的回收率达98%以上.

1.4 活性氧自由基的 PBN 捕获与 EPR 测定

测定肝脏和脑中活性氧自由基(ROS),ROS 的捕获与测定采用 Davies M J 改良方法^[12].

1.5 抗氧化系统测定

将取出的肝脏用生理盐水洗去血液,滤纸吸干,迅速称取 0.1 g 肝脏,按 1:10 (质量/缓冲液体积) 比例加入预冷的 Tris-HCl 缓冲液 (0.01 mol·L⁻¹ Tris, 0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖, 0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 7.5),冰浴下在玻璃匀浆器中匀浆破碎细胞.匀浆液于4 ℃、10500 r·min⁻¹下离心 30 min,取上清液 置于 – 50 ℃冰箱内保存,用于测定膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD). MDA 测定 采用 TBA 比色法^[13]. 以每毫克蛋白中含 TBARS 的量即 nmol·mL⁻¹表示,摩尔吸光系数 $e = 1.56 \times$ 10 mol·L⁻¹·cm⁻¹. SOD 活性的测定采用邻苯三酚自氧化法^[14].

1.6 统计分析

实验结果表示为平均数±标准误差(Mean±SD),使用 Excel 软件对组间数据进行差异性分析, P < 0.05 表明差异显著. Origin 7.0 统计软件处理自由基数据.

2 结果与讨论

2.1 纳米材料对菲在鲫鱼体内分布的影响

纳米赖料由于其微小的粒径和独特的理化性质,与大颗粒物质相比在生物体内具有更好的迁移性. 纳米颗粒和蛋白质的复合物具有更大的流动性,随着蛋白质的代谢,纳米颗粒将能在生物体内迁移到大 颗粒物质无法到达的地方,比如通过血脑屏障到达脑部.Oberdörster^[15]提到早在 1941 年就已有证据表 明某些微粒能进入脑组织的血脑屏障,却缺乏后续研究.该研究小组首次证实了纳米颗粒从肺组织向脑 组织的迁移.nZnO 悬浮液会释放出 Zn²⁺,对生物的毒性机制可能是因为释放出的 Zn²⁺引起.刘慧等在 研究 nZnO 颗粒直接和体内细胞接触作用,释放的 Zn²⁺ 对毒性影响较小^[16]. Villem Aruoja 等在研究 nZnO 对绿藻毒性影响时发现 nZnO 悬浮液中溶解 Zn²⁺ 对绿藻毒性小于 nZnO 的毒性^[17], nZnO 悬浮液 释放的 Zn²⁺ 对鲫鱼毒性影响较小.释放 Zn²⁺ 不是 nZnO 致毒的主要原因.如图 1 显示,nZnO 与 MWCNTs 均能改变菲在鱼体内不同部位的富集分布. MWCNTs 显著降低了菲在鲫鱼肌肉和肝脏中的富集,但增加 了脑中的富集;C-Phe 组菲在眼部、胚胎和生殖腺中含量均高于 ZnO-Phe 组.这可能与不同纳米材料独 特的物理化学性质有关.如 MWCNTs 比 nZnO 有更高的亲脂性,此外对生物的毒性效应也可能与纳米材料的颗粒尺寸和表面积有关.

2.2 肝和脑中活性氧自由基变化

图 2 为鲫鱼脑部中产生自由基的 EPR 波谱图,信号的强弱与自由基的量之间的关系.将鱼脑部分 分离出体外并加入自由基捕获剂硝酮化合物(PBN),形成 PBN-自由基加合物,然后用 EPR 检测.自由 基谱图为具有超精细分裂峰的 3 组峰,以第 2 组超精细分裂峰的第 1 个小峰的峰高与峰谷之间信号强 度差值的绝对值作为自由基的相对浓度通过计算超精细分裂常数,确定其为甲基和甲氧基的混合谱 图^[18].研究表明,二甲基亚砜(DMSO)可先与羟自由基在无氧情况下生成甲基,在有氧情况下生成甲氧 基,再经 PBN 捕获形成稳定的加合物.经计算,本研究中鲫鱼脑部捕获的自由基超精细分裂常数 g =2.0057, $a^{N} = 15.3$ G, $a^{H} = 3.5$ G.因此可以判断经 EPR 检测到的自由基为羟自由基(OH·).为了避免 在鱼脑的体外分离和匀浆过程中 PBN 捕获空气混有的微量游离的自由基,鱼体脑部分离和匀浆的整个 操作过程均在充入氮气的密闭环境中进行.因此,可以认为 PBN 捕获的自由基是纳米材料胁迫后在鲫 鱼脑部产生的自由基^[19].







