

几种纳米材料对斑马鱼孵化和致畸效应的影响

尤 宏, 吕丽娜, 赵雪松, 王树涛

(哈尔滨工业大学 城市水资源与水环境国家重点实验室, 150090 哈尔滨)

摘要: 为评价纳米材料的生态毒性, 选用斑马鱼胚胎作为受试生物, 考察 ZnO、TiO₂ 和碳纳米管 3 种纳米材料对斑马鱼胚胎孵化及致畸效应的影响. 配置一系列不同质量浓度的纳米材料溶液, 对受精 1 h 的斑马鱼胚胎进行暴露, 记录 36~96 h 内胚胎的孵化率及累计孵化率. 结果表明: 纳米 ZnO 对胚胎孵化率有抑制作用, 在 50 及 100 mg/L 的暴露组, 孵化率显著低于对照组, 虽然 Zn²⁺ 有溶出, 但对孵化率没有显著影响, 同时, 纳米 ZnO 暴露导致胚胎畸形, 表现为心包水肿; 碳纳米管对胚胎孵化率没有显著抑制, 但能够使斑马鱼胚胎孵化延迟, 且与暴露浓度存在浓度剂量效应关系; 在本实验浓度范围内, 急性暴露纳米 TiO₂ 对胚胎孵化率与畸形率没有显著影响.

关键词: 纳米材料; 斑马鱼胚胎; 毒性; 孵化率; 畸形率

中图分类号: X503.2

文献标志码: A

文章编号: 0367-6234(2013)12-0048-05

Effects of nanomaterials on the hatching and malformation rate of zebrafish embryos

YOU Hong, LÜ Lina, ZHAO Xuesong, WANG Shutao

(State Key Laboratory of Urban Water Resource and Environment, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China)

Abstract: To evaluate the ecotoxicity of nanomaterials, zebrafish embryos were selected as biological subjects, the toxicity of nano-ZnO, nano-TiO₂ and carbon nanotubes on zebrafish embryos hatching rate and teratogenic rate were assessed. Zebrafish embryos of 1 h post fertilization were exposed to a series of different concentrations of nanomaterial solutions, and hatching rate and cumulative hatchability at 36–96 h were recorded. The results showed although Zn²⁺ has dissolved, But little effect on hatchability, nano-ZnO was more significant inhibition on embryo hatching, in 50 and 100 mg/L nano-ZnO exposure group. Nano-ZnO also causing pericardial edema. Carbon nanotubes did not affect hatching rate but might cause hatching delay, and exert concentration-dose relationship. In the range of this experimental concentrations, acute exposure nano-TiO₂ has no significant influence on hatching rate and malformation rate.

Key words: nanometer materials; zebrafish embryos; toxicity; hatchability; malformation rate

纳米材料因其纳米尺度和纳米结构而具有优越的磁性、导电性、反应活性、光学性质而广泛应用于各种商业产品如电子器件、体育器材、防晒霜及医学领域中^[1]. 纳米材料在生产及使用过程中能通过各种途径进入环境. 研究表明, 涂料中的纳米 TiO₂ 经雨水冲刷可进入水体^[2], 同时纳米颗

粒可在废电池回收过程中被释放^[3]. 纳米材料在环境中经水、土壤、大气间的相互转化后最终可能在水生生物体内蓄积, 通过饮食、呼吸、皮肤接触, 危害人类及生物的健康. 纳米颗粒可引起生物的发育毒性^[4-5]、氧化应激^[6]、生殖毒性^[7]与呼吸毒性^[8]. 纳米 ZnO 能破坏抗氧化防御系统, 诱导产生大量的活性氧, 引起机体氧化应激损伤^[9]. 碳纳米管水溶液可对彩虹鲟鱼呼吸系统产生毒性, 加快呼吸速率, 1~2 周持续暴露后引起心血管系统缺陷, 最终导致死亡^[8]. 目前对发育毒性的研究相对有限, Bai 等^[10] 研究表明纳米 ZnO 在暴露质量

收稿日期: 2013-02-05.

基金项目: 城市水资源与水环境国家重点实验室自主课题 (2013DX09).

