

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20211026002

孙晶, 刘玉玮, 胡献刚, 等. 环境浓度氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露诱发成年斑马鱼脑组织的分子响应研究[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(3): 256-267

Sun J, Liu Y W, Hu X G, et al. Molecular response in adult zebrafish brain induced by environment-related concentration graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(3): 256-267 (in Chinese)

环境浓度氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露诱发成年斑马鱼脑组织的分子响应研究

孙晶^{1,2}, 刘玉玮¹, 胡献刚², 欧阳少虎^{2,*}

1. 生态环境部海河流域北海海域生态环境监督管理局生态环境监测与科学研究中心, 天津 300061

2. 南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071

收稿日期: 2021-10-26 录用日期: 2022-01-14

摘要: 氧化石墨烯(graphene oxide, GO)是目前十分重要的人工纳米材料,且极有可能被排放到环境中。因而 GO 与环境中的共存污染物多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)对水生生物的复合暴露毒性及其相关机理值得进一步研究。使用成年斑马鱼为动物模型,选取水环境浓度的典型污染物 16 种优控 PAHs 与环境预测浓度的 GO 对成年斑马鱼进行 21 d 亚急性暴露,研究 GO 和 PAHs 复合暴露对成年斑马鱼脑组织的毒性效应及其分子机理。结果表明,GO 暴露组和 PAHs-GO 复合暴露组在 21 d 的亚急性暴露中均不会诱发成年斑马鱼的死亡和畸形,但会降低斑马鱼脑组织细胞色素 P4501B1 酶(CYP1B1)和 β -半乳糖苷酶(β -Gal)的含量;在分子水平上,0.1 mg·L⁻¹ GO 组(GO 组)、5 μ g·L⁻¹ PAHs 组(PAHs 组)和 0.1 mg·L⁻¹ GO & 5 μ g·L⁻¹ PAHs 组(PAHs-GO 组)诱发的差异基因数量和差异基因通路数量排序为 PAHs 组>GO-PAHs 组>GO 组。研究表明:(1)在环境预测浓度的 GO 与环境浓度 PAHs 对成年斑马鱼复合暴露时,对斑马鱼脑组织酶的影响 GO 占据主导地位;(2)PAHs-GO 复合暴露组兼具 GO 和 PAHs 的分子毒性效应的特点,说明 GO 和 PAHs 在环境相关浓度下的复合暴露分子毒性值得注意;(3)GO 组转录组氧化酶相关基因变化与酶含量结果相一致,暗示可以使用转录组来解释生物酶含量变化的分子机理。本文结果可为纳米材料与环境污染物的复合毒性效应和机理研究提供参考。

关键词: 氧化石墨烯;多环芳烃;斑马鱼;亚急性毒性;转录组学

文章编号: 1673-5897(2022)3-256-12 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Molecular Response in Adult Zebrafish Brain Induced by Environment-related Concentration Graphene Oxide and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

Sun Jing^{1,2}, Liu Yuwei¹, Hu Xiangang², Ouyang Shaohu^{2,*}

1. Center of Eco-environmental Monitoring and Scientific Research, Administration of Ecology and Environment of Haihe River Basin and Beihai Sea Area, Ministry of Ecology and Environment of China, Tianjin 300061, China

2. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Ministry of Education), Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2019YFC1804104);博士面上项目(2020M680867);NSFC 山东联合基金资助项目(U1906222);高等学校学科创新引智计划资助项目(T2017002)

第一作者: 孙晶(1990—),女,博士,研究方向为环境监测与生态毒理学, E-mail: sunjing90s@yeah.net

*** 通讯作者 (Corresponding author),** E-mail: ouyangshaohu@nankai.edu.cn

Received 26 October 2021 accepted 14 January 2022

Abstract: Currently, graphene oxide (GO), as an important engineering nanomaterial, has a high potential to enter the environment. Therefore, the combined ecological mechanism and health effects of GO and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs, a coexisting pollutants) on aquatic organisms need further study. In this study, adult zebrafish was selected as animal model for sub-acute exposure toxic research of GO at predicted environment concentration and 16 priority PAHs (typical pollutants) at environment concentration after 21 d of exposure. Then, combined toxic effects and molecular mechanism of GO and PAHs on adult zebrafish brain were explored. Results showed that both GO and PAHs-GO groups didn't induce death and malformation in adult zebrafish during 21 d of subacute exposure, but decreased cytochrome P4501B1 (CYP1B1) and β -galactosidase (β -Gal) content in zebrafish brain. Based on differential expressed genes (DEGs) and altered function pathways induced by treatment groups, the alteration order at the molecular level induced by $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO (GO group), $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs (PAHs group), and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO & $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs (PAHs-GO group) was PAHs group > PAHs-GO group > GO group. In summary, this study reveals that (1) GO play a dominant role in alteration of CYP1B1 and β -Gal content in adult zebrafish brain for 21 d exposure to GO and co-exposure to GO with PAHs; (2) PAHs-GO co-exposure group share a common characteristic in the toxic effects of both GO and PAHs group, indicating the potential toxicity induced by PAHs-GO at environmental related concentration co-exposure need to notice; (3) For GO group, the alteration of oxidase content were consistent with the transcriptomic result, indicating that transcriptomics may help explain the molecular mechanism of oxidase alteration induced by GO. The results of this study can provide a reference for the combined toxicity effect and mechanism of nanomaterials and environmental coexisting pollutants.

Keywords: graphene oxide; polycyclic aromatic hydrocarbons; zebrafish; sub-acute toxicity; transcriptome

近年来,随着氧化石墨烯(graphene oxide, GO)研究的增多和产品应用的增长,GO不可避免地释放到环境尤其是水体环境中^[1-2]。水中的有机污染物可能在水环境中稳定存在的碳纳米材料吸附(如GO)后发生转移,从而诱导生物产生更大的毒性效应,或者水体中污染物的化学结构因为与碳纳米材料相互作用发生改变,从而使之毒性变小,即纳米材料与污染物联合毒性可能是协同的、拮抗的或是抑制的^[3]。GO可以吸附多种有机污染物,如染料、抗生素、多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)和农药等^[4-6]。其中,PAHs因其在环境中分布极为广泛,且具有致癌、致畸和致突变等特性受到了人们的极大关注,也是重要的环境和食品污染物^[7-8]。有报道指出,近年来我国主要地表水中的PAHs含量在 $104.78 \sim 7\,596.56 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间^[9-11],且已有部分地区达到中等或重度污染水平。因而当GO被排放到水体环境中时,将与水体中的PAHs污染物共存,其潜在的复合暴露生态风险不容忽视。

