

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200706003

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)

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

孙晶, 欧阳少虎, 胡献刚, 周启星*

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: 2020-07-06 录用日期: 2020-08-31

摘要: 碳纳米材料(carbonaceous nanomaterials, CNMs)是人工纳米材料的重要组成部分, 在各领域应用广泛。以斑马鱼为模式动物, 比较了氧化石墨烯(graphene oxide, GO)、碳纳米管(carbon tube, CNT)和氧化石墨烯量子点(graphene oxide quantum dot, GOQD) 3种典型CNMs对斑马鱼幼鱼的生长发育毒性, 并探究了低浓度长时间暴露下3种CNMs对斑马鱼成鱼亚急性毒性效应及分子机制。结果表明, 0.01~10 mg·L⁻¹的3种CNMs对斑马鱼胚胎发育无显著影响, 但会诱导产生活性氧簇(ROS)和线粒体膜损伤, 其毒性排序依次是GOQD>CNT>GO; 环境相关浓度(0.01 mg·L⁻¹)下斑马鱼成鱼在3种CNMs中亚急性暴露21 d后, 会引起斑马鱼腮和肾脏细胞衰老, 同时抑制斑马鱼总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性; 代谢组学分析表明, 3种CNMs对斑马鱼代谢组影响的顺序为GOQD>CNT>GO, T-SOD活性与代谢组学关联分析表明, 脂肪酸和脯氨酸的变化是引起斑马鱼T-SOD活性变化的分子机理之一。该结果为评价3种典型CNMs对生态系统和人体健康的潜在影响提供了理论依据。

关键词: 氧化石墨烯; 碳纳米管; 量子点; 斑马鱼; 纳米毒性; 活性氧; 代谢组学

文章编号: 1673-5897(2020)6-101-14 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Three Carbonaceous Nanomaterials on the Developmental Toxicity, Oxidative Stress, and Metabolic Profile in Zebrafish

Sun Jing, Ouyang Shaohu, Hu Xiangang, Zhou Qixing*

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

Received 6 July 2020 accepted 31 August 2020

Abstract: As an important part of artificial nanomaterials, carbonaceous nanomaterials (CNMs) are widely applied in a plenty of areas such as energy, manufacturing and pharmaceutical industries. In the present study, the developmental toxicity, induced by three typical CNMs including graphene oxide (GO), carbon nanotube (CNT) and graphene oxide quantum dot (GOQD) was investigated in the typical model animal, zebrafish larva. The induced sub-acute toxicity at the low concentration of GO, CNT and GOQD was investigated in adult zebrafish, either. Moreo-

基金项目: 国家自然科学基金-山东联合基金(U1906222); 高等学校学科创新引智计划项目(T2017002); 国家自然科学基金面上项目(21677080)

第一作者: 孙晶(1990—), 女, 博士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: sunjing90s@yeah.net

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

ver, the molecular mechanisms at the level of metabolomics were also explored. The results showed that there was a significant increase in reactive oxygen species (ROS), and mitochondrial membrane damage was caused by GO, CNT and GOQD in zebrafish larva. However, there was no significant developmental toxicity on zebrafish larva. The toxicity order in terms of the ROS increase and mitochondrial membrane damage was GOQD>CNT>GO. The chronic exposure at the typical environment-associated concentration ($0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) of CNMs can induce gill and kidney cell senescence of adult zebrafish. Meanwhile, it can also inhibit total superoxide dismutase (T-SOD) activity in adult zebrafish in the subacute toxicity test (21 d) at the concentration of $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. The metabolomics research revealed that the toxicity order at the environment-associated concentration acting on adult zebrafish was GOQD>CNT>GO; and it showed that fatty acids and proline turbulence may be responsible for one of the molecular mechanisms of T-SOD inhibition in adult zebrafish. This work can supply rationale to evaluate the potential risk of ecosystems and human health induced by the three typical CNMs.

Keywords: graphene oxide; carbon nanotube; graphene oxide quantum dot; zebrafish; nanotoxicology; reactive oxygen species; metabolomics

近几年,碳纳米材料(carbonaceous nanomaterials, CNMs)因其具有卓越的导电性、光学性质、磁性和反应活性等性质被广泛应用于在医学、物理学、化学、生物和环境保护等研究领域中,尤其是在细胞成像、药物传递、生物传感器和储能等方向上^[1-4]。随着CNMs的快速发展与应用,很多与之相关的工业领域都产生了革命性的变化,因而CNMs也被认为是一种未来革命性的材料^[2-4]。而氧化石墨烯(graphene oxide, GO)、碳纳米管(carbon tube, CNT)和氧化石墨烯量子点(graphene oxide quantum dot, GOQD)作为CNMs家族重要组成成员,是其中的“佼佼者”且商业价值巨大^[5-6]。预计到2027年,仅石墨烯类产品的年生产量有望达到3 800 t,年产值达30亿美元。随着CNMs在消费产品中的生产和使用日益增加,其释放到生态环境且导致人类暴露的风险越来越大,了解其环境归趋和潜在的健康和生态风险已成为人们关注的焦点^[7]。

目前,在自然水体、土壤、沉积物和生物体中均已检测出CNMs的存在^[7]。生物体很可能会接触释放到环境中的CNMs,了解这些暴露的影响很重要。目前,已经有大量的文献报道了CNMs对藻、鱼、细菌和细胞的纳米毒性效应^[8-11]。通常而言,纳米材料的自身性质,如尺寸、分散性、形状、表面电荷和化学成分,会极大影响其生物效应^[12]。但是,GO、CNT和GOQD这3种CNMs哪种材料的生态健康风险更低和更安全?对于这个问题还存在着大量的未知,而这对CNMs在未来的设计、生产和应用至关重要。斑马鱼是一种常用的模式生物,也是国际标准化组织(ISO)认可的5种鱼类实验动物之一,已经

成为发育生物学、遗传学和毒理学等研究常用的模式生物^[13-14]。因此,本研究选取GO、CNT和GOQD作为CNMs代表纳米材料,比较了其对斑马鱼胚胎生长发育毒性的影响。其次,因为目前仍缺乏环境当量浓度下CNMs的毒理数据资料及详细的致毒机理。在本研究中,根据Jia等^[8]的工作,选取一个环境痕量浓度($0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)对斑马鱼成鱼进行了长达21 d的亚急性毒性测试,并利用代谢组学技术对CNMs亚急性毒性机理进行了阐释,为今后详细阐述CNMs纳米毒性机理提供新思路和技术支撑。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 CNMs与受试生物

1.1.1 CNMs来源

GO(货号XF002-1)、CNT(货号S07)和GOQD(货号XF042),均购自中国南京先丰纳米材料科技有限公司,其基本产品性质如表1所示,具体形貌如图1所示。

1.1.2 受试生物

6月龄的成年野生型斑马鱼(*Danio rerio*),购自国家斑马鱼资源中心(China Zebrafish Resource Center, CZRC)。

1.2 CNMs形貌表征

取少量GO和CNT粉末分别分散于40 mL无水乙醇(分析纯,中国天津市康科德技术有限公司)中,冰浴超声30 min,即为GO乙醇分散液和CNT乙醇分散液。取10 μL GOQD悬浮原液至40 mL无水乙醇中,冰浴超声30 min后,即得到GOQD乙醇分散液。为测定材料的形貌,分别取10 μL GO、CNT和GOQD乙醇分散液滴于电镜载网(AZH200,

中国北京中镜科仪技术有限公司)上,使用透射电子显微镜(TEM)(HT7700,日本 Hitachi 公司)观察,电镜工作电压为 80 kV;为观察和测定材料的厚度,分别取 10 μL GO、CNT 和 GOQD 乙醇分散液滴在云母片上,使用原子力电子显微镜(AFM)(Dimension Icon,美国 Bruker 公司)进行观察。AFM 图片用 NanoScope Analysis 1.8 软件进行分析。

