

钟健,朱佳瑞,何欣宇,等. 斑马鱼模型在纳米毒理学中的应用与进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(8): 107-113,118.

Zhong J, Zhu JR, He XY, et al. Application of zebrafish models for nanotoxicology [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(8): 107-113,118.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.08.017

斑马鱼模型在纳米毒理学中的应用与进展

钟 健,朱佳瑞,何欣宇,马婧怡,李睿祺,张金波*

(佳木斯大学医学部基础医学院,黑龙江 佳木斯 154007)

【摘要】 斑马鱼(*Danio rerio*)具有体型小、易于饲养、繁殖率高、繁殖周期短、体外受精、胚胎透明易于观察等诸多优势,是纳米毒理学研究当中较为理想的模式生物。本文综述了纳米材料对斑马鱼的毒性作用,包括:消化系统毒性、生殖系统毒性、神经系统毒性和胚胎毒性;其毒性机制包括:氧化应激、细胞凋亡、影响基因表达、影响细胞周期,并分析了纳米材料对斑马鱼毒性的主要影响因素,包括:化学组成、浓度或剂量、粒径、形状、给药方式以及材料制备方法。为进一步进行纳米毒理学研究以及斑马鱼模型在纳米毒理学中的应用提供了参考依据。

【关键词】 纳米材料;斑马鱼;纳米毒理学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 08-0107-07

Application of zebrafish models for nanotoxicology

ZHONG Jian, ZHU Jiarui, HE Xinyu, MA Jingyi, LI Ruiqi, ZHANG Jinbo*

(Basic Medical College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

【Abstract】 *Danio rerio* has many advantages as a model animal for nanotoxicology research, such as small size, easy propagation, high reproduction rate, short reproduction cycle, amenable to *in vitro* fertilization, transparent embryo and easy observation. We review the toxic effects of nanomaterials on *Danio rerio*, including digestive toxicity, reproductive toxicity, neurological toxicity and embryonic toxicity. The mechanisms of toxicity include oxidative stress, apoptosis, and perturbed gene expression and cell cycle. The main factors influencing the toxicity of nanomaterials are analyzed, including chemical composition, concentration or dose, particle size, shape, drug administration and material preparation method. This review provides a reference for the use of zebrafish as a model for nanotoxicology research.

【Keywords】 nanomaterials; zebrafish; nanotoxicology

由于纳米材料具有优良的理化性质,越来越广泛的被应用到催化、材料、军事、机械、电子、生物医药等领域。纳米材料在生物医药领域表现出了独特的优势,在构建药物载体、药物的控释缓释等方面拥有巨大的应用前景。随着纳米材料日益广泛的应用,人们接触到纳米材料的机会越来越多,对

纳米材料的生物安全性研究也越来越迫切。目前,已有不少纳米材料的毒理学研究^[1-3],但许多纳米材料的毒性效应或体内毒性机制仍不明确,纳米材料的生物安全性需更进一步的研究和探讨。

目前,已有诸多研究表明斑马鱼是纳米毒理学较为理想的模式生物。斑马鱼作为一种脊椎动物,

【基金项目】 黑龙江省卫生计生委立项科研课题(2014-265);2018年黑龙江省大学生创新训练计划项目(201810222068);黑龙江省卫生计生委立项科研课题(2019-309)。

【作者简介】 钟健(1998—),男,本科生,研究方向:纳米毒理学。E-mail:1219138717@qq.com

【通信作者】 张金波(1974—),女,硕士,副教授,研究方向:纳米毒理学。E-mail:jinbojin1234@163.com

与人类基因的相似度高达 87%^[4],其生理或药理反应与人类具有很高的相似性,所以其在毒理学的研究当中具有很强的说服力。相比大鼠、小鼠,斑马鱼具有体外受精、胚胎在体外发育且透明易于观察的优势,另外,其体型小易于饲养,繁殖率高(成熟雌鱼每次可产卵 100~300 枚)为统计学计算提供了充足的样本数量;发育速度快且不同的发育阶段特征明显,可在胚胎发育的不同阶段做不同的毒理学实验且试验周期短。所以斑马鱼是一种理想的毒理学模式生物,且已经在胚胎发育毒理学和环境毒理学中得到了广泛应用^[5-6]。如今斑马鱼模型也愈来愈多的被应用到纳米毒理学的研究当中。

1 纳米材料对斑马鱼的毒性作用

由于斑马鱼的基因与人类基因相似度极高,将斑马鱼作为模式生物进行纳米毒理学研究具有很高的准确性和可信度。在实验中,纳米材料对斑马鱼所造成的各方面毒性作用也更贴近人类,实验结果对临床实践具有一定的指导意义。研究表明,纳米材料可对斑马鱼造成的毒性作用包括消化系统毒性、生殖系统毒性、神经系统毒性、胚胎毒性等。