环境中的复合污染造成的毒性评估是生态风险评估中十分重要的一环^[12]。近年来针对PAHs与碳纳米材料的复合污染研究时有报道。例如,剥离石

墨烯和多壁碳纳米管与PAHs发生相互作用后,碳纳米材料的生物相容性发生了改变,且剥离石墨烯和多壁碳纳米管均可以通过对PAHs的吸附来降低PAHs的生物利用度^[13];然而,也有其他研究指出纳米材料与有机污染物复合后,对生物的联合毒性效应可能表现为协同作用、拮抗作用或没有相互影响^[14-15]。然而,目前关于GO和PAHs对斑马鱼成鱼脑组织的复合暴露毒性及其分子效应和机理尚未可知。斑马鱼是一种经典的环境毒理学模式生物,也是研究纳米材料和PAHs的水生态毒性的常用模型^[16-17]。CYP1B1和 β -半乳糖苷酶与斑马鱼脑组织的代谢和衰老相关,可以反映外源污染对斑马鱼的作用^[18-19],而转录组学是近年来斑马鱼毒理机制研究的重要手段之一^[20]。因而,为考察GO与PAHs对水生生物的联合毒性效应,选取环境预测浓度的GO与环境当量浓度PAHs同时暴露成年斑马鱼21d,对暴露后斑马鱼脑组织的CYP1B1和 β -半乳糖苷酶水平及转录组学响应进行研究,从表观到基因层面深入揭示GO和PAHs对成年斑马鱼脑组织联合暴露毒性的分子机理。本文的结果为其他碳纳米材料和其他共存污染物的潜在毒理效应提供技术方

法和理论参考数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 GO 与 PAHs 的购置与配制

GO 购于南京先丰纳米科技公司(货号 XF002-1), 16 种优控 PAHs 购自于美国 AccuStandard 公司(初始浓度: $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。GO 和 PAHs 的相关性质和表征结果详见本课题组之前的工作^[21-22]。参考既往研究^[20,23-24], 选取 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 为 GO 在环境中的预测浓度, 并将其应用于斑马鱼的暴露; 与此同时, 参考了近年来我国主要水体 PAHs 的平均浓度^[10-11], 同时考虑到进行低浓度亚急性毒性效应测试(21 d), 选择了较为合适的斑马鱼成鱼的 PAHs 暴露浓度, 为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。综上, 本研究将 GO 与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs 复合, 设定了 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO 与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs 复合暴露组(PAHs-GO01)、 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO 与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs(PAHs-GO1)复合暴露组, 同时为确认 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs 对斑马鱼的毒性效应, 设立了 $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs 暴露组(PAHs)。各实验组设置和名称缩写如表 1 所示。将成年斑马鱼暴露于空白和污染物溶液中 21 d 后, 收集斑马鱼脑组织进行毒性分析。

1.2 斑马鱼饲养与毒性暴露

暴露生物为 6~8 月龄 AB 型野生成年斑马鱼, 购自中国科学院水生生物研究所斑马鱼资源中心。开始暴露实验前统一将斑马鱼饲养于配备循环水泵的 30 L 玻璃水箱中, 饲养水为 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 天然海盐水, 水温为 $(28.0 \pm 1.0) ^\circ\text{C}$ 。使用商业鱼饲料(中国惠州市寸金饲料有限公司)进行饲养, 频率为每天 2 次,

投食量以斑马鱼 1 min 内吃完为宜。光照程序为 10 h 黑暗+14 h 光照。

开始暴露前, 斑马鱼被置于人工气候箱(SPX-300I-C, 中国上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)进行环境适应, 适应和暴露期间气候箱温度、光照程序和喂食均与未暴露时饲养环境一致。在 2 周的适应期结束后, 每次实验暴露均选取 36 条健康且体型相近的成年斑马鱼并将其随机地分成 6 组, 每组包含 6 条斑马鱼, 分别按照表 1 中组别的设置将其分为对照组、GO01 组、GO1 组、PAHs 组、PAHs-GO01 组和 PAHs-GO1 组。对照组和暴露组的斑马鱼均分别置于相应 1 L 烧杯中进行为期 21 d 的暴露, 斑马鱼暴露液每隔一天更换一次, 暴露环境与斑马鱼饲养和适应条件保持一致。为保证后续实验生物重复样品量, 本研究中对对照组和实验组均设置了 3 组平行, 3 组平行同时进行暴露, 每组的驯养和暴露条件相同。

暴露实验进行 21 d 后, 使用 3% 三卡因(纯度 99%, 美国 Sigma 公司)处死斑马鱼后, 迅速使用冰冷的生理盐水清洗, 并将其置于解剖盘上进行解剖, 取出斑马鱼脑组织, 清洗干净后装入洁净无菌离心管中, 置于冰上备用。

1.3 斑马鱼脑 β -半乳糖苷酶和氧化代谢酶 CYP1B1 含量测定

将对对照组和暴露组的斑马鱼脑组织转移至 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μL 冰冷的生理盐水, 使用匀浆器将组织匀浆 2 min, 制成斑马鱼脑组织匀浆。将斑马鱼脑组织匀浆使用冷冻离心机(5804 R, 德国 Eppendorf 公司)在 $4 ^\circ\text{C}$ 、 $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下离心 5 min, 吸取上清备用。斑马鱼脑组织 β -半乳糖苷酶和氧化代谢酶 CYP1B1 的含量使用酶联免疫法(ELISA)试剂盒(中国上海哈灵有限公司)测定。测试过程严格按照试剂盒说明书进行。斑马鱼脑组织匀浆上清蛋白质含量由 BCA 蛋白试剂盒(中国南京建成有限公司)测定, 测定过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 转录组样品测试与结果分析

为探究 GO 与 PAHs 对斑马鱼脑组织的作用机理, 使用转录组学对其分子机理进行研究。在本研究中, GO 有 2 个浓度, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 为获得更好的实验效果, 斑马鱼脑组织转录组的样品使用 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO 组; 同时, 为研究 PAHs 与 GO-PAHs 复合暴露对斑马鱼脑组织的影响, 且为与 GO 组结果保持一致, 因而本研究中转录组测定的

表 1 毒理实验中 PAHs 和 GO 浓度

Table 1 Concentrations of PAHs and GO in toxicity test

组别 Groups	污染物浓度 Pollutant concentration
Control	$60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 天然海盐 $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ sea salt
PAHs	$5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs
GO01	$0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO
GO1	$0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO
PAHs-GO01	$5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs+ $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO
PAHs-GO1	$5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ PAHs+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO

注: PAHs 为多环芳烃; GO 为氧化石墨烯。

Notes: PAHs and GO was abbreviation for polycyclic aromatic hydrocarbons and graphene oxide, respectively.