作者简介: 尤 宏(1961—), 男, 教授, 博士生导师.

通信作者: 尤 宏, youhong@hit.edu.cn.

浓度为 1~25 mg/L 时,可延迟胚胎孵化,减少幼鱼体长,暴露 96 h 后引起尾部畸形。

斑马鱼作为模式生物具有生物个体小、易存活、胚胎透明、对水质污染与毒性物质反应灵敏等优点^[11]。鉴于孵化率及畸形率是生长发育的重要指标,同时,纳米材料对这两个重要指标的考察目前没有得到系统性结论,且毒性作用机制尚不明确,选用斑马鱼胚胎为受试生物,研究环境中广泛存在的典型纳米材料——纳米 ZnO、纳米 TiO₂ 以及碳纳米管急性暴露对斑马鱼胚胎孵化率和畸形率的影响,为评判纳米材料对水生生物的毒性效应提供基础数据,并为系统地评价典型纳米材料对环境生物及人体的生态风险提供理论依据。

1 实验

1.1 实验材料

纳米 ZnO(粒径<100 nm)、纳米 TiO₂(粒径 20~40 nm)均购自 Sigma 公司,碳纳米管分散液(粒径 20~40 nm)购自深圳市纳米港有限公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。

斑马鱼购自武汉水生所,选当年生成成年斑马鱼,平均体长 3~4 cm,平均体质量 0.30 g。在本实验室(28±1)℃条件下,于循环养殖系统中驯养 20 d 以上,选择体形正常、鱼鳞和鳍无破损、游动灵活、捕食敏捷的成熟亲鱼进行交配,以便收集鱼卵。

1.2 实验方法

每种纳米材料均设 5 个不同质量浓度,同时设空白对照,每个质量浓度均设 3 个平行。纳米 ZnO 用营养液(64.75 mg/L NaHCO₃, 5.75 mg/L KCl, 123.25 mg/L MgSO₄·7H₂O 和 294 mg/L CaCl₂·2H₂O)配置成质量浓度为 1, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L 染毒溶液,碳纳米管和纳米 TiO₂ 也分别用营养液稀释成 10, 20, 40, 60, 100 mg/L 暴露质量浓度。

为了考察 Zn²⁺ 溶出的影响,根据测定的不同质量浓度下纳米 ZnO 中融出的 Zn²⁺ 质量浓度,配置孵化液,进行了 Zn²⁺ 的对照实验。

在体式解剖镜下挑选发育正常的受精卵进行实验,选用直径为 12 cm 的结晶皿作为实验器具,每个结晶皿中放 200 mL 的纳米材料暴露液,100 颗发育正常的受精卵,在受精卵产出后 2.5~3.0 h (囊胚期初期)进行暴露实验,将结晶皿放在 28℃ 的恒温水浴锅中培养。暴露实验每 24 h 更换 1 次染毒溶液,以保证实验水中溶解氧和实验前

后溶液质量浓度相对稳定。统计并记录暴露后 36、48、60、72、96 h 等时段斑马鱼胚胎孵化情况,未孵化的鱼卵用虹吸管吸出。因纳米材料极易团聚,每次更换溶液前对纳米材料超声 30 min。

1.3 分析与表征

采用扫描电子显微镜 SEM(MX2600FE,英国 Camscan 公司)和透射电子显微镜 TEM(JEM-2100,日本电子公司)对纳米材料进行表征。

采用电感耦合等离子体质谱仪 ICP-MS(X7,美国 Thermo 公司)测定 ZnO 溶出的 Zn²⁺ 质量浓度。将配置好的纳米 ZnO 染毒溶液静止 24 h,100 000 转离心 30 min 后取上清液,用 ICP-MS 测定得出 1, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L 纳米 ZnO 溶出的 Zn²⁺ 质量浓度分别为 0.59, 2.25, 1.51, 3.96, 3.1 和 2.37 mg/L。

1.4 数据处理

实验结果表示为平均值±标准误差,每个质量浓度重复做 3 次。采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,用卡方检验和 t-检验判断实验组与对照组是否存在差异统计学意义, P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果和讨论