1.3 斑马鱼的培养与 CNMs 暴露实验

1.3.1 斑马鱼培养

斑马鱼饲养条件为:循环水箱培养,培养水为海盐浓度 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的人工海水,水温为 $(28\pm 0.5)^\circ\text{C}$,光照周期为 14 h 光照:10 h 黑暗,每日投喂丰年虾 2 次。斑马鱼胚胎的获得:挑选个体大小相同雌雄斑马鱼于前一天晚上按照雌雄比 1:1 放入产卵盒中,将雌鱼和雄鱼使用隔板隔开,将产卵盒放入人工气候培养箱中(SPX-300I-C,中国上海博迅医疗生物仪器股份有限公司)。次日,在斑马鱼光照周期开始时取出产卵盒中的隔板,雌雄斑马鱼自然交配,1 h 后,收集鱼卵,得到斑马鱼胚胎。使用斑马鱼胚胎培养液 E3 溶液清洗干净,其中, E3 溶液组分为: $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $0.17 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl, $0.33 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ CaCl_2 , $0.33 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO_4 , pH = 7.4。以上试剂均为分析纯,购自中国天津市康科德科技有限公司。胚胎清洗干净后将健康斑马鱼胚胎转移到 E3 培养液中,置于人工气候培养箱中培养至 2.5 hpf(hours post fertilization),用于后续实验研究。

1.3.2 斑马鱼幼鱼 CNMs 暴露

准确称取 100 mg GO,使用 E3 培养液将其分散并定容至 1 L,制成 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 分散液母液,冰浴超声 30 min 至其充分分散后备用;取 50 mL $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 分散液使用 E3 稀释至 500 mL,得到 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO 培养液,再次将其使用 E3 培养液逐级稀释,得到 1 、 0.1 和 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GO-E3 培养液。CNT-E3 与 GOQD-E3 培养液的配制方法与 GO-E3 培养液的配制方法步骤相同。将 2.5 hpf 斑马鱼胚胎暴露于 E3 培养液(空白对照组)以及 0.01 、 0.1 、 1 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 种 CNMs E3 分散液中 120 h。暴露实验在 96 孔板中进行,每孔一枚受精卵。每隔 24 h 更换一次纳米材料分散液。整个胚胎染毒实验均在人工气候培养箱中进行,培养箱温度为 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$,光照周期为光暗比 14 h:10 h。

1.3.3 斑马鱼成鱼 CNMs 暴露

$0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CNMs 斑马鱼成鱼暴露液的配制方法同 1.3.2,但其分散系为 $60 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 海盐人工海水。体型相近、性别随机的斑马鱼成鱼被随机分为 4 组,每组 6 条,置于 1 L 烧杯中,烧杯中暴露液体积为 1 L。对照组与暴露组均被置于人工气候培养箱中,培养箱温度为 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$,光照周期为光暗比 14 h:10 h。每日投喂 2 次商业鱼饲料(中国惠州市寸金饲料有限公司)。对照组与暴露组培养液每隔一天更换一次,参考 Jia 等^[8]的工作,斑马鱼成鱼暴露总时长为 21 d。

表 1 3 种碳纳米材料(CNMs)基本信息

Table 1 The basic properties of three carbonaceous nanomaterials (CNMs)

	GO	CNT	GOQD
纯度 Purity	>99%	>95%	-
材料状态 Material condition	固体粉末 Powder	固体粉末 Powder	水分散液 浓度: $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Aqueous dispersion Concentration: $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
形貌 Shape	单层片状 Single layer	短管状 Nozzle stub	点状 Dot
尺寸 Size	片径: $500 \text{ nm} \sim 5 \mu\text{m}$ Diameter: $500 \text{ nm} \sim 5 \mu\text{m}$ 厚度: $0.8 \sim 1.2 \text{ nm}$ Thickness: $0.8 \sim 1.2 \text{ nm}$	外径: $1 \sim 2 \text{ nm}$ External diameter: $1 \sim 2 \text{ nm}$ 长度: $1 \sim 3 \mu\text{m}$ Length: $1 \sim 3 \mu\text{m}$	直径: $<15 \text{ nm}$ Diameter: $<15 \text{ nm}$
制备方法 Preparation method	Hummers 法 Hummers method	浮动催化法 Floating catalytic method	有机合成 Organic synthesis

注:GO 为石墨烯,CNT 为碳纳米管,GOQD 为氧化石墨烯量子点。

Note: GO stands for graphene oxide; CNT stands for carbon tube; GOQD stands for graphene oxide quantum dot.

1.4 斑马鱼幼鱼生长发育毒性观察

1.4.1 斑马鱼幼鱼死亡和畸形观察

每个浓度取 90 尾 2.5 hpf 斑马鱼胚胎于 96 孔板中进行 120 h 的暴露实验,设置 3 个生物重复,即每组包含 30 个斑马鱼胚胎。使用体视镜(ZL 61,日本 Olympus 公司)观察记录斑马鱼胚胎/幼鱼,以不运动、无心跳和血液不流动(因斑马鱼幼鱼周身组织透明,体视镜下可观察到活体斑马鱼心脏跳动和血液流动,斑马鱼心脏区域如图 2 所示)作为死亡标准统计暴露 120 h 后斑马鱼死亡率;每天在体视显微镜下观察斑马鱼幼鱼的畸形情况,以心包/卵黄囊水肿、尾/脊椎弯曲和面部畸形等标准进行判断,最终统计各组发育至 120 hpf 的斑马鱼幼鱼的畸形率。

1.4.2 斑马鱼幼鱼活性氧簇观察

斑马鱼幼鱼活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的测定可以通过测定 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)(中国北京索莱宝科技有限公司)通过细胞膜后生产 DCF 的荧光强度来实现。每个 CNMs 浓度组取 24 条发育至 2.5 hpf 斑马鱼胚胎于 96 孔板中暴露 120 h,设置 3 个生物重复。暴露结束后,每组随机取出 4 条斑马鱼幼鱼,用 E3 培养液冲洗干净后,在含 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA 的 E3 培养液中避光孵育 0.5 h。染色结束后,用新鲜 E3 培养液冲洗幼鱼 6 次,染色完成的斑马鱼在 0.03% 三卡因(纯度 99%,美国 Sigma 公司)中麻醉后,于倒置荧光显微镜(X71,日本 Olympus 公司)下观察拍照,激发波长和发射波长分别为 488 nm 和 535 nm。利用 Image J 软件对斑马鱼平均荧光强度进行定量分析。

1.4.3 斑马鱼幼鱼线粒体膜电位观察

JC-1 是检测线粒体膜电位的理想荧光探针。JC-1(美国 Adipogen 公司)红色荧光到绿色荧光的转变显示线粒体膜电位下降。每个 CNMs 浓度组取 24 条发育至 2.5 hpf 斑马鱼胚胎于 96 孔板中暴露 120 h,设置 3 个生物重复,即每组包含 8 条斑马鱼幼鱼。暴露结束后,每组随机取出 4 条斑马鱼幼鱼,用 E3 溶液冲洗干净后,在含 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JC-1 的 E3 溶液中避光孵育 1 h。染色结束后,用新鲜 E3 溶液冲洗幼鱼 6 次,染色完成的斑马鱼在 0.03% 三卡因中麻醉后,于倒置荧光显微镜(X71,日本 Olympus 公司)下观察拍照,激发波长分别为 488 nm 和 535 nm。利用 Image J 软件对斑马鱼的平均荧光强度进行定量分析。

1.5 斑马鱼成鱼亚急性毒性测试

1.5.1 鱼腮和肾组织石蜡切片的制作及 β -半乳糖苷酶染色

斑马鱼成鱼暴露于 CNMs 分散液 21 d 后,将其取出,使用 0.06% 三卡因溶液安乐死后迅速于冰上解剖,取出斑马鱼成鱼的腮和肾脏置于 4% 多聚甲醛溶液(中国鼎国生物科技有限公司)固定,并将其置于 4 °C 冰箱过夜。过夜后组织使用自来水流水冲洗 24 h,之后进行脱水浸蜡,其过程为:70% 乙醇,30 °C,30 min;85% 乙醇,30 °C,10 min;95% 乙醇,30 °C,10 min;100% 乙醇 I,30 °C,10 min;100% 乙醇 II,30 °C,30 min;二甲苯/乙醇,30 °C,30 min,二甲苯 II,30 °C,15 min;二甲苯 III,30 °C,15 min;石蜡 I,60 °C,20 min;石蜡 II,60 °C,10 min;石蜡 III,60 °C,10 min。浸蜡后的组织块使用包埋机(EG1150H,德国 LEICA 公司)包埋,手动切片机(RM2235,德国 LEICA 公司)将组织切为 $5 \mu\text{m}$ 切片后,展片烘干备用。斑马鱼组织切片 β -半乳糖苷酶活性使用细胞衰老 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(C0602,中国上海碧云天生物技术有限公司)检测,检测过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.5.2 丙二醛(MDA)含量测试