浓度组为对照组、GO1 组、PAHs 组和 PAHs-GO1 组。获取各浓度组斑马鱼脑组织后,迅速将其置入液氮中进行保存。样品的 RNA 的提取和检测参考本课题组之前的工作^[25],简要步骤如下。

首先,样品 RNA 提取使用 TRIzol 液(美国 Invitrogen 公司),采用经典提取法提取样品的总 RNA。样品总 RNA 的纯度和浓度分别使用超微量分光光度计(NP80,德国 Implen 公司)和 Qubit® RNA 测定试剂盒(Nano 6000,美国安捷伦公司)进行鉴定和测定;RNA 测序前进行文库构建,文库构建完成后,使用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 $>2\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),用以保证文库质量;文库准确定量完成后进行上机测序。

转录组数据分析:得到测序结果后,首先定义差异基因在本研究中,为保证去除测序过程中的假阳性的出现,对差异基因(different expressed genes, DEGs)的筛选标准为: $|\text{Log}_2(\text{暴露组的基因表达量}/\text{对照组基因的表达式})|\geq 1$,且其检验后的 $P\leq 0.0005$,分别为上调基因和下调基因。同时,基因的功能分析,即功能富集分析和通路分析,均使用筛选出的 DEGs 进行分析。

1.5 数据统计分析

所有的实验组均设置 3 个或 3 个以上生物重复,结果用平均值 $\pm$ 标准偏差表示。所得实验数据

使用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差(ANOVA)分析,当 $P<0.05$ 时,认为在统计学上具有显著性。斑马鱼脑组织功能富集分析以及通路分析数据均源于京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库。对于转录组显著差异通路的定义为:若该通路 $P<0.05$ 时,则该通路则被认为是显著变化的。数据条形图和线图均使用 Origin 8.5 绘制。

2 结果 (Results)

2.1 斑马鱼暴露期间存活、畸形、CYP1B1 酶和 β -半乳糖苷酶含量变化

在成年斑马鱼暴露于对照组和暴露组 21 d 后,结果显示,对照组和所有暴露组均未对成年斑马鱼的存活和畸形造成影响,该结果与已有研究报道结果一致^[23-24],说明在环境预测浓度的 GO、 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PAHs 及其复合暴露组中亚急性暴露状态下均不会诱成年斑马鱼的死亡和畸形。与此同时,暴露结束后斑马鱼的脑组织 CYP1B1 酶和 β -半乳糖苷酶含量分别如图 1(a)和 1(b)所示。相比于对照组,暴露组出现了下降趋势,且 GO1 组和 PAHs-GO1 组 CYP1B1 含量显著下降($P<0.05$,图 1(a)),说明 GO 对斑马鱼脑 CYP1B1 含量造成了比较显著的影响,PAHs-GO01 组的 CYP1B1 含量亦显著下降。与 CYP1B1 含量类似,GO01 和 GO1 组斑马鱼脑组织 β -半乳糖苷酶含量下降,其中 GO01 组 β -半乳糖苷

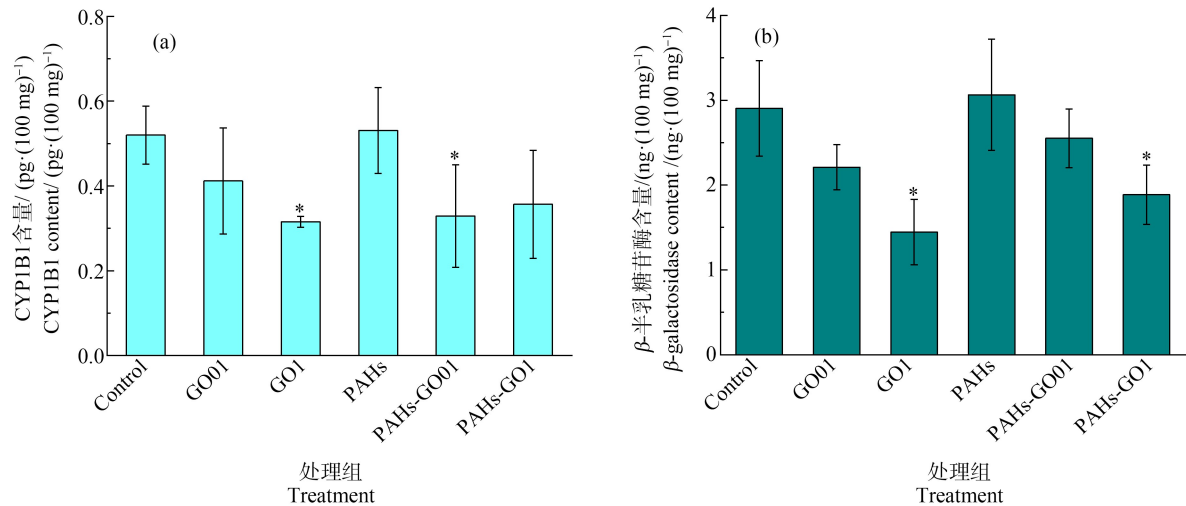


图 1 GO 组、PAHs 组和 PAHs-GO 复合暴露组对成年斑马鱼脑 CYP1B1 含量及 β -半乳糖苷酶含量的影响

注: * 代表实验组相对于对照组有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 1 Influences on brain CYP1B1 content and β -galactosidase content induced by GO, PAHs, PAHs-GO co-exposure in adult zebrafish

Notes: * denote significant differences at $P<0.05$ compared with the control group.

酶含量下降 23.90%, GO1 组 β -半乳糖苷酶含量与对照组相比显著下降 ($P < 0.05$, 图 1 (b)), 下降 50.27%。与此同时, 与对照相比, PAHs-GO1 组和 PAHs-GO1 组也同样出现了 β -半乳糖苷酶含量下降现象, 分别下降 12.14% 和 35.05% ($P < 0.05$), 而 PAHs 组中 β -半乳糖苷酶的含量与对照组相比无显著性差异。

2.2 GO、PAHs 和联合暴露对成年斑马鱼转录组的影响

为探究 GO 和 PAHs 和复合物对斑马鱼脑组织的分子水平的影响, 对暴露组和对照组的斑马鱼脑组织进行了转录组研究。使用皮尔森相关系数 (Pearson correlation coefficient) 和聚类分析对不同组别(包括对照组)基因表达相似度进行了分析, 结果如图 2 所示。对照组与 GO1 组、PAHs-GO1 组和 PAHs 组之间的皮尔森系数分别为 0.966、0.966 和 0.942(图 2(a))。对于皮尔森系数而言, 2 组之间比较的 r^2 越接近于 1, 则 2 组之间的基因表达相似度越高。所以在皮尔森系数分析中, GO1 组和 PAHs-GO1 组相对于 PAHs 组来说, 其基因表达更接近于对照组。然而, 值得注意的是, 在皮尔森系数分析时, GO1 组和 PAHs-GO1 组的系数相同, 无法判断