2.1 纳米材料的表征

采用 SEM 表征纳米材料的表观形貌,结果如图 1 所示。可以看出:纳米 ZnO 呈多边形、不规则形状;纳米 TiO₂ 呈长条立体状;碳纳米管呈明亮条状,且相互交织。TEM 表征得出材料粒径均在纳米尺度范围内,与厂商提供粒径基本一致。

2.2 纳米 ZnO 和 Zn²⁺ 对斑马鱼胚胎孵化率影响

纳米 ZnO 和 Zn²⁺ 对斑马鱼胚胎 96 h 孵化率的影响如图 2 所示。1, 5, 10, 20, 50, 100 mg/L 纳米 ZnO 暴露组对应的孵化率分别为 88%, 75%, 56%, 53%, 46%, 25%, 随着暴露质量浓度的增加,孵化率下降显著,且与暴露质量浓度呈现一定的剂量效应关系。为考察纳米 ZnO 溶出的 Zn²⁺ 对孵化率是否有影响,根据 1.3 ICP-MS 测定的结果,设置系列 Zn²⁺ 溶液的暴露组(0.59, 2.25, 1.51, 3.96, 3.1, 2.37 mg/L),得出 Zn²⁺ 暴露对应的孵化率分别为 92%, 89%, 82%, 79%, 73%, 75%。表明斑马鱼胚胎的孵化率虽然随着 Zn²⁺ 暴露质量浓度的增加而有所下降,但较对照组变化不显著,且同等暴露质量浓度下,纳米 ZnO 暴露组孵化率明显低于 Zn²⁺ 暴露组孵化率。由此可推断,纳米 ZnO 对胚胎孵化率有抑制作用,虽然 Zn²⁺ 有溶出,但对孵化率没有显著影响。