斑马鱼成鱼暴露于 CNMs 分散液 21 d 后,将其取出,使用 0.06% 三卡因溶液安乐死后,将斑马鱼表面清洗干净,迅速于冰上将斑马鱼分割,置入玻璃匀浆器制成 10% 生理盐水匀浆后使用冷冻离心机(5804 R,德国 Eppendorf 公司)在 4 °C 下 $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清,随后使用 MDA 测试试剂盒(A003-1-2,中国南京建成生物工程研究所)进行测定,上清液蛋白浓度使用蛋白质含量试剂盒(A045-4-2,中国南京建成生物工程研究所)测定。试剂盒测定过程严格按照试剂盒说明书要求进行。

1.5.3 总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性测定

斑马鱼成鱼暴露于 CNMs 分散液 21 d 后,将其取出,使用 0.06% 三卡因溶液安乐死后,将斑马鱼表面清洗干净,迅速于冰上将斑马鱼分割,置入玻璃匀浆器制成 10% 生理盐水匀浆后使用冷冻离心机(5804 R,德国 Eppendorf 公司)在 4 °C 下 $3\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清,随后使用 T-SOD 测试试剂盒(A001-1-2,中国南京建成生物工程研究所)进行测定,上清液蛋白浓度使用蛋白质含量试剂盒(A045-4-2,中国南京建成生物工程研究所)测定。

1.6 代谢组学分析

斑马鱼成鱼暴露于 CNMs 分散液 21 d 后,将其取出,迅速置于液氮中 5 min 后取出,在液氮上的研钵中将组织研磨成粉末后进行代谢物提取。代谢物提取过程为:(1)在研磨好的样品中加入 15 mL 提前保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的提取混合溶液 I ($V(\text{甲醇}):V(\text{氯仿}):V(\text{水})=2.5:1:1$);(2)微波辅助萃取, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,30 min,萃取完成后离心,收集上清液,然后加入 15 mL 提前保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的提取混合溶液 I ($V(\text{甲醇}):V(\text{氯仿}):V(\text{水})=2.5:1:1$) (用量与步骤(1)相同),微波辅助萃取, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$,15 min;(3)收集第二次上清液,并与第一次收集的上清液混合于 50 mL 离心管中。加入 500 μL 灭菌后的去离子水, $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min;(4)完成以上步骤后将离心管静置,上层溶液是甲醇/水相,下层为氯仿相。甲醇/水相冷冻干燥,用氮气吹干氯仿相;(5)样品干燥后,采用两步法进行衍生化。首先加入 50 μL 用吡啶溶解的甲氧氨基盐酸盐($20\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),密封、涡旋、短暂离心, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴 90 min;(6)加入 80 μL 硅烷化试剂 N-甲基-N-(三甲基硅烷)-三氟乙酰胺(MSTFA)(中国上海安谱实验科技有限公司), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min;(7)转移衍生化好的样品到适合气相质谱(GC-MS)分析的内衬管中。

斑马鱼代谢物使用 GC-MS(6890A/5977A,美国 Agilent 公司)进行分析。测试参数如下。(1)气相色谱进样参数:进样量 1 μL ,进样口温度 $230\text{ }^{\circ}\text{C}$,调整分流进样模式(1:50),载气为氮气,流速 $2\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,使用自动进样器进样。气相色谱参数:MDN-35 毛细管色谱柱(30 m),温度程序为 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温 2 min,然后以 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温到 $330\text{ }^{\circ}\text{C}$,持续 6 min,传输线(transfer line)温度设定为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。(2)质谱参数:离子源温度设定为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,质量扫描范围是 $m/z\ 70\sim 600$,采集速率每秒 20 个扫描,质谱电子轰击源灯丝开启时间在色谱溶剂延迟 170 s 后,检测器电压 $1\ 700\sim 1\ 850\ \text{V}$,质谱亏损设置为 0,灯丝偏置电流为 70 V,仪器自动调谐。谱图解卷积参数:力可公司自带的商业软件 Chroma TOF,基线消除(baseline offset)设置为 1(0.5~1);谱图平滑(smoothing)为 5 数据点(3~7),峰宽(peak width)3 s(3~4 s);信噪比 S/N(signal-to-noise ratio)为 10(2~15)。

1.7 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。代谢物热图使用软件 MeV 4.9 绘制,同时将筛选出的代谢物数据导入 SIMCA-P11.5 软件包进行多元统计分析,数据先用无监督统计模型主成分分析(principal components analysis, PCA),得出对照组和处理组之间代谢物的离散趋势。使用有监督统计模型的正交最小二乘法判别分析(orthogonal partial least squares discriminate analysis, OPLS-DA)^[15-16],将差异代谢物与斑马鱼的 T-SOD 活性变化建立相关性,选择定义变量权重重要性排序(variable importance in projection, VIP) >1 的变量进行研究。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 3种 CNMs 材料的表征

纳米材料的毒性与其自身的理化性质(如形貌和尺寸)紧密相关。3种 CNMs 的形貌用 TEM 和 AFM 观察,结果如图 1 所示。如图 1(a)和图 1(d),GO 的形貌为单层片状,片径范围为 $(1.5\pm 0.50)\ \mu\text{m}$,厚度范围 $(1.15\pm 0.25)\ \text{nm}$;CNT 的形貌为长度在微米级别的细长管状结构,管外径约为 2.58 nm,内径约为 0.8~1.6 nm。而 GOQD 为成不规则的点状形貌,其粒径大小约为 $(20\pm 5)\ \text{nm}$,高度范围为 $(7.8\pm 1.1)\ \text{nm}$ 。傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)和 X 射线光子能谱(XPS)可以用来表征纳米材料的表面化学官能团。根据我们之前 FTIR 表征的结果可知,GO、CNT 和 GOQD 表面都具有丰富的官能团,包括—OH、—COOH 和—O—。XPS 的结果表明,GO 主要由 67.2% C 1s、30.4% O 1s 和 2.4% S 2p 组成,CNT 由 62.7% C 1s、29.4% O 1s、7.2% Na 1s 和 0.7% Cl 2p 组成,而 GOQD 则由 78.2% C 1s、16.5% O 1s 和 5.3% Na 1s 组成^[17]。其中,Na、Cl 和 S 等元素都是合成 CNMs 过程中引入的杂离子。

2.2 3种 CNMs 对斑马鱼幼鱼生长发育的影响

纳米材料对斑马鱼胚胎/幼鱼的生长发育毒性是常规的纳米毒性指标。在此,考察了 3种 CNMs 短时间暴露(120 hpf)对斑马鱼胚胎/幼鱼生长发育的影响,包括死亡率、畸形率、线粒体膜电位损伤和 ROS 等毒性指标。如图 2(a)所示,斑马鱼幼鱼暴露于 GO、CNT 和 GOQD 组的死亡率约为 3.4%~9.1%,略高于空白对照组(2.3%),但是都没有显著差异($P>0.05$)。类似的趋势出现在斑马鱼幼鱼畸形率方面。如图 2(b)所示,空白对照组的畸形率约为 0,而 GO、CNT 和 GOQD 组的畸形率都在 5% 以下,无显著性差异($P>0.05$)。以上结果表明,在 0.01~10

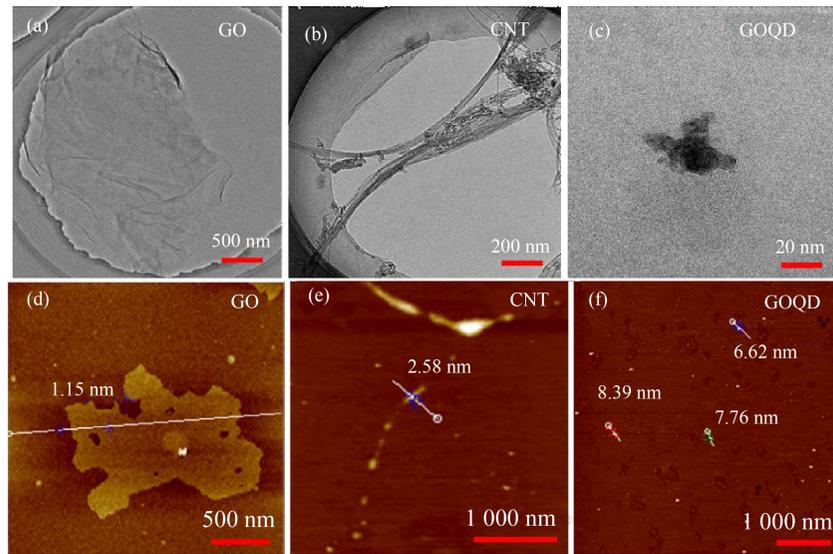


图1 3种碳纳米材料的透射电子显微镜(TEM)和原子力电子显微镜(AFM)的形貌表征

注:(a)、(b)和(c)分别为GO、CNT和GOQD的TEM图片;(d)、(e)和(f)分别为GO、CNT和GOQD的AFM图片。

Fig. 1 The morphology of three carbonaceous nanomaterials characterized by emission electron microscope (TEM) and atomic force electron microscope (AFM)

Note: (a), (b) and (c) are TEM images of GO, CNT and GOQD; (d), (e) and (f) are AFM images of GO, CNT and GOQD.