GO1 组和 PAHs-GO1 组基因表达相对于对照组的区别。因此, 采用聚类分析来分析 3 个暴露组与对照组的基因表达区别, 结果如图 2(b)所示。聚类分析的结果显示, PAHs 组基因的表达与对照组差异最大, 而 GO1 组的基因表达是 3 个暴露组中最接近对照组的, PAHs-GO1 组与对照组基因表达的差异介于 GO1 组和 PAHs 组之间。

2.3 GO、PAHs 和联合暴露诱发的成年斑马鱼脑组织 DEGs 的分析

根据 1.4 中 DEGs 的筛选标准, 本研究中转录组 DEGs 数量和分布情况如图 3 所示。由 3(a) ~ 3(c)可知, GO1 组引起的斑马鱼脑组织转录组的变化最小, 共有 61 个 DEGs, 其中上调 DEGs 29 个, 下调 DEGs 32 个; PAHs 组包含最多的 DEGs, 其中上调 DEGs 123 个, 下调 DEGs 39 个; PAHs-GO1 组包含的 DEGs 介于 GO1 组和 PAHs 组之间, 其中上调 DEGs 34 个, 下调 DEGs 59 个。对 3 个暴露组的 DEGs 进行了分析, 其结果如图 3(d)所示。在本研究中, 3 个暴露组共引起了 251 个基因的显著变化, 20 个 DEGs 为 3 个暴露组共有, 27 个 DEGs 为 GO1 组和 PAHs 组共有, 28 个 DEGs 为 GO1 组和 PAHs-GO1 组共有, 27 个 DEGs 为 GO1 组和 PAHs 组共有,

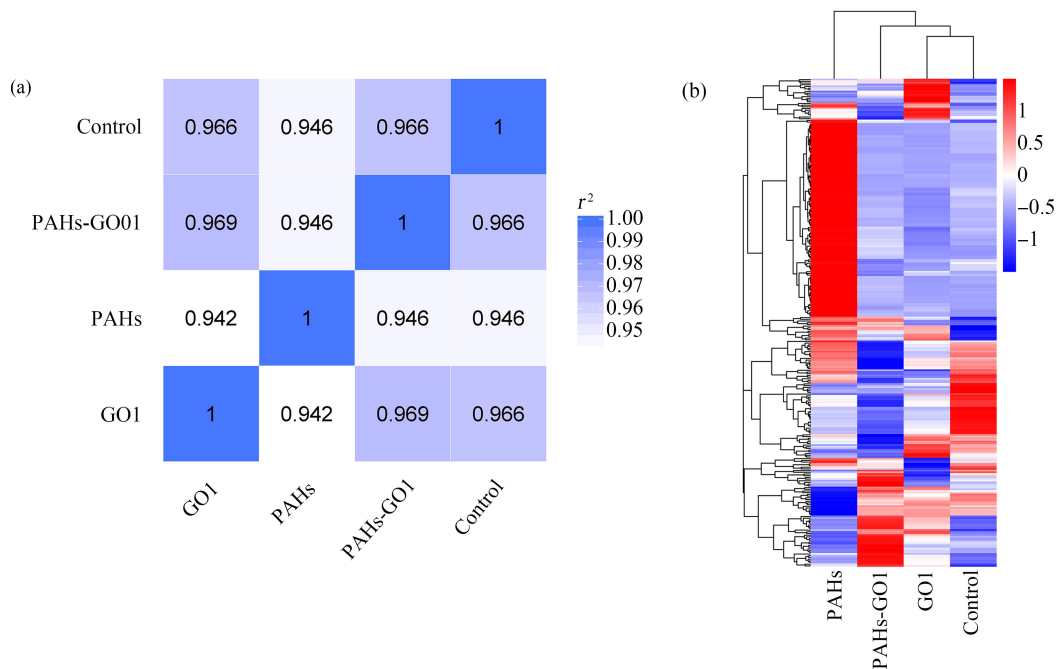


图 2 GO 组、PAHs 组和 PAHs-GO 复合暴露组之间转录组基因表达差异分析

注: (a) 皮尔森系数分析; (b) Hclust 聚类分析。

Fig. 2 Analysis of differential expressed gene expression among GO, PAHs, PAHs-GO groups

Notes: (a) Pearson's coefficient analysis; (b) Hclust analysis.