1.1 消化系统毒性

研究表明,引起消化系统的毒性损伤是纳米材料最普遍的毒性效应之一,纳米材料进入斑马鱼体内后,富集于肝和肠道最为多见,因此对肝和肠道的损伤也更为显著。

1.1.1 肠道损伤

Løvmo 等^[7]研究表明,纳米颗粒作用于成年斑马鱼,经口腔摄入并进入肠道,经切片定位成像显示,纳米颗粒在肠道内被迅速吸收,使肠道内出现炎症反应,并转移到肝和脾。Sung 等^[8]分别将 30 nm 和 80 nm 的纳米金和银(nano-Au/nano-Ag)作用于成年斑马鱼,显示大部分纳米粒子均在肝、肠、鳃组织中被摄取,其中大粒径(80 nm)纳米粒子在肝和肠道组织中积累分布,小粒径(30 nm)纳米粒子在鳃中被过滤而聚集。而 Osborne 等^[9]关于纳米粒子粒径和分布关系的研究发现与 Sung 正好相反,Osborne 等^[9]将成年斑马鱼分别暴露于两种不同粒径(20 nm、110 nm)柠檬酸钠包被的 nano-Ag,研究显示,在 20 nm 粒径组的斑马鱼肠道中基底外侧膜可观察到明显的纳米粒子沉积,在 110 nm 粒径组则未观察到明显沉积。Osborne 等^[9]认为 nano-Ag 在肠道基底外侧膜沉积的机制与肠道基底外侧膜上

的 Na^+/K^+ 离子通道的破坏和 ATP 酶活性降低有关。说明粒径大小和在器官分布的关系并非绝对,其分布的影响还与其他因素相关。Chen 等^[10]将浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的纳米氧化钛(nano- TiO_2)作用于成年斑马鱼,研究显示,nano- TiO_2 可影响肠道神经调节、增加肠上皮屏障渗透性、引起炎症和氧化应激等。另外 nano- TiO_2 的长期暴露会引起斑马鱼肠道内菌群失调,造成损伤。Kang 等^[11]将浓度为(0.156、0.313、0.625、1.25、2.5 mg/mL)的碳量子点(C-QDs)溶液通过浸泡法作用于斑马鱼胚胎,实验表明,C-QDs 主要聚集在斑马鱼胚胎的头部、肠道和尾巴,其中肠道的聚集最为显著。经染毒的斑马鱼胚胎在纯水中静置 24 h 后,低浓度组(0.156、0.313、0.625 mg/mL)的 C-QDs 已完全清除出体外,仅在高浓度组(1.25、2.5 mg/mL)中有少量残留并伴有肠道轻微损伤,48 h 后,所有实验组斑马鱼胚胎肠道内的 C-QDs 均已消除。说明在肠道内富集的 C-QDs 可完全经代谢清除,但高浓度处理时仍会对肠道造成轻微损伤。虽然目前关于纳米粒子在肠道内分布情况和影响其分布或毒性损伤的机制尚不明确,但已有充分证据说明肠道是纳米粒子的毒性靶器官之一。

1.1.2 肝损伤

肝是机体内重要的解毒器官,也是纳米粒子最易发生富集的部位之一。在众多研究中,纳米粒子在肝当中聚集可破坏肝结构、影响肝功能。Ren 等^[12]将 0.9 mg/L 的 nano- TiO_2 连续 21 d 作用于成年斑马鱼,发现 nano- TiO_2 在斑马鱼体内呈富集状态,主要集中分布于大脑、性腺和肝,其中肝的含量最高,其次是大脑和性腺。段延芳^[13]将 6 种浓度(0、25、50、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的三种上转换纳米材料(铒离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)、铥离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$)、铒离子与镱离子相掺的四氟钆钠($\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)作用于受精后 24 h (hours post-fertilization, hpf)的斑马鱼胚胎,结果显示,以上三种纳米材料均易富集在心脏和肝,其中对于肝的毒性损伤最为显著,可引起肝发育畸形;引起肝细胞水肿、坏死。染毒浓度越大,引起的肝损伤越严重。Souza 等^[14]将成年斑马鱼分别暴露于三种浓度(2、10、20 mg/L)的氧化石墨烯(GO)中,研究显示,GO 可使肝细胞出现核碎裂、核固缩、形成液泡、细胞破裂和坏死,作用浓度越高,肝细胞损伤越显著。

Gao 等^[15]发现暴露于纳米二氧化锰(nano-MnO_2)的成年斑马鱼肝细胞出现转录功能障碍, α 淀粉酶、羧酸酯水解酶、羧肽酶等代谢酶类合成受到抑制,使肝功能受损。刘林等^[16]将成年斑马鱼暴露于不同浓度(0、0.05、0.1、5、10、25、50 mg/L)的纳米氧化锌(nano-ZnO)中分别处理 4 h、24 h、96 h,结果显示肝细胞出现水肿、气球样变,核固缩;肝巨噬细胞数量显著增加;丙二醛(MDA)含量增加,超氧化物歧化酶(SOD)活性增强,但过氧化氢酶(CAT)活性下降;基因 *Bax/Bcl-2* 比值、*p53* 表达水平上调。说明 nano-ZnO 能引起肝细胞变性坏死、引起氧化应激、诱导细胞凋亡,使斑马鱼肝严重损伤。以上研究表明,纳米材料可以在肝当中大量聚集,并能引起组织和功能损伤,肝中的各种酶活性发生变化和基因表达的改变是引起肝损伤的主要原因。