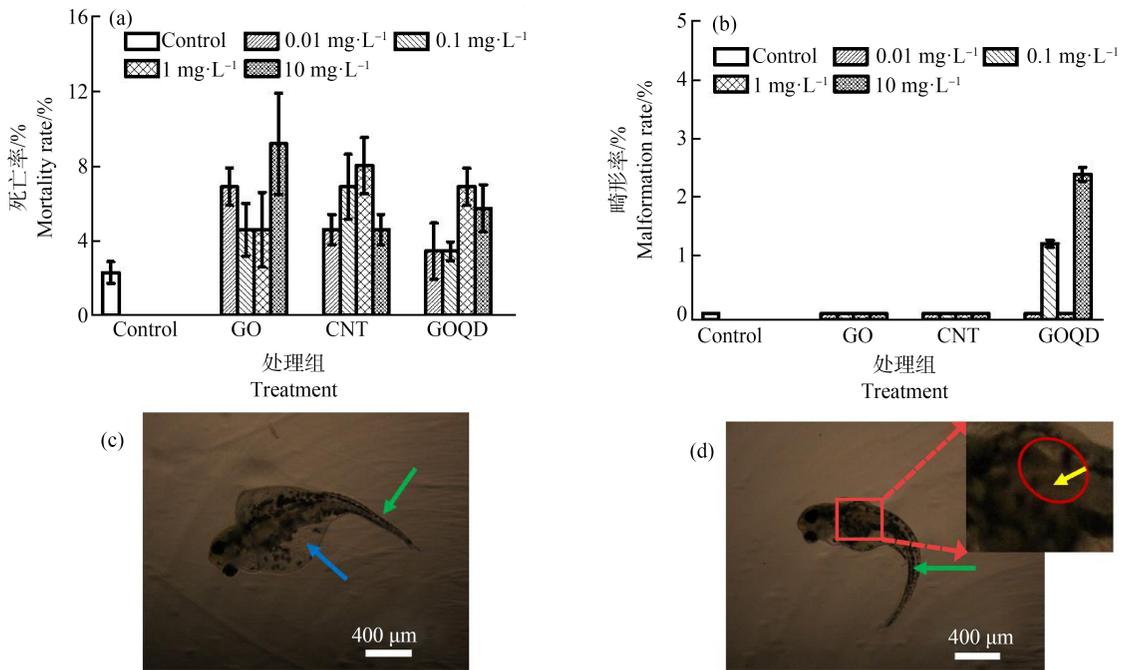


图2 GO、CNT和GOQD对斑马鱼幼鱼死亡率(a)及畸形率(b)的影响

注:(a) GO、CNT和GOQD对斑马鱼幼鱼死亡率的影响;(b) GO、CNT和GOQD对斑马鱼幼鱼畸形率的影响;(c)~(d)部分畸形斑马鱼实例,其中,蓝色箭头所指区域为心包/卵黄囊水肿,绿色箭头所指区域为尾/脊椎弯曲,(d)中红色方框放大部分黄色箭头所指为斑马鱼幼鱼心脏区域;每个实验组设置3个平行,观察87个胚胎/幼鱼。

Fig. 2 Effects of GO, CNT and GOQD on the mortality rates (a) and malformation rates (b) of zebrafish larva

Note: (a) mortality rates induced by GO, CNT and GOQD of zebrafish during embryogenesis; (b) malformation rates induced by GO, CNT and GOQD of zebrafish during embryogenesis; (c) ~ (d) partial malformed zebrafish larva; blue arrow and green arrow represent pericardial/yolk sac edema and tail/spine curvature, respectively; in figure (d), area in red rectangle was enlarged and red ellipse and yellow arrow mark the cardiac region in zebrafish larva; eighty-seven embryos were observed from each of three treatment replicates.

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下短期暴露(120 hpf)于这3种CNMs均不会对斑马鱼幼鱼的存活和致畸方面产生显著性的影响。

氧化应激是已知的纳米材料对鱼类致畸机制之一^[18]。斑马鱼幼鱼暴露于不同浓度的GO、CNT和GOQD 120 hpf后,斑马鱼幼鱼体内总ROS含量的变化如图3所示。荧光强度的水平与斑马鱼体内ROS含量成正比,其结果如图3(a)~图3(d)所示,具体统计结果如图3(e)所示。其中,GO组虽然在4个浓度上对斑马鱼幼鱼体内的ROS影响并不显著,但其在平均值上,尤其是在浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼幼鱼ROS含量平均值相对于对照组有上升;CNT和GOQD在 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对斑马鱼幼鱼的ROS影响与GO类似,即没有产生显著影响,但当CNT和GOQD的浓度

为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼幼鱼体内ROS含量显著升高($P<0.05$)。Chen等^[19]的研究表明,GO可通过升高生物体内的ROS水平诱发斑马鱼的发育。本研究的结果表明, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CNT和GOQD均会引起斑马鱼幼鱼体内发生显著的氧化应激,且 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GOQD处理组斑马鱼幼鱼体内ROS含量较对照组显著上升,该结果与斑马鱼发育毒性实验观察到的畸形率上升趋势相一致(图2(b))。GO、CNT和GOQD低浓度($0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)暴露均不会引起斑马鱼幼鱼体内ROS含量的显著上升,而 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CNT和GOQD会诱导斑马鱼幼鱼体内ROS含量显著上升,从而产生氧化损伤。由此可知,在引起斑马鱼幼鱼ROS含量上升,造成斑马鱼幼鱼氧化应激方面,3种CNMs的毒性影响排序为 $\text{GOQD}>\text{CNT}>\text{GO}$ 。

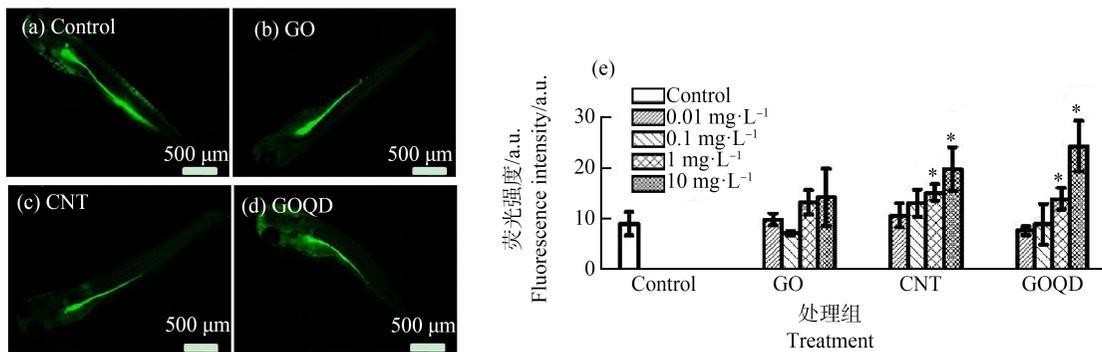


图3 GO、CNT和GOQD暴露120 hpf后对斑马鱼幼鱼体内活性氧簇(ROS)的影响

注:(a)、(b)、(c)和(d)分别为空白对照组、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO暴露组、 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CNT暴露组和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GOQD暴露组的ROS荧光的代表性照片;(e)为暴露120 hpf后斑马鱼幼鱼体内ROS的荧光强度;黑色的*表示实验组与空白对照组有显著性差异 $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effects of GO, CNT and GOQD on the reactive oxygen species (ROS) of zebrafish larvae after 120 hpf exposure

Note: (a), (b), (c) and (d) are representative images of the ROS fluorescence in control group, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO exposure group, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CNT exposure group and $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GOQD exposure group; (e) fluorescence intensity representing the ROS content in zebrafish larvae after exposure to nanoparticles until 120 hpf; the black asterisks denote significant differences at $P<0.05$ level compared with the control groups.