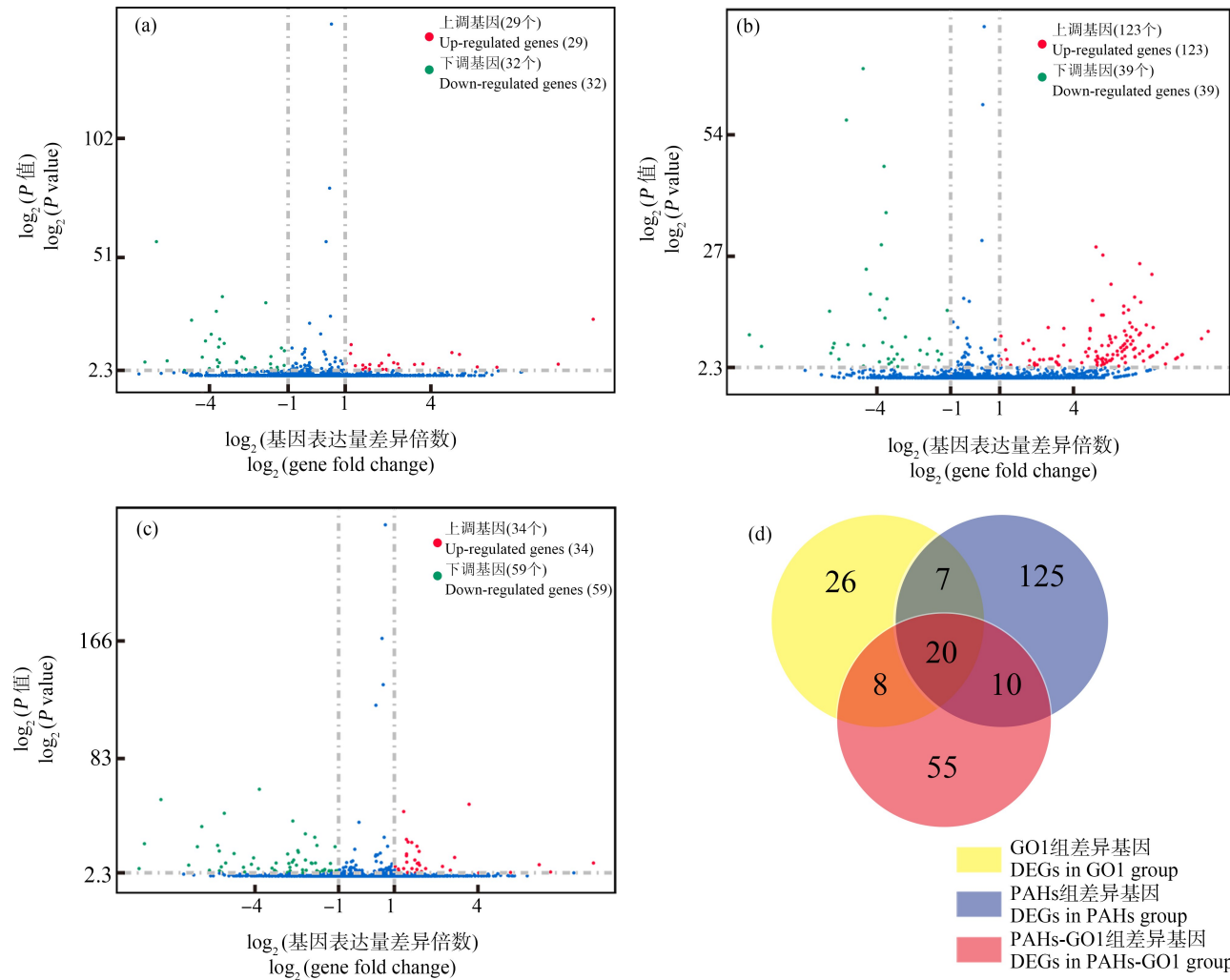


图 3 GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 组诱发的斑马鱼转录组 DEGs 分布图

注:(a)~(c)分别为 GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 组 DEGs 的数量火山图;(d)为 GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 组之间 DEGs 的韦恩图;
DEGs 代表显著差异表达基因。

Fig. 3 DEGs and analysis in zebrafish of control, GO1 group, PAHs group and PAHs-GO1 group

Notes: (a)~(c) represent the amount volcano figure of DEGs in control, GO1 group, PAHs group and PAHs-GO1 group, respectively;
(d) represents the Venn diagram of DEGs in control, GO1 group, PAHs group and PAHs-GO1 group; DEGs was short for differential expressed genes.

30 个 DEGs 为 PAHs-GO1 组和 PAHs 组共有。总体而言,3 个暴露组两两之间的共同 DEGs 数量虽然相近,但每个暴露组独有的 DEGs 数量却相差很大,转录组学结果表明不同的暴露组合引发的分子毒性是不同的,且从诱发斑马鱼脑组织 DEGs 的数量上看,3 个暴露组的排序为 GO1 组<PAHs-GO1 组<PAHs 组。

由表 2 可知,在 20 个 3 个暴露组共有的 DEGs 中功能涉及细胞代谢(如 *ckma*)、紧密连接(*myhc4* 和 *mylpfa*)、钙离子转运(*atp2a11* 和 *pvalb2* 等)和细胞骨架等(*tnni2b.2* 和 *tpma* 等)。且除 *krt5* 在 GO1 组中上调、*RCVRN* 在 3 个暴露组中上调外,其余 DEGs 在

3 个暴露组中的表达相比于对照组均显著下调,说明在受到外界影响,尤其是纳米材料、PAHs 亦或是二者皆有的情况下,生物组织代谢以及细胞骨架等会率先响应,这种现象在既往研究中也有证实^[26-28]。而当考察 3 个暴露组中独有的 DEGs 时,3 个暴露组的 DEGs 的功能也各有差异:GO1 组包含氧化酶相关的 DEGs,包括 *steap4* 和 *ncfl*;而 PAHs 组中富集了能量代谢和紧密连接的相关基因,如 *uqcrrfsl*、*cldnd* 和 *cldng* 等;PAHs-GO1 组包含大量代谢过程相关的 DEGs,如与有机环化合物代谢过程的 *arn-tll1a*、氨基酸代谢相关基因 *gpt21* 和膜转运相关基因 *acap3a* 等。

表 2 部分差异基因的功能
Table 2 Function of partial differential expressed genes

基因名称 Gene symbol	基因功能 Gene function	变化组别 Groups	变化趋势 Alteration trend
<i>steap4</i>	氧化还原酶,膜运输 Oxidoreductases, membrane trafficking	GO1	上调 Up-regulated
<i>ncfl</i>	中性粒细胞溶质因子,膜运输 Neutrophil cytosolic factor, membrane trafficking	GO1	上调 Up-regulated
<i>ch25h</i>	胆固醇 25-羟化酶,脂质代谢 Cholesterol 25-hydroxylase, lipid metabolism	GO1	上调 Up-regulated
<i>ckma</i>	肌酸激酶,精氨酸和脯氨酸代谢 Creatine kinase, arginine and proline metabolism	GO1, PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>myhc4</i>	肌球蛋白重链,细胞骨架蛋白 Myosin heavy chain, cytoskeleton proteins	GO1, PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>mylpfa</i>	快速骨骼肌球蛋白轻链,细胞骨架蛋白 Fast skeletal myosin light chain, cytoskeleton proteins	GO1, PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>atp2a1l</i>	P 型 Ca^{2+} 转运蛋白 2A 型,信号转导 P-type Ca^{2+} transporter type 2A, signal transduction	GO1, PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>pvalb2</i>	小清蛋白-2,信号和细胞过程 Parvalbumin-2, signaling and cellular processes	GO1, PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>tnni2b.2</i>	肌钙蛋白 I,快速骨骼肌;细胞骨架蛋白 Troponin I, fast skeletal muscle; cytoskeleton proteins	GO1, PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>tpma</i>	原肌球蛋白 1,细胞骨架蛋白 Tropomyosin 1, cytoskeleton proteins	GO1, PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>krt5</i>	II 型角蛋白,碱性,酸性和碱性角蛋白 Type II keratin, basic, acidic and basic keratins	GO1	上调 Up-regulated
<i>krt5</i>	II 型角蛋白,碱性,酸性和碱性角蛋白 Type II keratin, basic, acidic and basic keratins	PAHs-GO1, PAHs	下调 Down-regulated
<i>RCVRN</i>	恢复蛋白,感官系统 Recoverin, sensory system	GO1, PAHs-GO1, PAHs	上调 Up-regulated
<i>uqcrcf1</i>	泛醇-细胞色素 C 还原酶铁硫亚基,氧化磷酸化 Ubiquinol-cytochrome C reductase iron-sulfur subunit, oxidative phosphorylation	PAHs	下调 Down-regulated
<i>ca15b</i>	碳酸酐酶 4,能量代谢 Carbonic anhydrase 4, energy metabolism	PAHs	上调 Up-regulated
<i>clnd</i>	紧密连接蛋白,细胞粘附分子 Claudin, cell adhesion molecules	PAHs	下调 Down-regulated
<i>clng</i>	紧密连接蛋白,细胞粘附分子 Claudin, cell adhesion molecules	PAHs	下调 Down-regulated
<i>kpna7</i>	输入亚基 α -1/8,核质转运 Importin subunit alpha-1/8, nucleocytoplasmic transport	PAHs	上调 Up-regulated
<i>acap3a</i>	Arf-GAP 与卷曲螺旋,ANK 重复序列和含 PH 结构域的蛋白质,膜运输 Arf-GAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein, membrane trafficking	PAHs-GO1	上调 Up-regulated
<i>arntl1a</i>	芳烃受体核转位子样蛋白 1,转录因子 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1, transcription factors	PAHs-GO1	上调 Up-regulated
<i>gpt2l</i>	丙氨酸转氨酶,氨基酸代谢 Aminotransferase, amino acid metabolism	PAHs-GO1	上调 Up-regulated
<i>laptm4b</i>	溶酶体相关跨膜蛋白,运输和分解代谢 Lysosomal-associated transmembrane protein, transport and catabolism	PAHs-GO1	上调 Up-regulated