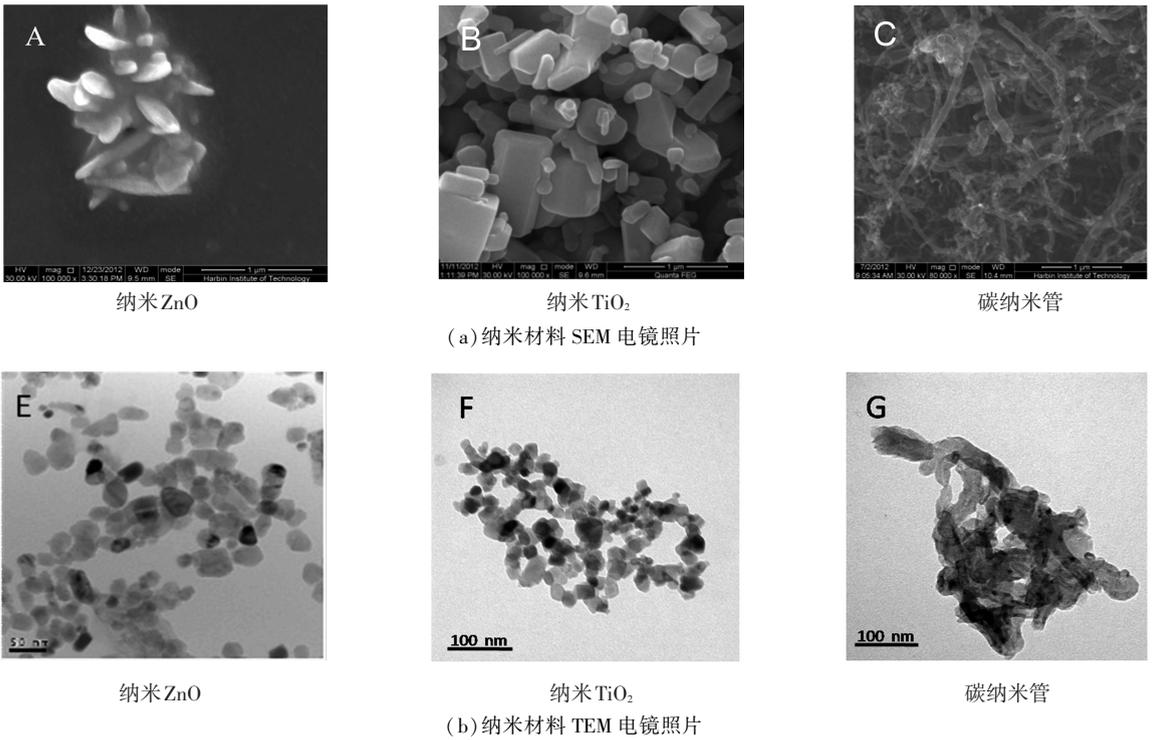


图 1 纳米材料的电镜表征图

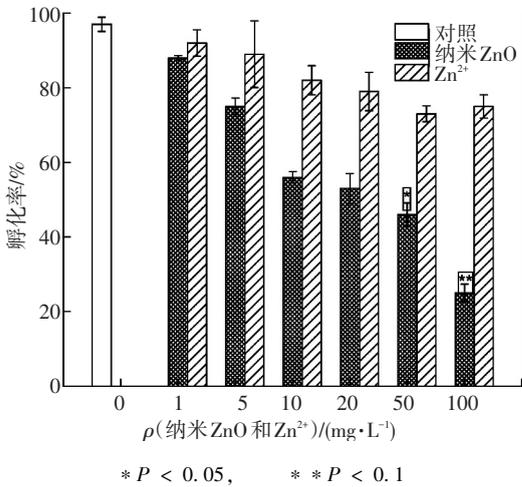


图 2 纳米 ZnO 和 Zn²⁺对斑马鱼胚胎 96 h 孵化率的影响

图 3、4 阐明了斑马鱼胚胎在 36~96 h 的累积孵化率。由图 3 可见,斑马鱼胚胎 48 h 开始孵化, 96 h 全部孵出, 在 52~72 h (10~100 mg/L) 暴露组, 斑马鱼胚胎孵化速度显著变慢, 有孵化延迟的现象。由图 4 可见, 暴露质量浓度增加后, Zn²⁺ 暴露组胚胎孵化率同样有下降趋势。图 3、4 表明, 在相同暴露质量浓度下, 纳米 ZnO 的累积孵化率显著低于 Zn²⁺, 更直接地证明了 Zn²⁺ 虽与纳米 ZnO 的孵化抑制效应有关, 但是不起主要作用。纳米 ZnO 导致斑马鱼胚胎孵化抑制可能是胚胎暴露在纳米 ZnO 中后, 纳米级的 ZnO 会进入胚胎的绒毛囊, 从而将绒毛囊堵塞, 导致胚胎不能正常分泌孵化酶和诱发组织缺氧所致。