线粒体膜电位损失是纳米材料诱导产生氧化应激压力的重要途径^[20]。斑马鱼幼鱼暴露在GO、CNT和GOQD 120 hpf后的线粒体膜电位损失如图4(a)~图4(d)所示,图中红色荧光显示健康线粒体膜,绿色荧光代表受损伤的线粒体膜,其红/绿荧光的平均强度比值为衡量斑马鱼线粒体膜电位健康程度的指标。红/绿荧光的平均强度比值越大,代表斑马鱼受到线粒体膜电位的损伤越小,反之则受到的损伤越大。从图4(e)中可以看出,与空白对照组(红/绿荧光比值=3.8)相比,GO、CNT和GOQD暴露组斑马鱼幼鱼体内红/绿色荧光的比值范围分别为2.1

~3.0、2.1~2.7和1.8~2.3。值得注意的是,3种CNMs能诱导斑马鱼幼鱼线粒体膜电位值下降,但是不同浓度的同种CNMs组别中斑马鱼线粒体膜电位的变化并未出现明显的剂量-效应关系。与空白对照组相比,在最低浓度 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的3种CNMs暴露下,斑马鱼幼鱼线粒体膜电位损伤并不显著($P>0.05$)。GO与CNT在 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露时能引起了斑马鱼幼鱼线粒体膜电位的显著下降($P<0.05$)。在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的GO、CNT和GOQD暴露下,红/绿色荧光的比值分别下降了18.9% ($P>0.05$)、27.1% ($P<0.05$)和52.3% ($P<0.05$)。以上结

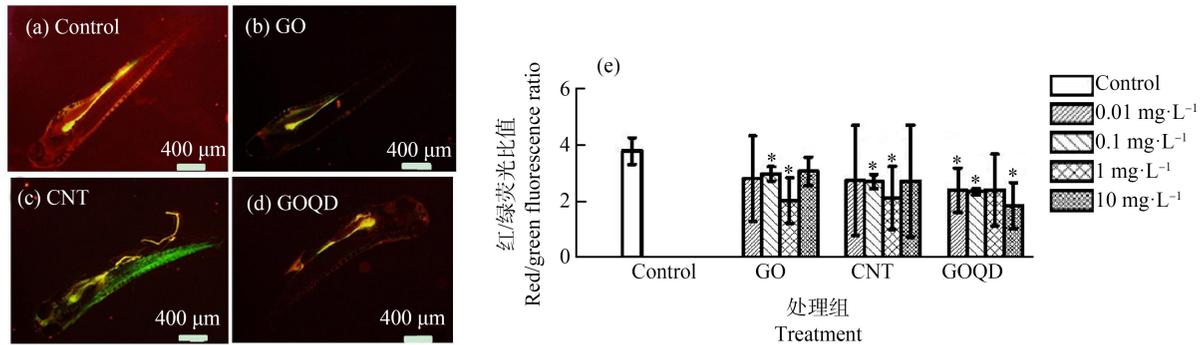


图4 GO、CNT和GOQD暴露120 hpf后对斑马鱼幼鱼线粒体膜电位损伤的影响

注:(a)、(b)、(c)和(d)分别为空白对照组、10 mg·L⁻¹ GO暴露组、10 mg·L⁻¹ CNT暴露组和10 mg·L⁻¹ GOQD暴露组的线粒体膜电位损伤的代表性照片;(e)为暴露120 hpf后斑马鱼幼鱼体内线粒体膜电位损伤红/绿荧光的比值的统计;黑色的*表示实验组与空白对照组有显著性差异 $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Effects of GO, CNT and GOQD on the mitochondrial membrane potential loss of zebrafish larvae after 120 hpf exposure

Note: (a), (b), (c) and (d) representative images of the mitochondrial membrane potential loss in control group, 10 mg·L⁻¹ GO exposure group, 10 mg·L⁻¹ CNT exposure group and 10 mg·L⁻¹ GOQD exposure group; (e) red to green fluorescence intensity ratios in zebrafish larvae after exposure to nanoparticles until 120 hpf; the black asterisks denote significant differences at $P < 0.05$ level compared with the control groups.

果表明,3种CNMs暴露均会对斑马鱼幼鱼造成一定的线粒体损伤,但在不同种类和浓度CNMs的作用下这种损伤的大小是有差异的。3种CNMs对斑马鱼幼鱼线粒体膜电位损伤影响排序为GOQD>CNT>GO,这结果与对ROS的影响是一致的(图3)。

综上所述,GO、CNT和GOQD在不同浓度短期暴露(120 hpf)下并未对斑马鱼幼鱼的存活和致畸造成特别显著的影响,但是GO、CNT和GOQD会诱导斑马鱼幼鱼产生ROS和线粒体膜电位损伤。此外,相比GO和CNT,GOQD能诱导产生更多的ROS和更强的线粒体膜电位损伤。

2.3 3种CNMs对斑马鱼成鱼的亚急性毒性

目前,关于纳米材料对斑马鱼毒性的研究多集中于斑马鱼幼鱼的发育毒性和高浓度(mg·L⁻¹级)纳米材料的急性毒性^[19,21-22]。但环境中CNMs在自然水体和土壤等环境介质中的检出或预测浓度大约在ng·L⁻¹~μg·L⁻¹级别^[23-24]。鉴于生态环境中生物的暴露模式,研究长期的、低浓度的CNMs的水生生物暴露毒性机理必不可少^[13,17]。就本研究而言,在斑马鱼幼鱼的毒性暴露实验中,0.01 mg·L⁻¹浓度相对于其他浓度对斑马鱼存活率、畸形率、线粒体损伤和ROS含量的影响最小,但是0.01 mg·L⁻¹也会引起死亡率上升,且0.01 mg·L⁻¹GOQD能诱导产生明显的线粒体膜损伤。基于以上因素的考虑,选取CNMs对斑马鱼成鱼亚急性毒性暴露的浓度为0.01 mg·L⁻¹,暴露时间为21 d。通过斑马鱼β-半乳糖苷酶、MDA及T-SOD等毒性指标的测定来比较探索

3种CNMs对斑马鱼成鱼的亚急性毒性效应。

β-半乳糖苷酶是一种典型的细胞衰老标志物,其含量越高表明细胞衰老越快^[25-26]。斑马鱼腮和肾β-半乳糖苷酶表达结果分别如图5(a)~图5(d)和图5(e)~图5(h)所示,细胞蓝色的点为β-半乳糖苷酶表达。对照组与处理组的β-半乳糖苷酶表达通过Image J统计出表达细胞个数来衡量,其统计结果如图5(i)~图5(j)所示。结果表明,3种纳米材料均会引起斑马鱼成鱼的腮部和肾脏β-半乳糖苷酶表达显著升高($P > 0.05$),这说明,GO、CNT和GOQD均会引起斑马鱼的腮和肾脏细胞的衰老。鱼类的腮和肾是斑马鱼重要的呼吸和代谢器官,其作用涉及斑马鱼呼吸和血液代谢等,其细胞活性对于斑马鱼生理代谢有着重要作用^[27-28]。因而,斑马鱼腮和肾的细胞衰老可能诱导斑马鱼产生潜在的健康风险。

由图3和图4结果可知,1 mg·L⁻¹和10 mg·L⁻¹的3种CNMs(GO、CNT和GOQD)均会对斑马鱼氧化应激和线粒体膜电位造成影响。生物组织MDA含量和T-SOD活性是衡量生物组织氧化应激的重要指标^[29]。为研究低浓度长期暴露对斑马鱼抗氧化系统的影响,选取斑马鱼MDA含量和T-SOD活性来衡量0.01 mg·L⁻¹的3种CNMs对斑马鱼成鱼氧化应激的影响,其结果如图5(k)和图5(l)所示。与对照组相比,0.01 mg·L⁻¹的GO、CNT和GOQD处理组斑马鱼成鱼体内MDA含量均无显著差异($P > 0.05$)。但是0.01 mg·L⁻¹的GO、CNT和GOQD中暴露21 d后的斑马鱼成鱼体内T-SOD活性较对照组