2.4 GO、PAHs 和联合暴露诱发的成年斑马鱼脑组织基因通路变化的分析

从基因功能方面来看,基因的转录是调控生物过程的一个必不可少的方式。因而本研究将 3 个暴露组的 DEGs 进行了 KEGG 通路分析,GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 组的 KEGG 富集通路结果如表 3 所示。结果显示,GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 组的 DEGs 一共富集到了 38 个通路中,其中 GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 组的 DEGs 分别富集到了 17、25 和 25 条基因通路。其中,GO1 组显著变化生物通路($P<0.05$)有 2 个,分别为紧密连接和初次胆汁酸的生物合成;PAHs 组

的显著变化生物通路($P<0.05$)有 4 个,分别为紧密连接、细胞周期、心肌收缩和吞噬体;PAHs-GO1 组的显著变化生物通路($P<0.05$)有 4 个,粘着斑、ECM-受体相互作用、紧密连接和光转导。值得注意的是,紧密连接在 3 个暴露组中的通路富集基因数量均位于首位且均为显著变化生物通路($P<0.05$);不仅如此,GO1 组、PAHs-GO1 组和 PAHs 组在紧密连接通路上富集的 DEGs 分别为 3、4 和 6 个,且 GO1 组在紧密连接通路上富集的 DEGs (*MYH13*、*myhc4* 和 *mylpfa*) 在 PAHs-GO1 组和 PAHs 组中均有表达和富集,而 *cldng* 和 *cldnd* 是 PAHs 组中独有的 DEGs。

表 3 暴露组差异基因 (DEGs) 富集的基因通路
Table 3 Function pathways of differential expressed genes (DEGs) in exposure groups

通路名称 Pathway name	通路编号 Pathway serial	暴露组 DEGs 数量 DEGs amount mapped to function pathways			暴露组通路富集 P 值 P value of exposure groups		
		GO1	PAHs	PAHs-GO1	GO1	PAHs	PAHs-GO1
紧密连接 Tight junction	dre04530	3	6	4	0.0043	0.0002	0.0059
钙信号通路 Calcium signaling pathway	dre04020	2	2	2	0.0882	0.3743	0.2953
吞噬体 Phagosome	dre04145	1	3	2	0.2691	0.0485	0.1475
心肌收缩 Cardiac muscle contraction	dre04260	1	3	1	0.1694	0.0129	0.3318
心肌细胞的肾上腺素信号传导 Adrenergic signaling in cardiomyocytes	dre04261	1	1	1	0.3165	0.6288	0.5623
粘着斑 Focal adhesion	dre04510	2	2	5	0.0815	0.353	0.0038
肌动蛋白细胞骨架的调节 Regulation of actin cytoskeleton	dre04810	1	3	2	0.4049	0.1508	0.3075
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	dre00330	1	1	1	0.129	0.3022	0.2592
代谢途径 Metabolic pathways	dre01100	2	4	4	0.7076	0.8833	0.7787
糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis	dre00010	1	0	1	0.1323	—	0.2653
嘌呤代谢 Purine metabolism	dre00230	1	0	1	0.3006	—	0.5399
碳代谢 Carbon metabolism	dre01200	1	0	2	0.2096	—	0.0925
氨基酸的生物合成 Biosynthesis of amino acids	dre01230	1	0	2	0.1535	—	0.0512
ECM-受体相互作用 ECM-receptor interaction	dre04512	1	0	3	0.1422	—	0.0047
FoxO 信号通路 FoxO signaling pathway	dre04068	0	3	1	—	0.0529	0.5062

续表3

通路名称 Pathway name	通路编号 Pathway serial	暴露组 DEGs 数量 DEGs amount mapped to function pathways			暴露组通路富集 <i>P</i> 值 <i>P</i> value of exposure groups		
		GO1	PAHs	PAHs-GO1	GO1	PAHs	PAHs-GO1
溶酶体 Lysosome	dre04142	0	1	1	—	0.5117	0.4499
胞吞作用 Endocytosis	dre04144	0	2	2	—	0.4143	0.3301
粘附连接 Adherents junction	dre04520	0	1	1	—	0.4044	0.3508
间隙连接 Gap junction	dre04540	0	2	2	—	0.1334	0.0988
初级胆汁酸的生物合成 Primary bile acid biosynthesis	dre00120	1	0	0	0.0371	—	—
细胞因子与细胞因子受体的相互作用 Cytokine-cytokine receptor interaction	dre04060	1	0	0	0.2649	—	—
脂肪细胞因子信号通路 Adipocytokine signaling pathway	dre04920	1	0	0	0.1487	—	—
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	dre00190	0	2	0	—	0.1622	—
氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	dre00520	0	1	0	—	0.2559	—
视黄醇代谢 Retinol metabolism	dre00830	0	1	0	—	0.1868	—
RNA 转运 RNA transport	dre03013	0	1	0	—	0.5377	—
mRNA 监测途径 mRNA surveillance pathway	dre03015	0	1	0	—	0.3617	—
RNA 降解 RNA degradation	dre03018	0	1	0	—	0.3326	—
细胞周期 Cell cycle	dre04110	0	4	0	—	0.0055	—
p53 信号通路 p53 signaling pathway	dre04115	0	2	0	—	0.0522	—
背腹轴形成 Dorso-ventral axis formation	dre04320	0	1	0	—	0.1287	—
细胞粘附分子(CAMs) Cell adhesion molecules (CAMs)	dre04514	0	2	0	—	0.1451	—
嘧啶代谢 Pyrimidine metabolism	dre00240	0	1	0	—	—	0.3535
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	dre00250	0	1	0	—	—	0.1583
2-氧代羧酸代谢 2-oxocarboxylic acid metabolism	dre01210	0	1	0	—	—	0.0825
内质网中的蛋白质加工 Protein processing in endoplasmic reticulum	dre04141	0	1	0	—	—	0.5341
NOD 样受体信号通路 NOD-like receptor signaling pathway	dre04621	0	1	0	—	—	0.1822
光转导 Phototransduction	dre04744	0	2	0	—	—	0.0127