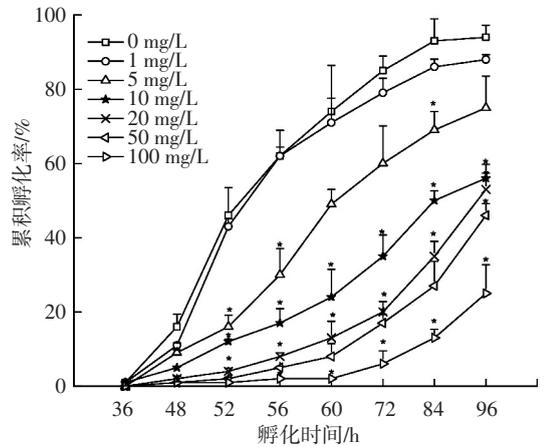


图 3 纳米 ZnO 对斑马鱼胚胎累积孵化率的影响

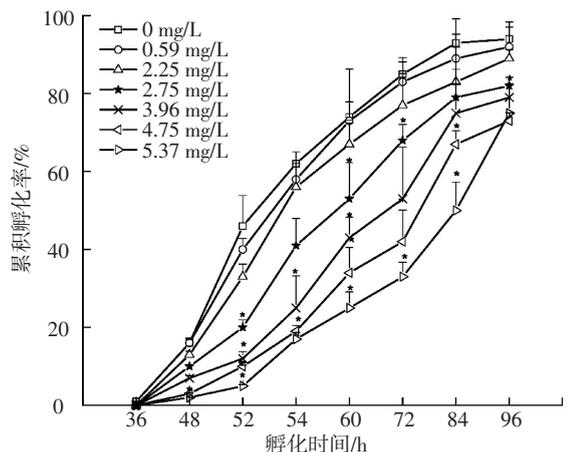
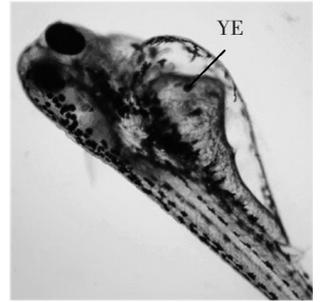
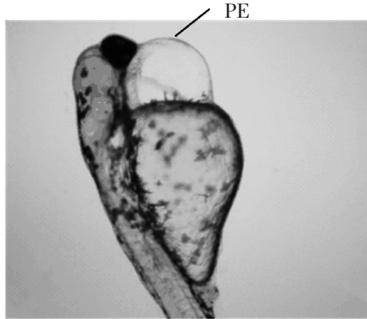
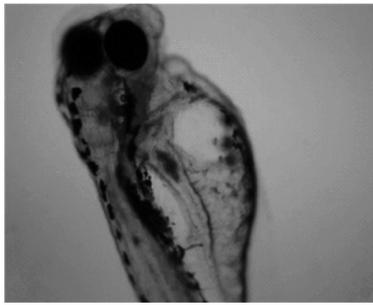


图 4 Zn²⁺对斑马鱼胚胎累积孵化率的影响

纳米 ZnO 暴露组的斑马鱼胚胎出现心包水肿及卵黄囊水肿的畸形现象 (图 5), 水肿是斑马

鱼胚胎心血管系统缺陷所致。由图 6 可以看出, 随着暴露质量浓度的增加, 水肿出现的几率增大, 呈现一定的剂量依赖性。50 及 100 mg/L 纳米 ZnO



PE 为心包水肿; YE 为卵黄囊水肿

图 5 斑马鱼胚胎水肿图片

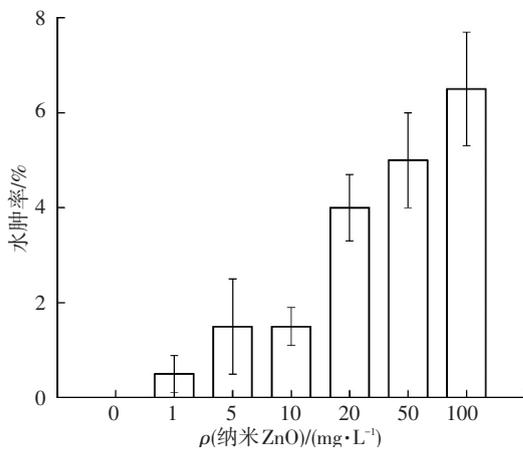


图 6 纳米 ZnO 对斑马鱼胚胎水肿率的影响

2.3 碳纳米管对斑马鱼孵化率的影响

碳纳米管对斑马鱼孵化的存活率影响很小。如图 7 所示, 斑马鱼胚胎暴露于不同质量浓度碳纳米管溶液中 96 h 后基本全部孵出, 未发现死亡或畸形等现象。由斑马鱼胚胎的累积孵化率 (图 8) 可以看出, 在 40, 60, 100 mg/L 等高质量浓度暴露组, 斑马鱼孵化率与对照组相比显著延迟, 且随着暴露质量浓度的增加, 孵化延迟效应显著加强, 存在剂量依赖效应, 孵化延迟现象基本出现在 52~76 h。