1.2 生殖系统毒性

众多研究指出,性腺也是纳米材料易于富集的脏器,纳米材料可对斑马鱼的生殖系统产生毒性作用。Fang 等^[17]将浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的 nano-TiO_2 作用于成年斑马鱼(雌雄各半),研究显示, nano-TiO_2 被吸收后可转移聚集到性腺,使斑马鱼血浆雌二醇(E2)、睾酮(T)、卵泡刺激素(FSH)和黄体生成素(LH)浓度降低,卵黄原蛋白(VTG)浓度显著升高。虽然在 nano-TiO_2 作用下,斑马鱼的卵巢和睾丸并未出现显著的形态改变,但各种激素水平不同程度改变导致了内分泌的失调和生殖障碍。Kotil 等^[18]将成年斑马鱼暴露于三种浓度(1、2、4 mg/L)的 nano-TiO_2 ,取斑马鱼睾丸组织检测,结果表明, nano-TiO_2 可使斑马鱼睾丸间质细胞和精原细胞有丝分裂紊乱,伴有细胞变性,在睾丸间质细胞可见自噬泡大量聚集。随着 nano-TiO_2 处理浓度增加,细胞和组织损伤也越严重,引起间质细胞、生精细胞、精原细胞的细胞自噬、坏死,造成生殖毒性。以上研究说明纳米粒子可以通过改变斑马鱼各激素水平或直接对性腺造成组织损伤,从而对生殖系统造成毒性影响。

1.3 神经系统毒性

研究表明,脑是纳米粒子易于聚集的器官之一,纳米材料可对斑马鱼脑组织及神经系统造成毒性损伤。Sheng 等^[19]将成年斑马鱼暴露于 5 种浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g/L}$)的 nano-TiO_2 45 d,研究显示 nano-TiO_2 可使斑马鱼去甲肾上腺素、多巴胺和 5-羟色胺的水平显著降低,NO 水平显著升高,胶质细

胞过度增殖,神经元凋亡,同时 nano-TiO_2 能显著激活原癌基因 *C-fos*、*C-jun*、*BDNF* 基因表达,抑制 *p38*、*NGF*、*CREB*、*NR1*、*NR2ab*、*GluR2* 基因表达。说明 nano-TiO_2 可对斑马鱼的神经系统造成毒性损伤。Wu 等^[20]将鱼龄 4 个月的斑马鱼暴露于不同浓度(0、0.5、4、32 $\mu\text{g/L}$)的 nano-TiO_2 中,结果显示,出现神经胶质瘢痕形成和脑室增大等明显的脑损伤。 nano-TiO_2 引起的脑损伤机制主要引起了脑内 ROS 的大量产生,脑内 *MAD*、*SOD*、*GSH* 活性降低,使脑组织倾向与发生氧化应激,造成了斑马鱼大脑的严重损伤,并出现游泳和社会行为异常。以上研究说明脑是纳米粒子的毒性靶器官之一,可对神经系统造成毒性损伤,并引起功能障碍。

1.4 胚胎毒性

研究表明,纳米材料可引起斑马鱼胚胎显著的毒性损伤,影响斑马鱼胚胎正常发育、引起不同程度的畸形。Kang 等^[11]分别将(0.5、1.0、1.5、2.5 mg/mL)的 C-QDs 溶液作用于斑马鱼胚胎,结果表明,(0.5、1.0、1.5 mg/mL)组的胚胎存活率均高于 80%,略低于对照组存活率 95%,而 2.5 mg/mL 组的存活率仅为 55%。说明 C-QDs 在低浓度作用下,毒性较小。段延芳^[13]将 6 种浓度(0、25、50、200、400 $\mu\text{g/mL}$)的三种上转换纳米材料铒离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)、铥离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Tm}^{3+}$)、铒离子与镱离子相掺的四氟钆钠($\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$)分别作用于 24 hpf 的斑马鱼胚胎,结果显示,随作用剂量的增大,斑马鱼胚胎的畸形率随之增加。其引起的畸形主要有:鱼鳔发育缓慢或异常、脊柱弯曲、肝畸形、心包囊水肿、卵黄囊异常。其中以鱼鳔发育缓慢及肝畸形最为常见。Ahmad 等^[21]将平均粒径为 40 nm 的 CoFe_2O_4 纳米粒子($\text{nano-CoFe}_2\text{O}_4$)作用于斑马鱼胚胎(96 hpf),观察发现,能引起斑马鱼胚胎严重心脏水肿、代谢下调、孵化延迟、尾巴/脊髓弯曲,另外 $\text{nano-CoFe}_2\text{O}_4$ 的聚集和离子溶解对胚胎细胞膜造成严重的机械损伤和氧化应激,其中头部、心脏、尾部细胞最为显著。李翔^[22]将斑马鱼受精卵暴露于两种不同粒径(15 nm、50 nm)浓度范围在(50–1000 $\mu\text{g/mL}$)的纳米二氧化硅(nano-SiO_2),结果显示经两种粒径处理后受精卵的孵化率都出现降低、死亡率和畸形率均显著增加,且随纳米粒子处理浓度的增高,畸形率升高的越显著。其中在 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度处理时,受精卵畸形率高达 60%,并