3 讨论(Discussion)

纳米材料进入水环境中,通过物理化学作用与有机污染物相互作用,可以通过影响有机污染物的生物可利用性和生物富集性影响污染物毒性。目前关于纳米材料和有机污染物复合污染的研究有一定的报道^[15,29-30]。本文中我们探索了GO与环境浓度PAHs对成年斑马鱼复合暴露诱发的脑组织酶含量的变化及复合暴露分子机理。

首先,在酶水平上,GO1组和PAHs-GO1组均显著降低成年斑马鱼脑组织 β -半乳糖苷酶和CYP1B1酶含量。 β -半乳糖苷酶是一种典型的细胞衰老标志物,其含量与细胞衰老速度相关^[31-32];另外,在生物细胞中, β -半乳糖苷酶的表达也同一些疾病的潜在风险密切相关^[33]。而CYP1B1酶是抗氧化酶的一种,可以对外源化学物质进行功能化反应^[34-35]。Zindler等^[14]的研究指出,自由溶解态的菲与羧基碳纳米管对大型蚤进行复合暴露后,使得菲的半最大效应浓度降低了25%~40%,从而增加菲对大型蚤的毒性效应。在本文中,GO01组、GO1组、PAHs-GO01组和PAHs-GO1组均可诱发 β -半乳糖苷酶和CYP1B1酶含量下降,甚至GO1组和PAHs-GO1组与对照组相比有显著下降的趋势,但是PAHs组却与对照组相比无显著差异,GO01组与PAHs-GO01组、GO1组与PAHs-GO1组亦无显著差异。造成这种结果的原因可能有二:(1)本文选取的GO和PAHs均为环境预测浓度和环境浓度,与既往相关复合暴露研究的浓度(碳材料 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上、PAHs为 $70\sim 735\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)相比较,因而两者复合暴露时诱发的典型毒性效应(如酶含量)的差异不明显;(2)GO对有机物如PAHs存在一定的吸附效应^[14,22],而复合暴露组与其对应的单独GO暴露组诱发的毒性效应在酶含量上非常相似,因此,我们有理由推论,在本文提供的复合暴露条件下,在对成年斑马鱼的酶的毒性效应的影响中GO是占据主导地位的。

分子水平上,GO与环境浓度PAHs对斑马鱼成鱼脑组织复合暴露诱发的效应与生物酶的结果不同,各暴露组诱发的基因水平变化的顺序为PAHs组>PAHs-GO1组>GO1组。3个暴露组诱发的共有DEGs仅占DEGs总数的8.0%,包括细胞代谢、紧密连接、钙离子转运和细胞骨架等基础功能,部分功能的基因表达变化已在本课题组之前的工作中进行了验证^[25];而每个暴露组独有的差异基因的高占比说

明在分子层面上,单独GO、单独PAHs和PAHs-GO复合后的毒性机理是总体来说区别仍然很大。尤其是PAHs作为一种经典的环境污染物,虽然在本研究的浓度下未对 β -半乳糖苷酶和CYP1B1酶的含量造成显著影响,但是分子层面上,PAHs诱发了紧密连接蛋白相关基因*cldnd*和*cldng*的下调。有报道指出,*cldng*和*cldnd*是编码紧密连接蛋白(claudin)的重要基因,而紧密连接蛋白的下调可能会引起生物血脑屏障的损伤^[36-37];而在GO1组和PAHs-GO1组中这2个基因并未出现显著变化,说明PAHs对生物血脑屏障的影响可能更明显,这可能是由于PAHs具有脂溶性,可通过代谢途径导致生物细胞DNA和蛋白的损伤或产生活性氧簇,从而诱发细胞的损伤^[38]。而在GO1组中,变化较为突出的基因功能以及相关的基因通路均与生物代谢和细胞骨架等功能相关,而这正是GO诱发的斑马鱼典型的分子效应^[25,39],同时与PAHs组对比可发现,GO1组在氧化酶相关基因的变化表现(如*steap4*和*ncfl*)要大于PAHs组,与本文中CYP1B1酶在GO组的变化趋势大于PAHs组的结果相一致。

在PAHs-GO1组中,复合暴露组诱发的DEGs所在的基因通路与GO1组和PAHs组均有15条通路相同,说明PAHs-GO1组的毒性效应在分子机理上兼具GO1组和PAHs组的特点,同时也说明了2点:(1)PAHs-GO1复合暴露组兼具GO和PAHs的分子毒性效应的特点与 β -半乳糖苷酶和CYP1B1酶的结果相呼应,即,其诱发的效应在2个单独暴露组中间;(2)虽然GO在水环境中会对PAHs产生吸附,且在对成年斑马鱼脑组织效应中GO占主导地位,但是在分子层面上,与GO共同存在的PAHs依然具有分子毒性,而且在复合后可能会诱发新的基因通路变化,值得我们注意;(3)本研究中采取的GO浓度和PAHs的浓度相对较小,在自然环境中,水体中PAHs的含量可能因为环境突发事件或者水文条件改变等发生变化,因而GO与动态变化的PAHs的复合暴露效应是值得进一步深入研究。本研究结果可为后续相关的环境浓度纳米材料与环境污染物的相互作用和复合毒性效应提供了重要的参考资料,同时也可作为研究GO与自然环境污染物的复合毒性机理研究提供了研究思路及技术研究手段。