有显著差异($P<0.05$)。具体而言,GO、CNT 和 GO-QD 处理组的 T-SOD 活性较空白对照组分别降低了 49.7%、39.3% 和 47.5%。但是 3 种材料处理组之间 T-SOD 活性无显著性差异($P>0.05$)。T-SOD 作为研究生物氧化应激的重要指标,其活性的降低也意味着生物氧化应激反应,这与本研究幼鱼的研究结果具有一致性,而其背后机理需要我们进一步研究。

2.4 3 种 CNMs 对斑马鱼成鱼代谢组的影响

近年来,代谢组学以其对生物毒性的高灵敏度响应已经成为研究生物毒性机理的有效工具,尤其在揭示纳米材料诱导的生物毒性机制领域独具优势^[13,17]。为探索斑马鱼成鱼在 3 种 CNMs 中亚急性暴露的分子机理,我们引入代谢组学对其进行分析。

GC-MS 测定经过衍生化的样品,测得代谢物中约有 230 个质谱峰出现,其中,64 种代谢物被鉴定出来,将空白对照组和 CNMs 暴露组中这 64 种代谢物的相对含量归一化后用热图表示,如图 6(a)所示。此外,对 64 种代谢物进行聚类分析和 PCA 分析,在 PCA 图中每点代表不同种类 CNMs 的代谢物组,点之间的距离与样品代谢物组成的相似程度成反比,即距离越远,其相似程度越低。如图 6(b)所示,对照组与 GO 组的距离最近,而与 GOQD 组的距离最远,CNT 组与对照组的距离介于 GO 和 GOQD 之间,说明 GOQD 组斑马鱼代谢物与对照组差异最大,而 GO 处理组对斑马鱼代谢物的影响最小,其结果与聚类分析的结果一致。

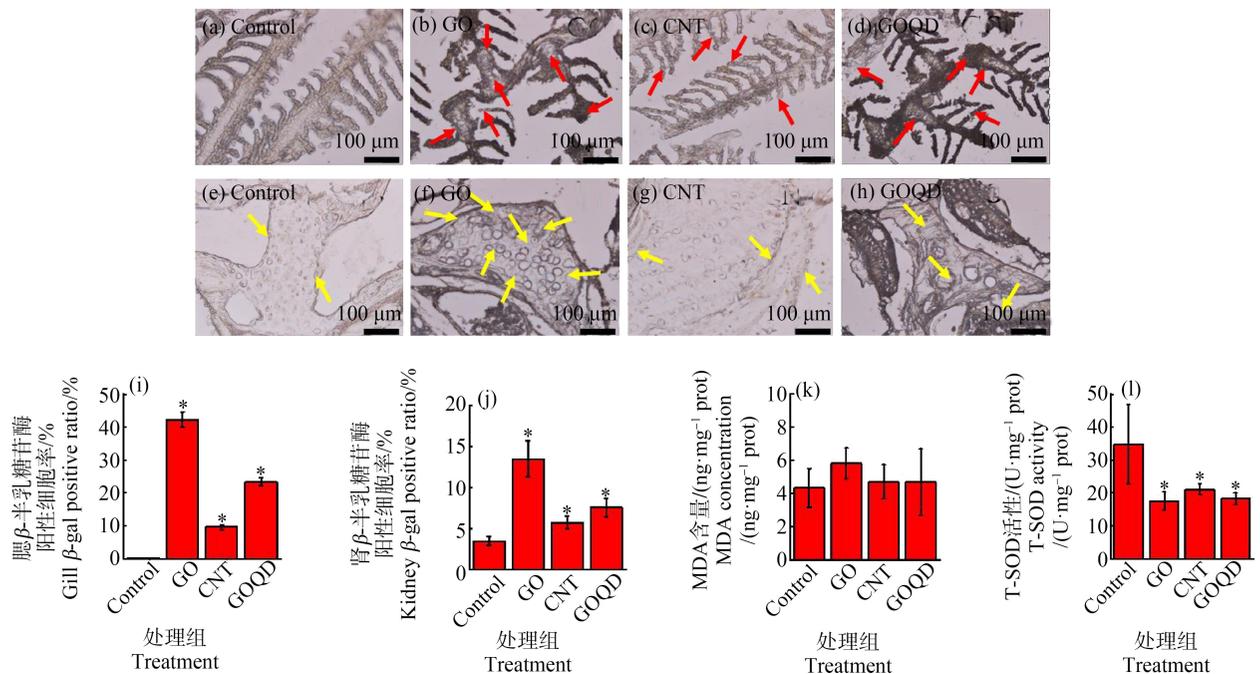


图 5 低浓度 3 种碳纳米材料对斑马鱼成鱼亚急性毒性影响

注:(a)、(b)、(c)和(d)分别为空白对照组、0.01 mg·L⁻¹ GO 暴露组、0.01 mg·L⁻¹ CNT 暴露组和 0.01 mg·L⁻¹ GOQD 暴露组中对斑马鱼腮 β-半乳糖苷酶活性影响代表性图片;(e)、(f)、(g)和(h)分别为空白对照组、0.01 mg·L⁻¹ GO 暴露组、0.01 mg·L⁻¹ CNT 暴露组和 0.01 mg·L⁻¹ GOQD 暴露组中对斑马鱼肾脏 β-半乳糖苷酶活性影响代表性图片;(i)~(j)分别为 3 种碳纳米材料对斑马鱼腮和肾脏细胞 β-半乳糖苷酶阳性率的统计;(k)~(l)分别为 3 种碳纳米材料对斑马鱼总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性和丙二醛(MDA)含量的影响;(b)~(d)中红色箭头以及(e)~(h)中黄色箭头所指区域分别为斑马鱼腮和肾脏中部分 β-半乳糖苷酶阳性点;黑色的*表示实验组与空白对照组有显著性差异 $P<0.05$ 。

Fig. 5 Subacute toxicity induced by three low concentration carbonaceous nanomaterials in adult zebrafish

Note: (a), (b), (c) and (d) are typical pictures of effects on β-galactosidase (β-gal) activity of adult zebrafish gill in control group, 0.01 mg·L⁻¹ GO exposure group, 0.01 mg·L⁻¹ CNT exposure group and 0.01 mg·L⁻¹ GOQD exposure group; (e), (f), (g) and (h) are typical pictures of β-gal activity of adult zebrafish kidney in control group, 0.01 mg·L⁻¹ GO exposure group, 0.01 mg·L⁻¹ CNT exposure group and 0.01 mg·L⁻¹ GOQD exposure group; (i)~(j) statistical analysis of positive cell ratio of β-gal activity in adult zebrafish gill and kidney after exposure to three carbonaceous nanomaterials; (k)~(l) influence induced by three carbonaceous nanomaterials on total superoxide dismutase (T-SOD) activity and malondialdehyde (MDA) concentration of adult zebrafish; red arrows in figure (b)~(d) and yellow arrows in figure (e)~(h) represent partial dots with positive β-gal activity in adult zebrafish gill and kidney; the black asterisks denote significant differences at $P<0.05$ level compared with the control groups.