in the brain of Carassius auratus

图 3 显示鲫鱼肝脏和脑部 PBN 捕获到的自由基信号强度,对于鲫鱼肝脏和脑部,其余 5 组的自由 基信号强度都比空白对照组强,说明了纳米材料及菲均能增强自由基信号强度,对鲫鱼肝脏和脑部造成 污染损伤. 肝脏和脑中 C + Phe 组信号强度大于 ZnO + Phe 组.



图3 暴露 MWCNTs 和 nZnO 后鲫鱼肝脏和脑中自由基信号的变化

Fig. 3 Effect of MWCNTs and nZnO exposure on free radical signal intensity in the liver and brain of Carassius auratus

2.3 肝和脑中 MDA 含量的变化

生物体内代谢产生的活性氧可被抗氧化防御系统有效清除.但若活性氧的产生速度超出了机体抗

氧化防御系统的清除能力,就会对机体造成氧化胁迫,从而引发一系列毒性效应,如脂质过氧化、DNA 损伤、酶失活、甚至细胞死亡或癌变. MDA 是膜脂质过氧化作用的产物,是生物受到自由基损伤的重要 生化指标之一.实验结果表明,4 d 后 MDA 含量与对照相比具有显著性差异. MDA 含量的上升从另一角 度说明污染物对鲫鱼确实产生膜脂质过氧化损伤.同时也说明自由基的信号强度变化比 MDA 的升高更 灵敏,可以更早观察到. 脂质过氧化滞后于自由基的信号强度变化,说明污染物是通过诱导产生自由基 而导致对鲫鱼的脂质过氧化.自由基信号强度变化可考虑作为水质污染早期监测指标. 比较 ZnO + Phe 和 C + Phe 的两组数据(图4),鲫鱼脑部中 ZnO + Phe 组 MDA 值略高于 C + Phe 组;鲫鱼肝脏中 C + Phe 组高于 ZnO + Phe 组.

Yin 等^[20] 拟合了 MDA 含量、自由基信号和 O₂⁻⁻含量三者之间的关系,发现 MDA 与自由基、超氧阴 离子均呈正相关,但与自由基的相关系数(*R*² = 0.765)小于与超氧阴离子的相关系数(*R*² = 0.862),说 明 MDA 更多地受到 ROS 的影响.随着自由基的不断生成,生物体发生氧化应激来适应逆境胁迫,这种 平衡的改变会导致脂质过氧化产物 MDA 的不断累积,MDA 又会加剧细胞的伤害,使蛋白质的结构和催 化功能发生变化并且抑制蛋白质的合成,其含量可以反映生物遭受逆境伤害的程度.

2.4 肝和脑中 SOD 含量的变化

SOD 对污染物胁迫相当敏感,在低浓度污染物暴露下或短时间内,由于酶合成增加,其活性往往出现诱导,以此清除体内多余的活性氧,当活性氧的产生超出抗氧化防御系统的防御能力,SOD 活性又会受到抑制,其活性变化可作为污染物胁迫下机体氧化应激的敏感信号,可用作指示环境污染的早期预警^[21].

不同污染物质暴露后,SOD 的含量变化见图 5,对不同污染物质,SOD 酶活性变化不一致,与对照组相比,暴露于污染物后,SOD 浓度均明显增加,不同组织中的 SOD 酶活性变化不一致.比较 ZnO + Phe 和 C + Phe 的两组数据发现,鲫鱼肝脏和脑中 ZnO + Phe 组 SOD 值均低于 C + Phe 组.SOD 可通过部分地清除机体内的活性氧而减轻机体所受的氧化损伤.它是生物体内唯一一种以自由基作为底物的抗氧化酶,可通过歧化反应使 O₂⁻⁻ 生成 H₂O₂和 O₂,是生物防护机制的中心酶.空白样的浓度明显低于其他的样品,各暴露组 SOD 活性的增加,说明鲫鱼肝脏和脑部产生大量的 O₂⁻⁻,但还不足以使 SOD 酶受到损伤. Mittler^[22]也认为 ROS 的升高可以作为 SOD 活性增强的间接证据.