出现轻微心包水肿,当处理浓度大于 300 $\mu\text{g/mL}$ 时,受精卵畸形率大于 95%。随处理浓度的增加,畸形程度越严重,其中畸形的种类包括:心包水肿(PE),卵黄膜畸形(YM),脊柱弯曲(BS),小头(SH),小眼(SE),尾部畸形(TM),发育不良(SG)。Choi 等^[23]将 96 hpf 的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的(0.01、0.1、1、10 mg/L) nano-ZnO 中,研究发现心包水肿和卵黄囊水肿是 nano-ZnO 所导致的主要畸形,使用微阵列的基因表达谱显示在暴露于 nano-ZnO 后,689 个基因中有 498 个上调,191 个下调。所以其至畸原因可能与斑马鱼基因上调、下调密切相关。Ong 等^[24]将斑马鱼受精卵暴露于多种纳米粒子(纳米硅(nano-Si)、纳米银(nano-Ag)、纳米氧化锌(nano-ZnO)、纳米硒化镉(nano-CdSe)、单壁碳纳米管(SWCNT)),研究显示暴露于 10 mg/L nano-Ag 和 nano-CdSe 可延迟斑马鱼孵化,100 mg/L nano-CdSe 以及 10 mg/L 和 100 mg/L nano-ZnO 可完全抑制孵化,使胚胎在绒毛膜内死亡。经研究证实,抑制斑马鱼孵化的是纳米粒子本身,而非其金属溶解成分。以上研究表明,纳米粒子可对斑马鱼胚胎造成较显著的毒性作用。另外,斑马鱼胚胎对于纳米粒子的毒性十分敏感、效应显著,是纳米毒理研究的理想模型。

2 纳米材料对斑马鱼造成毒性的作用机制

为使纳米材料在日益广泛的研究和应用中具有安全性,势必要清楚其对机体的毒性机制。但纳米粒子对机体的毒性机制研究尚不充分,目前,众多以斑马鱼为模型研究纳米粒子毒性机制的研究表明,发生氧化应激、细胞凋亡、基因表达改变、细胞周期改变是纳米粒子引起斑马鱼毒性的主要机制。

2.1 氧化应激

已有研究表明,纳米粒子引起机体细胞最主要、最显著的毒性影响即引起氧化应激。Xiong 等^[25]分别将 50 mg/L 纳米二氧化钛(nano-TiO₂)和 5 mg/L 纳米氧化锌(nano-ZnO)作用于成年斑马鱼,结果表明 nano-TiO₂ 和 nano-ZnO 可使斑马鱼鳃、消化道、肝的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)发生不同程度的改变,使机体发生氧化应激。Shih 等^[26]将金红型 nano-TiO₂ 染毒斑马鱼成鱼,表明 nano-TiO₂ 使斑马鱼鳃和肝组织的 SOD 活性显著降

低,发生氧化应激,造成鳃、肝的氧化损伤。高悦^[27]将斑马鱼尾鳍伤口暴露于平均粒径为 10 nm 的经柠檬酸钠包被的纳米银颗粒(nano-Ag),发现活性氧(reactive oxygen species,ROS)在暴露的尾鳍伤口细胞大量产生,引起氧化应激,中性粒细胞超过正常水平约 50%,使再生尾鳍增殖细胞显著减少,凋亡细胞增多,造成毒性作用。Wu 等^[20]将鱼龄 4 个月的斑马鱼暴露于不同浓度(0、0.5、4、32 $\mu\text{g/L}$)的纳米 TiO₂ 中,发现能使斑马鱼脑内的 ROS 大量生成,同时脑内 MAD、SOD、GSH 等含量均出现变化,证实脑组织发生氧化应激,造成斑马鱼脑组织损伤。Zhu 等^[28]将受精后 2 h(hours post-fertilization, hpf)的斑马鱼胚胎分别暴露于粒径为 15 和 30 nm 的纳米二氧化硅(nano-SiO₂),用三种浓度(25、50、100 mg/L)分别处理 5 d,结果表明,粒径越小、浓度越大的 nano-SiO₂ 对斑马鱼胚胎体内的 ROS 含量影响越大,引起斑马鱼胚胎的氧化应激也越严重。以上研究表明,不同的纳米粒子均可以造成斑马鱼发生氧化应激,引起毒性作用。

2.2 细胞凋亡

细胞凋亡是一种为维持体内稳态而主动发生的细胞程序性死亡,许多研究表明纳米粒子可引起斑马鱼细胞凋亡,造成机体的毒性损伤。Du 等^[29]将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度(0、12.5、25、50 mg/L)的 nano-ZnO 溶液中,随着处理浓度的升高,斑马鱼胚胎体内的 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, Caspase-3)和 Caspase-9 酶的活性显著升高, CAT 酶活性被抑制,同时,细胞凋亡相关基因 *Bcl-2* 相关 X 蛋白(*Bcl-2* Associated X Protein, *BAX*)、肿瘤抑制基因 *P53*、B 淋巴细胞瘤-2 基因(*B-cell lymphoma-2*, *Bcl-2*)表达改变,斑马鱼胚胎氧化损伤并引起细胞凋亡。马爽^[30]将 nano-SiO₂ 作用于斑马鱼胚胎,研究显示 SiO₂ 可引起内质网应激关键基因 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、免疫球蛋白结合蛋白(BIP)、蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、磷酸化真核细胞起始因子 2 α (eIF2 α)表达,引起内质网应激反应;细胞凋亡和抗细胞凋亡相关基因 *BAX*、*BID*、*Bcl-2*、*Mcl-1b* 表达量改变,引起细胞凋亡,造成斑马鱼胚胎的毒性损伤。Zhao 等^[31]使用 5 种浓度(10、30、60、90、120 mg/L)的 nano-ZnO 处理斑马鱼胚胎,显示 nano-ZnO 可使