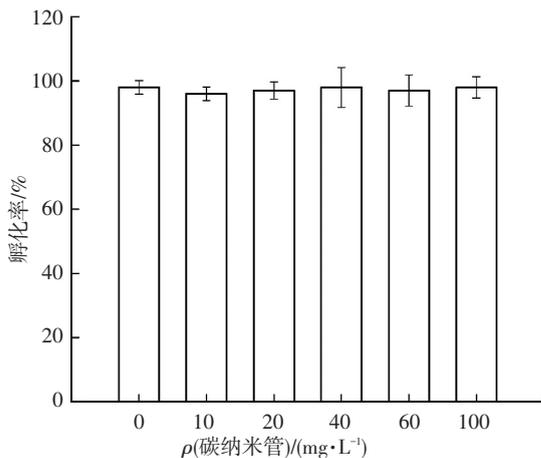


图 7 碳纳米管对斑马鱼胚胎 96 h 孵化率的影响

暴露, 斑马鱼幼鱼水肿率为 5% 及 6.5%, 且 7% 左右的水肿胚胎 4~7 d 后死亡, 表明心血管系统也是纳米 ZnO 毒物作用的主要靶器官。

实验结果显示, 导致斑马鱼胚胎延迟孵化的主要原因是碳纳米管成团聚集并吸附在卵膜外层, 改变卵壳弹性并妨碍氧向胚胎组织内传输, 使组织处于缺氧状态, 最终导致胚胎孵化延迟。目前对于碳纳米材料延迟胚胎孵化的机理还不清楚, 有待进一步研究。

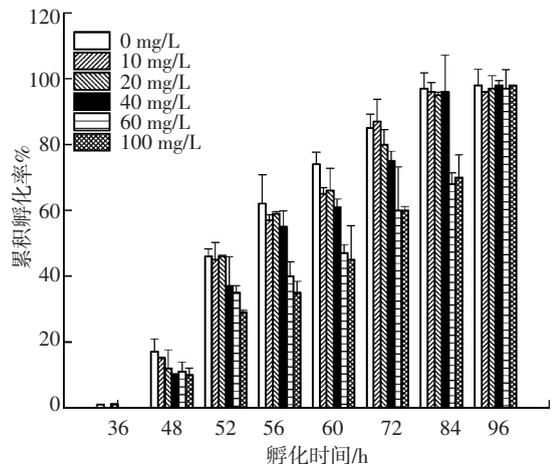


图 8 36~96 h 内碳纳米管对斑马鱼胚胎累积孵化率影响

2.4 纳米 TiO₂ 对斑马鱼孵化率的影响

如图 9 所示, 暴露组斑马鱼胚胎 96 h 孵化率与对照组差异无统计学意义, 表明急性暴露纳米 TiO₂ 不影响斑马鱼的孵化率。图 10 表明, 大部分胚胎在 48~60 h 孵化, 不同暴露组间差异无统计学意义。每组孵化胚胎在纳米 TiO₂ 暴露过程中存活率为 100%, 并且没有畸形现象出现, 表明在本实验质量浓度下的纳米 TiO₂ 急性暴露对斑马鱼胚胎的存活率与畸形率没有显著影响。其他研究也得到类似的结论^[4, 12-13]。

有研究表明鳃是纳米 TiO₂ 对鱼类作用的靶器官。本实验中纳米 TiO₂ 未能影响斑马鱼胚胎孵化可能是由于卵壳的保护作用。因此, 低质量浓度暴露纳米 TiO₂ 从胚胎至发育成熟, 对全生命周期的斑马鱼发育毒性以及组织特异性有待进一步研究。