Carassius auratus under MWCNs and nZnO exposure

3 结论

本研究采用水生态毒理学方法,选择典型纳米材料(MWCNTs和nZnO)与多环芳烃(菲),以水生生物鲫鱼为对象,研究纳米材料与有机污染物共存及单独存在条件下,二者生物有效性的变化,重点阐明纳米材料与有机物共存对二者在锦鲫体内富集分布的相互影响及其机制,并通过单独与共存条件下对

生物体靶器官的毒理学指标(氧化损伤)的研究,探讨纳米材料和多环芳烃复合污染的毒性效应.研究发现:

(1) nZnO 与 MWCNTs 均能改变菲在鱼体内不同部位的富集分布. MWCNTs 显著降低了菲在鲫鱼肌 肉和肝脏中的富集,但增加了脑中的富集; C-Phe 组菲在眼部、胚胎和生殖腺中含量均高于 ZnO + Phe 组.

(2)纳米材料(MWCNTs和nZnO)与多环芳烃(菲)均诱导鲫鱼脑部和肝脏组织中自由基的生成,肝脏和脑中C+Phe组信号强度均大于ZnO+Phe组,揭示自由基是机体受到氧化胁迫和氧化损伤的重要原因之一.

(3) 鲫鱼脑部中: ZnO + Phe 组 MDA 值高于 C + Phe 组; 鲫鱼肝脏中: C + Phe 组 MDA 值高于 ZnO + Phe 组. 鲫鱼肝脏和脑中 ZnO + Phe 组 SOD 值均低于 C + Phe 组, 说明 SOD 酶活性对 MWCNTs 的暴露比 nZnO 敏感.

参考文献

- [1] Behra R, Krug H. Nanoparticles at large[J]. Nature Nanoecotoxicol, 2008, 3: 253-254
- [2] Long R Q, Yang R T. Carbon nanotubes as superior sorbent for dioxin removal [J]. J Am Chem Soc, 2001, 123: 2058-2059
- [3] Li Y H, Wang S G, Luan Z K, et al. Adsorption of cadmium (II) from aqeous solution by surface oxidized carbon nanotubes [J]. Carbon, 2003,41: 1057-1062
- [4] 耿成怀,成荣明,徐学诚,等. 碳纳米管对苯胺的吸附行为[J],应用化学,2004,7(21):737-739
- [5] Yang K, Zhu L H, Xing B S. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by carbon nanomaterials [J], Environ Sci Technol, 2006, 40: 1855-1861
- [6] Wang X L, Lu J L, Xu M G, et al. Sorption of pyrene by regular and nanoscaled metal oxide particles: Influence of adsorbed organic matter[J]. Environ Sci Technol, 2008,42: 7267-7272
- [7] Yang S T, Wang X, Jia G, et al. Long-term accumulation and low toxicity of single-walled carbon nanotubes in intravenously exposed in mice[J]. Toxicol Lett, 2008,181: 182-189
- [8] Krång A S. Naphthalene disrupts pheromone induced mate search in the amphipod Corophium volutator (Pallas) [J]. Aquat Toxicol, 2007, 85: 9-18
- [9] Sun Y Y, Yu H X, Wang X R, et al. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish Carassius auratus under phenanthrene exposure[J]. Chemosphere, 2006, 63: 1319-1327
- [10] Yin Y, Wang X R, Sun Y Y, et al. Bioaccumulation and oxidative stress in submerged macrophyte Ceratophyllum demersum L. upon exposure to pyrene[J]. Environ Toxicol, 2008, 23: 328-336
- [11] Girard P M, Boiteux S. Repair of oxidized DNA bases in the yeast Saccharomyces cerevisiae[J]. Biochimie, 1997, 79: 559-566
- [12] Davies M J, Havkins C L. EPR Spin trapping of protein radicals [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2004, 36 (9): 1072-1086
- [13] Luo Y, Shi H H, Wang X R, et al. Free radical generation and lipid peroxidation induced by 2,4-dichlorophenol in liver of Carassius auratus[J]. Environmental Science, 2005, 26 (3):29-32
- [14] Marklund S, Marklund G. Involvement of the superdxide anion raical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biochem, 1976, 47:469-474
- [15] Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain [J]. Inhalation Toxicology, 2004, 16 (6/7):437-446
- [16] 刘慧, 王晓蓉. 锌及其配合物对鲫鱼肝脏谷胱甘肽抗氧化系统的影响[J]. 中国环境科学,2005, 2:35-40
- [17] Villem A, Henri-Charles D, Kaja K, et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* [J]. Science of The Total Environment, 2009, 407(4):1461-146
- [18] Zhiru M, Zhao B L, Yuan Z B. Application of electrochemical and spin trapping techniques in the investigation of hydroxyl radicals [J].
 Ana Chim Acta, 1999, 389: 213-218
- [19] Harder B. Conduit to the brain: Particles enter the nervous system via the nose[J]. Science News, 2004, 165(4):54
- [20] Yin Y, Jia H X, Sun Y Y. et al. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus*, exposed to phenanthrene [J]. Comparative Biochemistry and physiology, part C, 2007, 145(2): 288-293
- [21] Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms [J]. Mar Pollut Bull, 2001, 42: 656-666
- [22] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends Plant Sci, 2002, 7: 405-410