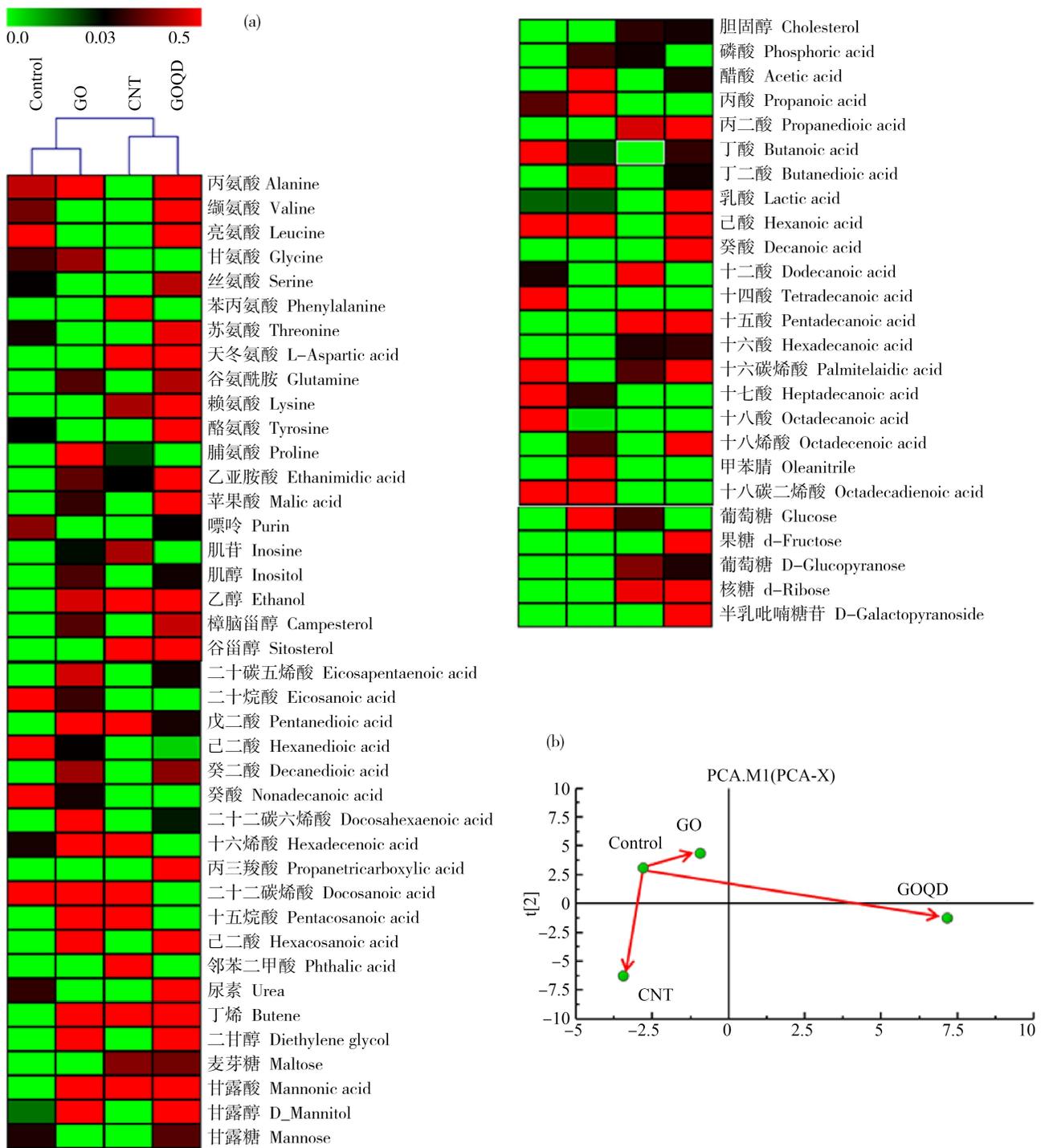


图 6 斑马鱼成鱼空白对照组和 3 种碳纳米材料 21 d 暴露组代谢分析

注:(a)为差异代谢物的热图;(b)为 PCA 聚类分析图。

Fig. 6 Metabolic analysis of the control and three carbonaceous nanomaterials-exposed adult zebrafish groups at 21 d

Note: (a) heat map of all the identified metabolites; (b) PCA cluster analysis.

为了在更深层次上研究 3 种 CNMs 对斑马鱼成鱼代谢物的具体影响,考察了 3 种 CNMs 对其有显著影响的代谢物。显著差异代谢物被定义为:当纳米材料处理组某代谢物的峰面积是对照组同一代谢

物峰面积的 1.5 倍以上或 0.67 倍以下时,该代谢物被称为显著差异代谢物(significantly changed metabolite, SCM)。本研究中 3 种纳米材料的 SCM 的数量与种类如表 2 所示。将 SCM 分为了以下几个主

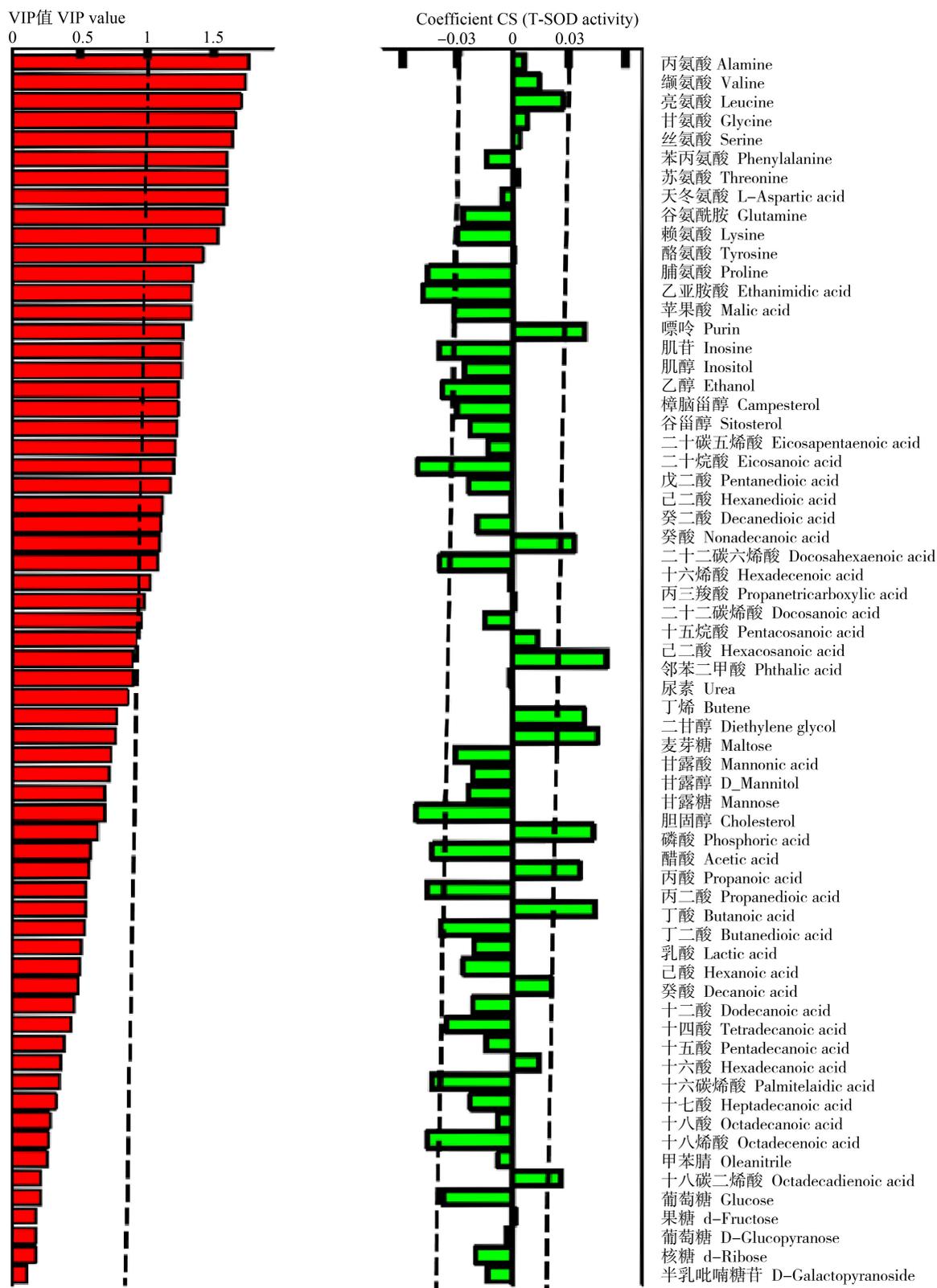


图 7 代谢物的正交偏最小二乘判别 (OPLS-DA) 分析

注:代谢物相关系数(Coefficient CS)和变量权重重要性排序(VIP)值分别为自变量, T-SOD 活性为因变量的 OPLS-DA 分析。

Fig. 7 The orthogonal partial least-squares discriminant analysis (OPLS-DA) of metabolites

Note: Coefficient CS and variable importance in projection (VIP) value with the metabolic levels as the independent variable and T-SOD activity as the dependent variable using OPLS-DA.