促凋亡基因(*Bax*、*Puma*、*Apaf-1*)上调,而抗凋亡基因 *Bcl-2* 下调,且凋亡细胞的百分率呈剂量依赖性增加(0.41% ~ 4.21%)。另外,斑马鱼胚胎细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)发生变化,以及 *Caspases-9* 和 *Caspases-3* 被激活,说明 nano-ZnO 可激活线粒体通路引起细胞凋亡,引起斑马鱼胚胎细胞毒性作用。已有研究表明,线粒体是纳米材料生物毒性的主要作用靶点,所以线粒体介导的细胞凋亡通路是纳米粒子引起细胞凋亡的主要途径之一^[32]。Gao 等^[33]将斑马鱼胚胎暴露于粒径为 50 nm 的 nano-Ag 当中,显示可干扰氧在胚胎血管细胞内的扩散,造成细胞缺氧,同时引起内质网应激反应并造成胚胎血管上皮细胞凋亡,影响斑马鱼胚胎血管的发育。Zhou 等^[34]使用聚乙二醇-聚己内酯纳米胶束(PEG-b-PCL)作用于斑马鱼胚胎,结果显示,能引起 *p53* 基因上调,血管生成区细胞促凋亡通路被激活,抑制血管生成,对斑马鱼胚胎心血管发育具有毒性作用。综上所述,纳米粒子可通过引起细胞氧化应激、改变酶的活性、影响基因表达、激活内质网应激通路或线粒体途径引起细胞凋亡,造成斑马鱼毒性损伤。

2.3 影响基因表达

目前有研究表明,斑马鱼体内基因的表达情况会受纳米粒子影响,对斑马鱼造成毒性损伤。Gao 等^[33]将 50 nm 的 nano-Ag 作用于斑马鱼胚胎,研究显示, nano-Ag 可抑制血管内皮生长因子(VEGF)信号通路基因表达,使酪氨酸激酶(*Src*)受抑制,磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, *PI3K*)/蛋白激酶 B(*protein kinase B*, *Akt*)通路中 *Akt* 磷酸化,抑制血管生成,导致斑马鱼胚胎血管发育的异常迟缓,造成胚胎发育毒性。Ladhar 等^[35]将斑马鱼暴露于粒径为 8 nm 和 50 nm 的硫化镉纳米颗粒(*CdSNPs*)中,随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, *RAPD*)PCR 基因毒性试验结果显示 *CdSNPs* 可使 *RAPD* 探针的杂交位点数量明显改变,即基因组发生改变,引起线粒体功能障碍。Du 等^[29]将斑马鱼胚胎暴露于三种浓度(12.5、25、50 mg/L)的 nano-ZnO 中,结果表明 *Bax*、*p53*、*Caspase-3*、*Caspase-9* 等凋亡通路相关基因均出现显著上调,而抗凋亡基因 *Bcl-2* 显著下调,引起斑马鱼胚胎出现严重的细胞凋亡,造成显著的胚胎毒性。Sheng 等^[19]将四种浓度(5、10、20、40 $\mu\text{g/L}$)的 nano-TiO₂ 连续 45 d 作用于成年斑马鱼,结果显示,

nano-TiO₂ 可显著激活 *C-fos*、*C-jun*、*Bdnf* 基因表达,抑制 *p38*、*Ngf*、*Creb*、*Nr1*、*NR2ab*、*GluR2* 基因表达,对斑马鱼大脑产生一定程度的损伤,具有神经毒性。以上研究表明,纳米材料影响斑马鱼基因的表达是纳米材料引起斑马鱼毒性损伤的重要机制之一。

2.4 细胞周期

近年来有研究表明,纳米粒子可以通过影响斑马鱼细胞周期,影响斑马鱼的生长发育。Hou 等^[36]将 nano-ZnO 作用于斑马鱼胚胎,研究发现, nano-ZnO 可抑制细胞周期蛋白(*Cycs*)、细胞周期蛋白依赖性激酶(*CDK*)的表达,使微脂质体(*MCM*)被破坏,激活了 *Cyc/CDK* 复合物(*CycD/CDK4*, 6; *CycE/CDK2*; *CycA/CDK2*),使细胞周期的不同时期(*G1* 期、*M* 期和 *G2* 期)均受到影响,导致 DNA 复制紊乱,个体的细胞分裂、分化、增殖等正常活动及 DNA 合成和细胞内转移功能受到干扰,造成一定程度的细胞毒性作用。