Effect of nanomaterials on ecotoxicity of phenanthrene in Carassius auratus

DAI Zhaoxia^{1,2*} YIN Ying¹ WANG Shihe³

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment,

Nanjing University, Nanjing, 210093, China; 2. Department of City Science, The City Vocational College of Jiangsu,

Nanjing, 210017, China; 3. School of Civil Engineering, Southearth University, Nanjing, 210096, China)

ABSTRACT

In this study, the impacts of nanomaterials (including multi-walled carbon nanotubes and nanosized ZnO) in the presence of phenanthrene were studied. The reaction mechanisms were also investigated and it was designed to address the potential environmental impacts of manufactured nanomaterials. The results show that the concentrations of phenanthrene in the brain of *Carassius auratus* increased while those in the liver decreased significantly in the presence of MWCNTs. With the coexisting nZnO, the concentration of phenanthrene in the gonad embryo and eye of the fish were higher than the one with the coexisting MWCNTs. In the brain and liver of the fish, free radicals induced by MWCNTs, nZnO and phenanthrene.

Keywords: Carassius auratus, MWCNTs, nZnO, phenanthrene, bioaccumulation.

赛默飞推出众多色谱质谱新品

2013 年 6 月 25,赛默飞世尔科技在北京召开色谱质谱新品发布会,介绍今年赛默飞推出的色谱质 谱新品.

质谱新品新型"三合一"系统——Thermo Scientific Orbitrap Fusion Tribrid 液相色谱质谱仪(LC-MS) 集成四极杆、Orbitrap 和线性离子阱三种质量分析器,针对复杂生物样品具备出色的分析深度. 超高场 Orbitrap 提供超过 450,000 的分辨率和高达 15Hz 的扫描速率. 凭借三合一配置,用户将能够以更快的速 度识别更多低丰度蛋白质. 独特的仪器结构能够在 Orbitrap 和线性离子阱质量分析器中同时实现母离 子隔离、裂解和数据采集. Orbitrap Fusion 系统解决通量问题的一个方法是与质量标签(TMT)串联. 该技 术能够使质谱仪同时对多个样品中的蛋白质进行相对定量研究.

TSQ Quantiva 三重四极杆质谱仪利用主动离子管控技术(Active Ion Management, AIM)优化离子生成及从离子源至检测器的传输,由此获得极限灵敏度.与先前的赛默飞三重四极杆相比,灵敏度水平的显著改善了诸如肽段定量、代谢物组学和生物制药 QA/QC 等应用领域的结果.在公司实验室中, AIM 增强系统以优异精度成功检测血浆中70 阿克的维拉帕米. TSQ Quantiva MS 系统具有极高的通量,每秒可运行 500 个 SRM 实验. TSQ Endura 三重四极杆质谱仪拥有 TSQ Quantiva MS 的多项先进技术,其设计用于痕量水平定量,如食品检验、环境分析和制药 QA/QC 等应用领域.

另外,赛默飞在 ASMS 会议上推出的 Thermo Scientific ISQ[™]系列气相色谱-质谱联用仪也在此次新 品发布会上亮相,ISQ LT 气相色谱-质谱联用仪对于关注高通量并在分析方面要求高灵敏度、生产力永 不停歇、简单智能、要求苛刻的实验室来说,提供永不过时的投资.

新发布的 10 种质谱软件包: FreeStyle 1.0、TraceFinder 3.1、Lipid Search、Proteome Discoverer 1.4、 Proteome Discoverer 1.4、SIEVE 2.1 等可分别用于不同的领域.