表2 3种纳米材料暴露组中斑马鱼成鱼体内显著差异代谢物类型统计

Table 2 Type analysis of significantly changed metabolites (SCMs) induced by three carbonaceous nanomaterials in adult zebrafish

	GO	CNT	GOQD
氨基酸 Amino acid	5	11	6
脂肪酸 Fatty acid	22	24	28
小分子酸 Small molecule acid	3	1	3
糖类及糖类衍生物 Sugars and sugar derivatives	4	6	7
其他小分子 Other small molecule metabolites	6	6	6
总计 Total	40	48	50

要类型:氨基酸、脂肪酸、糖类及糖类衍生物和其他小分子差异代谢物等。氨基酸的变化在处理组中是十分显著的,在3种CNMs处理组中的氨基酸SCM中,CNT引起的氨基酸变化数量最多,为11种,GO与GOQD相近,分别为5种和6种。在以上不同类型的差异物中,脂肪酸是3种CNMs引起的SCM中占比最大的代谢物种类,GO、CNT和GOQD处理组中脂肪酸在总SCM的比例分别为55%、50%和56%。说明脂肪酸代谢是受3种CNMs影响最为显著。

为进一步确认与斑马鱼成鱼氧化应激相关的代谢物的变化,利用OPLS-DA法进行斑马鱼代谢物与斑马鱼T-SOD活性相关性分析,Y变量是斑马鱼T-SOD活性,X变量是代谢物,分析结果如图7所示。64种代谢产物中有21种代谢物的Coefficients CS系数为正数,这表明细胞中这些代谢物对斑马鱼体内T-SOD的生成做出了积极贡献,而负相关代谢物有43种。此外,对代谢物进行了变量重要性投影,得到VIP>1的代谢物有24种。OPLS-DA分析表明,3种CNMs处理21d后,28种代谢物的变化与斑马鱼T-SOD活性变化相伴发生,说明代谢物的变化可能是3种CNMs引起斑马鱼T-SOD活性变化的分子机制。其中,与T-SOD活性正相关且VIP>1的代谢物有8种,其中7种为脂肪酸,包含

丁酸、二十烷酸和十四烷酸等,说明这些脂肪酸的变化与斑马鱼T-SOD活性的下降正相关;同时,与T-SOD活性负相关且VIP>1的代谢物有16种,其中包含一种氨基酸(脯氨酸)、7种脂肪酸、2种糖及糖类衍生物以及其他小分子化合物,这16种代谢物与斑马鱼T-SOD活性下降正相关。在与T-SOD活性负相关的代谢物中,脯氨酸作为精氨酸/脯氨酸代谢通路的重要一环,在处理组均显著上升。上述结果表明,代谢组学分析为了解3种CNMs对成年斑马鱼亚急性毒性效应的分子机制提供了新的思路和视角。

由以上研究内容可得出以下3点结论:

(1)3种CNMs在 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下会引起斑马鱼幼鱼线粒体损伤,损伤严重程度为 $\text{GOQD}>\text{CNT}>\text{GO}$;同时,GOQD和CNT在 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下会引起斑马鱼幼鱼氧化应激,且在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时GOQD对斑马鱼幼鱼的影响大于CNT。

(2)环境相关浓度下,3种CNMs亚急性暴露会引起斑马鱼成鱼腮和肾脏细胞衰老,同时抑制斑马鱼成鱼T-SOD活性,但是对斑马鱼成鱼MDA含量没有显著影响。

(3)代谢组学分析表明,3种CNMs对斑马鱼代谢组影响的顺序为 $\text{GOQD}>\text{CNT}>\text{GO}$;T-SOD活性与代谢组学关联分析表明,脂肪酸和脯氨酸的变化是引起斑马鱼T-SOD活性变化的分子机理之一。

综上所述,即使3种CNMs对斑马鱼在抗氧化酶等指标上的影响无显著差异,但是其影响代谢的机理却是不同的,其中,CNT主要通过诱导斑马鱼体内氨基酸代谢物的变化(如脯氨酸、赖氨酸和亮氨酸等)造成氧化损伤,而GO和GOQD主要影响的代谢物则为脂肪酸(如十八碳烯酸、棕榈酸和十九烷酸等)。

通过3种典型CNMs对斑马鱼幼鱼急性毒性的研究,对3种CNMs的毒性做出了排序,同时在环境相关浓度下测定了3种CNMs对斑马鱼成鱼的亚急性毒性,揭示了其对斑马鱼抗氧化酶系统影响的分子机理,为后续CNMs的毒性评估和生态风险评价提供了重要的数据资料。

通讯作者简介:周启星(1963—),男,博士,教授,博士生导师,主要研究方向为污染生态学、生态地学、环境基准和污染环

境修复等。

参考文献 (References):

- [1] Lee J, Mahendra S, Alvarez P J J. Nanomaterials in the construction industry: A review of their applications and environmental health and safety considerations [J]. ACS Nano, 2010, 4(7): 3580-3590
- [2] Lightcap I V, Kosel T H, Kamat P V. Anchoring semiconductor and metal nanoparticles on a two-dimensional catalyst mat. Storing and shuttling electrons with reduced graphene oxide [J]. Nano Letters, 2010, 10(2): 577-583
- [3] Yang K J, Chen B L, Zhu X Y, et al. Aggregation, adsorption, and morphological transformation of graphene oxide in aqueous solutions containing different metal cations [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(20): 11066-11075
- [4] Zhu J X, Zhu T, Zhou X Z, et al. Facile synthesis of metal oxide/reduced graphene oxide hybrids with high lithium storage capacity and stable cyclability [J]. Nanoscale, 2011, 3(3): 1084-1089
- [5] Choi W, Lahiri I, Seelaboyina R, et al. Synthesis of graphene and its applications: A review [J]. Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, 2010, 35(1): 52-71
- [6] Lee Y A, Durandin A, Dedon P C, et al. Oxidation of guanine in G, GG, and GGG sequence contexts by aromatic pyrenyl radical cations and carbonate radical anions: Relationship between kinetics and distribution of alkali-labile lesions [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2008, 112(6): 1834-1844
- [7] Goodwin D G, 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
- [8] Jia P P, Sun T, Junaid M, et al. Nanotoxicity of different sizes of graphene (G) and graphene oxide (GO) *in vitro* and *in vivo* [J]. Environmental Pollution, 2019, 247: 595-606
- [9] Souza J P, Baretta J F, Santos F, et al. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2017, 186: 11-18
- [10] Hu X, Ouyang S H, Mu L, et al. Effects of graphene oxide and oxidized carbon nanotubes on the cellular division, microstructure, uptake, oxidative stress, and metabolic profiles [J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(18): 10825-10833
- [11] Akhavan O, Ghaderi E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria [J]. ACS Nano, 2010, 4(10): 5731-5736
- [12] Ouyang S H, Li K W, Zhou Q X, et al. Widely distributed nanocolloids in water regulate the fate and risk of graphene oxide [J]. Water Research, 2019, 165: 114987
- [13] 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
- [14] Garcia G R, Noyes P D, Tanguay R L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2016, 161: 11-21
- [15] Song Y Y, Li R J, Zhang Y H, et al. Mass spectrometry-based metabolomics reveals the mechanism of ambient fine particulate matter and its components on energy metabolic reprogramming in BEAS-2B cells [J]. Science of the Total Environment, 2019, 651: 3139-3150
- [16] Xu Y Y, Wang W J, Zhou J, et al. Metabolomics analysis of a mouse model for chronic exposure to ambient PM_{2.5} [J]. Environmental Pollution, 2019, 247: 953-963
- [17] 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
- [18] Wang C, Yang X, Zheng Q, et al. Halobenzoquinone-induced developmental toxicity, oxidative stress, and apoptosis in zebrafish embryos [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(18): 10590-10598
- [19] Chen Y M, Hu X G, Sun J, et al. Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis [J]. Nanotoxicology, 2016, 10(1): 42-52
- [20] Huang Z Y, Xu B, Huang X M, et al. Metabolomics reveals the role of acetyl-L-carnitine metabolism in gamma-Fe₂O₃ NP-induced embryonic development toxicity via mitochondria damage [J]. Nanotoxicology, 2019, 13(2): 204-220
- [21] Zhao X S, Wang S T, Wu Y, et al. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 136: 49-59
- [22] 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

- [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] Chowdhury I, Duch M C, Mansukhani N D, et al. Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(12): 6288-6296
- [25] 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
- [26] Geiger B, Nguyen H M, Wenig S, et al. From by-product to valuable components: Efficient enzymatic conversion of lactose in whey using beta-galactosidase from *Streptococcus thermophilus* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2016, 116: 45-53
- [27] Wang J, Li Y J, Lu L, et al. Polystyrene microplastics cause tissue damages, sex-specific reproductive disruption and transgenerational effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*) [J]. *Environmental Pollution*, 2019, 254: 10
- [28] He B, Ebarasi L, Hultenby K, et al. Podocin-green fluorescence protein allows visualization and functional analysis of podocytes [J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2011, 22(6): 1019-1023
- [29] Kim S, Ryu D Y. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 2013, 33 (2): 78-89 ◆