3 纳米材料对斑马鱼的毒性影响因素

有研究表明,纳米粒子的化学组成、粒径、浓度或剂量、形状、给药方式以及纳米材料的制备方法等,都可以影响纳米材料对机体的毒性。

3.1 化学组成

Xiong 等^[25]将两种粒径相同(50 nm)而化学组成不同的纳米粒子(nano-TiO₂、nano-ZnO)作用于成年斑马鱼(作用浓度为 5 mg/L、50 mg/L),检测斑马鱼在鳃、消化道及肝的各项指标(*SOD*、*CAT*、*GSH*、*MDA*),表明 5 mg/L 的 nano-ZnO 对斑马鱼的毒性作用要显著强于 5 mg/L nano-TiO₂,另外 5 mg/L 的 nano-ZnO 和 50 mg/L 的 nano-TiO₂ 对斑马鱼的毒性效应几乎相当,说明在相同粒径、相同浓度下, nano-ZnO 的毒性要显著大于 nano-TiO₂。Liu 等^[37]分别将 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 SiO₂ 纳米球和 C-QDs 作用于 6 hpf 的斑马鱼胚胎,结果表明 SiO₂ 纳米球会引起胚胎严重的畸形,而经 C-QDs 处理的斑马鱼胚胎则能够正常发育,其畸形率与对照组基本相同。因此, C-QDs 较 SiO₂ 纳米球的致畸毒性小。

3.2 浓度或剂量

Zhu 等^[28]将三种不同浓度(25、50、100 mg/L)的 nano-SiO₂ 作用于 2 hpf 的斑马鱼胚胎,结果表明, nano-SiO₂ 浓度越大,对斑马鱼胚胎体内的 ROS 含量影响越大,引起斑马鱼胚胎的氧化应激也越严重。Souza 等^[14]将成年斑马鱼分别暴露于三种浓度

(2、10、20 mg/L)的氧化石墨烯(GO)中,研究显示,GO可使肝细胞出现核碎裂、核固缩、形成液泡、细胞破裂和坏死,作用浓度越高,肝细胞损伤越显著。段延芳^[13]将6种浓度(0、25、50、200、400 $\mu\text{g/mL}$)的三种上转换纳米材料(铒离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$)、铥离子与镱离子相掺的四氟钇钠($\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$)、铒离子与镱离子相掺的四氟钆钠($\text{NaGdF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$)分别作用于24 hpf的斑马鱼胚胎,结果表明,其半数致死量为200 $\mu\text{g/mL}$,随作用浓度的增大,斑马鱼胚胎的畸形率和死亡率都随之增加。

3.3 粒径

通常情况下,粒径越小的纳米粒子毒性越强。Zhu等^[28]将两种不同粒径(15 nm、30 nm)的 nano- SiO_2 作用2 hpf的斑马鱼胚胎,结果表明 nano- SiO_2 粒径越小,聚集在斑马鱼胚胎内的纳米粒子就越多,排出的时间也越长,毒性效应越显著。李翔^[22]将斑马鱼受精卵暴露于两种不同粒径(15 nm、50 nm)浓度范围在(50~1000 $\mu\text{g/mL}$)的纳米二氧化硅(nano- SiO_2),研究显示,在处理浓度相同时,15 nm(小粒径组)的 nano- SiO_2 更易被机体摄取,富集含量更多,造成的毒性影响也更显著,斑马鱼受精卵的死亡率和畸形率也显著增加。

3.4 形状

Hua等^[38]将不同形状的 nano-ZnO(纳米球、纳米棒、亚微米立方体型)作用于斑马鱼胚胎,研究表明,不同形状的 nano-ZnO可造成不同程度的胚胎毒性,其中纳米棒的毒性作用最强,其机制可能为纳米棒结构尖而细,对生物膜有较强的损伤和破坏能力,且可以延长其在机体内分布时间,难以代谢排除,对机体造成较强毒性作用。Ispas等^[39]将树枝状和球形的纳米 Ni 作用于斑马鱼,经对比发现,树枝状的纳米 Ni 在斑马鱼体内的停留时间要远长于球形纳米 Ni,使树枝状纳米 Ni 在体内分布的量更多,其毒性效应也越显著,对斑马鱼的肠道和骨骼肌造成严重的组织损伤。

3.5 给药方式

Kang等^[11]分别将(0.5、1.0、1.5、2.5 mg/mL)的 C-QDs 溶液通过微注射法和浸泡法作用于斑马鱼胚胎。实验表明,通过微注射法和浸泡法给药的(0.5、1.0、1.5 mg/mL)组的胚胎存活率均超过80%,通过浸泡法给药的2.5 mg/mL组存活率为60%,而通过微注射法给药的2.5 mg/mL组存活率

仅为55%。说明,在相同的作用剂量下,微注射法比浸泡法对斑马鱼胚胎有更强的毒性损伤。

3.6 制备方法

Peng等^[40]分别将自顶向下法和自底向上法合成的碳点(C-dots)通过微注射法作用于受精后6 d的斑马鱼胚胎腹腔。结果显示,自顶向下法合成的 C-dots 可在斑马鱼骨骼中大量沉积,即对钙化骨具有极好的亲和力。而自底向上法合成的 C-dots 则并不能在骨骼中观察到,即无骨亲和特性。自顶向下法合成的 C-dots 与斑马鱼骨骼良好的亲和性可能与其制备过程中表面产生的大量极性基团有关。