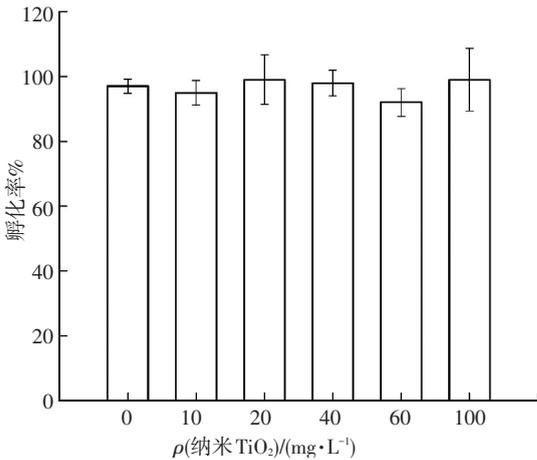


图9 纳米 TiO₂ 对斑马鱼胚胎 96 h 孵化率的影响

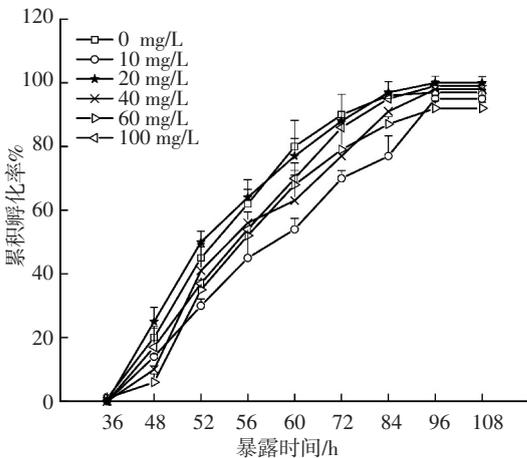


图10 36~96 h 纳米 TiO₂ 对斑马鱼胚胎累积孵化率的影响

3 结论

1) 不同纳米材料对斑马鱼的发育毒性不同, 纳米 ZnO 主要影响斑马鱼胚胎孵化率, 虽然 Zn²⁺ 有溶出, 但对孵化率没有显著影响。纳米 ZnO 还可引起斑马鱼胚胎水肿, 且水肿率与暴露质量浓度存在浓度剂量效应关系。

2) 碳纳米管溶液和纳米 TiO₂ 不影响斑马鱼胚胎 96 h 孵化率和存活率, 但碳纳米管可使斑马鱼胚胎短期的孵化延迟。在同等实验条件下, 暴露质量浓度越高, 孵化延迟现象越显著。纳米 TiO₂ 和碳纳米管在暴露时间内对斑马鱼胚胎没有致畸效应。

参考文献

[1] MAHMOUDI M, AZADMANESH K, SHOKRGOZAR M A, *et al.* Effect of nanoparticles on the cell life cycle[J]. *Chemical Reviews*, 2011, 111(5): 3407-3432.

[2] KAEGI R, ULRICH A, SINNET B, *et al.* Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment [J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156(2): 233-239.

[3] OLAPIRIYAKUL S, CAUDILL R J. Thermodynamic analysis to assess the environmental impact of end-of-life recovery processing for nanotechnology products [J]. *Environmental Science and Technology*, 2009, 43(21): 8140-8146.

[4] CHEN Jinyuan, DONG Xia, XIN Yuanyuan, *et al.* Effects of titanium dioxide nano-particles on growth and some histological parameters of zebrafish (*Danio rerio*) after a long-term exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2011, 101(3/4): 493-499.

[5] 薛猛, 朱融融, 孙晓宇, 等. 纳米二氧化钛的发育毒性研究[J]. *材料导报*, 2009, 23(4): 103-105.

[6] HAO Linhua, CHEN Lei. Oxidative stress responses in different organs of carp (*Cyprinus carpio*) with exposure to ZnO nanoparticles [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 80: 103-110.

[7] WANG Jiangxin, ZHU Xiaoshan, ZHANG Xuezhi, *et al.* Disruption of zebrafish (*Danio rerio*) reproduction upon chronic exposure to TiO₂ nanoparticles [J]. *Chemosphere*, 2011, 83(4): 461-467.

[8] SMITH C J, SHAW B J, HANDY R D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects[J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 82(2): 94-109.

[9] ZHU Xiaoshan, WANG Jiangxin, ZHANG Xuezhi, *et al.* The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Nanotechnology*, 2009, 20(19).

[10] BAI Wei, ZHANG Zhiyong, TIAN Wenjing, *et al.* Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2010, 12(5): 1645-1654.

[11] 陈亨宇, 付爱玲, 赵宝全. 应用斑马鱼模型评价纳米粒子毒性机制的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(2): 251-254.

[12] ZHU Xiaoshan, ZHU Lin, DUAN Zhenghua, *et al.* Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2008, 43(3): 278-284.

[13] HAO Linhua, WANG Zhenyu, XING Baoshan, *et al.* Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Journal of Environmental Sciences-China*, 2009, 21(10): 1459-1466.