通讯作者简介:欧阳少虎(1989—),男,博士,助理研究员,主要研究方向为纳米颗粒生物效应和生态毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Goodwin D G Jr, Adeleye A S, Sung L, et al. Detection and quantification of graphene-family nanomaterials in the environment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(8): 4491-4513
- [2] Hu X G, Zhou Q X. Health and ecosystem risks of graphene [J]. *Chemical Reviews*, 2013, 113(5): 3815-3835
- [3] Liu Y, Nie Y G, Wang J J, et al. Mechanisms involved in the impact of engineered nanomaterials on the joint toxicity with environmental pollutants [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 162: 92-102
- [4] Wang Y, Comer J, Chen Z F, et al. Exploring adsorption of neutral aromatic pollutants onto graphene nanomaterials *via* molecular dynamics simulations and theoretical linear solvation energy relationships [J]. *Environmental Science: Nano*, 2018, 5(9): 2117-2128
- [5] Sun Y B, Yang S B, Zhao G X, et al. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on graphene oxides and reduced graphene oxides [J]. *Chemistry, An Asian Journal*, 2013, 8(11): 2755-2761
- [6] Zhou Q X, Hu X G. Systemic stress and recovery patterns of rice roots in response to graphene oxide nanosheets [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(4): 2022-2030
- [7] Bragin G E, Parkerton T F, Redman A D, et al. Chronic toxicity of selected polycyclic aromatic hydrocarbons to algae and crustaceans using passive dosing [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35(12): 2948-2957
- [8] Bezza F A, Chirwa E M N. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil [J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 309: 563-576
- [9] 范博, 王晓南, 黄云, 等. 我国七大流域水体多环芳烃的分布特征及风险评价[J]. *环境科学*, 2019, 40(5): 2101-2114
Fan B, Wang X N, Huang Y, et al. Distribution and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in water bodies in seven basins of China [J]. *Environmental Science*, 2019, 40(5): 2101-2114 (in Chinese)
- [10] Tang Y M, Junaid M, Niu A P, et al. Diverse toxicological risks of PAHs in surface water with an impounding level of 175m in the Three Gorges Reservoir Area, China [J]. *The Science of the Total Environment*, 2017, 580: 1085-1096
- [11] Yan J X, Liu J L, Shi X, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water from three estuaries of China: Distribution, seasonal variations and ecological risk assessment [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 109(1): 471-479
- [12] Zhou Q X, Cheng Y, Zhang Q R, et al. Quantitative analyses of relationships between ecotoxicological effects and combined pollution [J]. *Science in China Series C, Life Sciences*, 2004, 47(4): 332-339
- [13] Linard E N, Apul O G, Karanfil T, et al. Bioavailability of carbon nanomaterial-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons to *Pimphales promelas*: Influence of adsorbate molecular size and configuration [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(16): 9288-9296
- [14] Zindler F, Glomstad B, Altin D, et al. Phenanthrene bioavailability and toxicity to *Daphnia magna* in the presence of carbon nanotubes with different physicochemical properties [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(22): 12446-12454
- [15] Wang Z, Zhang F, Wang S, et al. Assessment and prediction of joint algal toxicity of binary mixtures of graphene and ionic liquids [J]. *Chemosphere*, 2017, 185: 681-689
- [16] Garcia G R, Noyes P D, Tanguay R L. Advancements in zebrafish applications for 21st Century toxicology [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 161: 11-21
- [17] Audira G, Lee J S, Siregar P, et al. Comparison of the chronic toxicities of graphene and graphene oxide toward adult zebrafish by using biochemical and phenomic approaches [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 278: 116907
- [18] Alexandre-Moreno S, Bonet-Fernández J M, Atienzar-Aroca R, et al. Null *cyp1b1* activity in zebrafish leads to variable craniofacial defects associated with altered expression of extracellular matrix and lipid metabolism genes [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(12): 6430
- [19] Mu L, Gao Y, Hu X G. Characterization of biological secretions binding to graphene oxide in water and the specific toxicological mechanisms [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(16): 8530-8537
- [20] Zhang X L, Zhou Q X, Zou W, et al. Molecular mechanisms of developmental toxicity induced by graphene oxide at predicted environmental concentrations [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(14): 7861-7871
- [21] 孙晶, 欧阳少虎, 胡献刚, 等. 3 种碳纳米材料对斑马鱼生长发育、氧化应激及代谢的影响[J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(6): 101-114
Sun J, Ouyang S H, Hu X G, et al. Effects of three carbonaceous nanomaterials on the developmental toxicity, oxidative stress, and metabolic profile in zebrafish [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(6): 101-114 (in Chinese)

- nese)
- [22] Li X K, Mu L, Hu X G. Integrating proteomics, metabolomics and typical analysis to investigate the uptake and oxidative stress of graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Environmental Science: Nano*, 2018, 5 (1): 115-129
- [23] Nouara A, Wu Q L, Li Y X, et al. Carboxylic acid functionalization prevents the translocation of multi-walled carbon nanotubes at predicted environmentally relevant concentrations into targeted organs of nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nanoscale*, 2013, 5 (13): 6088-6096
- [24] Zou W, Zhou Q X, Zhang X L, et al. Characterization of the effects of trace concentrations of graphene oxide on zebrafish larvae through proteomic and standard methods [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 159: 221-231
- [25] Sun J, Zhou Q X, Hu X G. Integrating multi-omics and regular analyses identifies the molecular responses of zebrafish brains to graphene oxide: Perspectives in environmental criteria [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 180: 269-279
- [26] Cooper R J, Menking-Colby M N, Humphrey K A, et al. Involvement of β -catenin in cytoskeleton disruption following adult neural stem cell exposure to low-level silver nanoparticles [J]. *Neurotoxicology*, 2019, 71: 102-112
- [27] Fayeulle A, Veignie E, Slomianny C, et al. Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani* [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2014, 21(5): 3515-3523
- [28] Sforzini S, Oliveri C, Orrù A, et al. Application of a new targeted low density microarray and conventional biomarkers to evaluate the health status of marine mussels: A field study in Sardinian coast, Italy [J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 628-629: 319-328
- [29] Ferreira J L R, Lonné M N, França T A, et al. Co-exposure of the organic nanomaterial fullerene C60 with benzo[a]pyrene in *Danio rerio* (zebrafish) hepatocytes: Evidence of toxicological interactions [J]. *Aquatic Toxicology*, 2014, 147: 76-83
- [30] Baun A, Sørensen S N, Rasmussen R F, et al. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C(60) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 86(3): 379-387
- [31] Geiger B, Nguyen H M, Wenig S, et al. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using β -galactosidase from *Streptococcus thermophilus* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 116: 45-53
- [32] Geng Y Q, Guan J T, Xu X H, et al. Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(4): 866-869
- [33] Kim E J, Podder A, Maiti M, et al. Selective monitoring of vascular cell senescence via β -galactosidase detection with a fluorescent chemosensor [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 274: 194-200
- [34] Geier M C, Chlebowski A C, Truong L, et al. Comparative developmental toxicity of a comprehensive suite of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Archives of Toxicology*, 2018, 92(2): 571-586
- [35] Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1 [J]. *Cancer Science*, 2004, 95 (1): 1-6
- [36] van Leeuwen L M, Evans R J, Jim K K, et al. A transgenic zebrafish model for the *in vivo* study of the blood and choroid plexus brain barriers using claudin 5 [J]. *Biology Open*, 2018, 7(2): bio030494
- [37] Zhang J J, Liss M, Wolburg H, et al. Involvement of claudins in zebrafish brain ventricle morphogenesis [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012, 1257: 193-198
- [38] Henkler F, Stolpmann K, Luch A. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Bulky DNA adducts and cellular responses [J]. *Experientia Supplementum*, 2012, 101: 107-131
- [39] Chen M J, Yin J F, Liang Y, et al. Oxidative stress and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016, 174: 54-60 ◆