综上所述,通常情况下,在其他变量都相同时:粒径越小的纳米粒子毒性越强;浓度或剂量越大毒性越强;不同化学组成的纳米粒子性质差异较大,如不含金属的纳米材料(如碳量子点等)较含金属或金属氧化物的纳米粒子毒性小,引起的毒性效应和毒性机制不甚相同;不同形状的纳米粒子也可能具有不同的毒性机制;纳米材料制备方法的差异抑或是给药方式的差异都可导致不同的体内效应。但目前对于纳米粒子毒性机制的研究尚不深入,影响纳米粒子毒性的因素依然有待探讨。

4 结语

目前,斑马鱼作为毒理学研究的重要模式生物,已经在环境毒理学、胚胎发育毒理学当中得到了十分广泛的研究和应用,因其具备的许多哺乳动物所没有的独特优势,斑马鱼在纳米毒理学中日益受到各国专家学者的重视。当前大部分关于斑马鱼的纳米毒理学研究主要集中在毒性机制(如氧化应激、细胞凋亡、基因表达改变等)和毒性效应(如对消化系统、神经系统、生殖系统的损伤),但由于大部分研究仍然停留在表面,而且不全面、不彻底,人们对纳米粒子的毒性机制和影响毒性因素依然所知甚微。未来,纳米粒子使斑马鱼各个系统损伤的发生损伤的具体分子机制是一个重要的研究方向^[41-42],另外,如何降低纳米粒子的毒性作用、对纳米粒子的安全粒径、浓度或剂量范围的寻找依旧需要不断研究探索,为纳米粒子在临床应用打下重要基础。

参考文献:

- [1] Anand AS, Gahlot U, Prasad DN, et al. Aluminum oxide nanoparticles mediated toxicity, loss of appendages in progeny of

- Drosophila melanogaster* on chronic exposure [J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(7): 977-989.
- [2] Li L, Zhou X, Yu Y, et al. Silver nanoparticles induce protective autophagy via Ca^{2+} /CaMKK β /AMPK/mTOR pathway in SH-SY5Y cells and rat brains [J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(3): 369-391.
- [3] Lewis RW, Bertsch PM, McNear DH. Nanotoxicity of engineered nanomaterials (ENMs) to environmentally relevant beneficial soil bacteria - a critical review [J]. *Nanotoxicology*, 2019, 13(3): 392-428.
- [4] Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, et al. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity [J]. *J Nanobiotechnology*, 2016, 14(1): 65.
- [5] Komoike Y, Matsuoka M. Application of zebrafish model to environmental toxicology [J]. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 2016, 71(3): 227-235.
- [6] Bambino K, Chu J. Zebrafish in toxicology and environmental health [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 124: 331-367.
- [7] Løvmo SD, Speth MT, Repnik U, et al. Translocation of nanoparticles and *Mycobacterium marinum* across the intestinal epithelium in zebrafish and the role of the mucosal immune system [J]. *Dev Comp Immunol*, 2017, 67: 508-518.
- [8] Sung HK, Jo E, Kim E, et al. Analysis of gold and silver nanoparticles internalized by zebrafish (*Danio rerio*) using single particle-inductively coupled plasma-mass spectrometry [J]. *Chemosphere*, 2018, 209: 815-822.
- [9] Osborne OJ, Lin S, Chang CH, et al. Organ-Specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebrafish [J]. *ACS Nano*, 2015, 9(10): 9573-9584.
- [10] Chen L, Guo Y, Hu C, et al. Dysbiosis of gut microbiota by chronic coexposure to titanium dioxide nanoparticles and bisphenol A: Implications for host health in zebrafish [J]. *Environ Pollut*, 2018, 234: 307-317.
- [11] Kang YF, Li YH, Fang YW, et al. Carbon quantum dots for Zebrafish fluorescence imaging [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11835.
- [12] Ren X, Zhao X, Duan X, et al. Enhanced bio-concentration of tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate in the presence of nano-TiO₂ can lead to adverse reproductive outcomes in zebrafish [J]. *Environ Pollut*, 2018, 233: 612-622.
- [13] 段延芳. 稀土上转换纳米材料的发光特性及其生物相容性的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江大学; 2016.
- [14] Souza JP, Baretta JF, Santos F, et al. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2017, 186: 11-18.
- [15] Gao M, Lv M, Liu Y, et al. Transcriptome analysis of the effects of Cd and nanomaterial-loaded Cd on the liver in zebrafish [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 164: 530-539.
- [16] 刘林, 赵群芬, 金凯星, 等. 纳米氧化锌对斑马鱼肝脏的毒性效应 [J]. *环境科学*, 2015, 36(10): 3884-3891.
- [17] Fang Q, Shi Q, Guo Y, et al. Enhanced bioconcentration of bisphenol a in the presence of Nano-TiO₂ can lead to adverse reproductive outcomes in zebrafish [J]. *Environ Sci Technol*, 2016, 50(2): 1005-1013.
- [18] Kotil T, Akbulut C, Yönd ND. The effects of titanium dioxide nanoparticles on ultrastructure of zebrafish testis (*Danio rerio*) [J]. *Micron*, 2017, 100: 38-44.
- [19] Sheng L, Wang L, Su M, et al. Mechanism of TiO₂ nanoparticle-induced neurotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(2): 163-175.
- [20] Wu Q, Yan W, Liu C, et al. Co-exposure with titanium dioxide nanoparticles exacerbates MCLR-induced brain injury in zebrafish [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 693: 133540.
- [21] Ahmad F, Liu X, Zhou Y, et al. An *in vivo* evaluation of acute toxicity of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles in larval-embryo zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2015, 166: 21-28.
- [22] 李翔. 二氧化硅纳米粒子对斑马鱼的发育与神经的影响 [D]. 天津: 南开大学; 2014.
- [23] Choi JS, Kim RO, Yoon S, et al. Developmental toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*): a transcriptomic analysis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160763.
- [24] Ong KJ, Zhao X, Thistle ME, et al. Mechanistic insights into the effect of nanoparticles on zebrafish hatch [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8(3): 295-304.
- [25] Xiong D, Fang T, Yu L, et al. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage [J]. *Sci Total Environ*, 2011, 409(8): 1444-1452.
- [26] Shih YJ, Su CC, Chen CW, et al. Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching [J]. *Chemosphere*, 2016, 154: 109-117.
- [27] 高悦. 纳米银对成年斑马鱼尾鳍再生的毒理学效应研究 [D]. 武汉: 江汉大学; 2019.
- [28] Zhu B, He W, Hu S, et al. The fate and oxidative stress of different sized SiO₂ nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. *Chemosphere*, 2019, 225: 705-712.
- [29] Du J, Cai J, Wang S, et al. Oxidative stress and apoptosis to zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and ZnO nanoparticles [J]. *Int J Occup Med Environ Health*, 2017, 30(2): 213-229.
- [30] 马爽. 纳米二氧化硅对斑马鱼胚胎发育的影响研究 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学; 2015.
- [31] Zhao X, Ren X, Zhu R, et al. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos [J]. *Aquat Toxicol*, 2016, 180: 56-70.
- [32] 陈芳, 唐瑛, 杨李. 线粒体-纳米材料生物毒性的主要作用靶点 [J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(10): 83.
- [33] Gao J, Mahapatra CT, Mapes CD, et al. Vascular toxicity of silver nanoparticles to developing zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Nanotoxicology*, 2016, 10(9): 1363-1372.

- 条例》[国务院令第 424 号] [Z]. 北京: 中华人民共和国国务院, 2004.
- [25] 中华人民共和国卫生部.《人间传染的病原微生物名录》[卫科教发[2006]15 号] [Z]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2006.
- [26] Ling AE. Editorial on laboratory-acquired incidents in Taipei, Taiwan and Singapore following the Outbreak of SARS coronavirus [J]. *Applied Biosafety*, 2007, 12(1): 17.
- [27] 赵鲁. 实验室 SARS 病毒泄漏事故回顾 [EB/OL]. 中国科学报 [2014-07-25]. <http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2014/7/299630.shtm>.
- [28] 王帝. 东北农业大学 28 名师生因动物实验感染严重传染病 [EB/OL]. 中国青年报[2011-09-03]. http://zqb.cyol.com/html/2011-09/03/nw.D110000zgqnb_20110903_3-03.htm.
- [29] Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, GA, USA. CDC Report on the potential exposure to anthrax [J]. *Int Microbiol*, 2014, 17(2): 119-127.
- [30] 卢选成, 李晓燕, 姜孟楠, 等. 感染性动物实验设施的设计与建设[J]. *中国公共卫生管理*, 2009, 25(2): 153-154.
- [31] 章欣. 生物安全 4 级实验室建设关键问题及发展策略研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2016.
- [32] Fontes B. Institutional responsibilities in contamination control in research animals and occupational health and safety for animal handlers [J]. *ILAR J*, 2008, 49(3): 326-337.

[收稿日期]2020-04-08

(上接第 113 页)

- [34] Zhou T, Dong Q, Shen Y, et al. PEG-b-PCL polymeric nanomicelle inhibits vascular angiogenesis by activating p53-dependent apoptosis in zebrafish [J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 6517-6531.
- [35] Ladhar C, Geffroy B, Cambier S, et al. Impact of dietary cadmium sulphide nanoparticles on *Danio rerio* zebrafish at very low contamination pressure [J]. *Nanotoxicology*, 2014, 8(6): 676-685.
- [36] Hou J, Liu H, Zhang S, et al. Mechanism of toxic effects of Nano-ZnO on cell cycle of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2019, 229: 206-213.
- [37] Liu Y, Liu B, Feng D, et al. A progressive approach on Zebrafish toward sensitive evaluation of nanoparticles' toxicity [J]. *Integr Biol*, 2012, 4(3): 285-291.
- [38] Hua J, Vijver MG, Richardson MK, et al. Particle-specific toxic effects of differently shaped zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryos (*Danio rerio*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33(12): 2859-2868.
- [39] Ispas C, Andreescu D, Patel A, et al. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish [J]. *Environ Sci Technol*, 2009, 43(16): 6349-6356.
- [40] Peng Z, Miyajima EH, Zhou Y, et al. Carbon dots: promising biomaterials for bone-specific imaging and drug delivery [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(44): 17533-17543.
- [41] 王小琦, 孙岩, 张洋, 等. 斑马鱼模型在常见骨疾病研究中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(6): 86-91.
- [42] 汪玲, 陈朝红. 斑马鱼: 人类肾脏疾病治疗药物筛选的新工具 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(12): 113-118.

[收稿日期]2020-04-20