

人工纳米材料富勒烯(C₆₀)低剂量长期暴露对鲫鱼的氧化伤害

朱小山¹, 朱琳^{1,2*}, 郎宇鹏¹, 李燕¹, 端正花¹, 姚琨¹

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2. 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300253)

摘要: 为更好地判断人工纳米材料(富勒烯, C₆₀)对水生生物的潜在健康危害, 以鲫鱼(*Carassius auratus*)幼鱼为受试生物, 研究了低剂量 C₆₀ (0.04 ~ 1.0 mg·L⁻¹) 长期(32 d)暴露对鲫鱼的氧化伤害. 结果表明, 各实验组中鲫鱼幼鱼脑、肝脏、鳃组织中的还原型谷胱甘肽(GSH)含量都发生显著降低 ($p < 0.05$), 其中 1 mg·L⁻¹ nC₆₀/aq 的暴露对鳃组织 GSH 含量的抑制率为 14.3%, 高于对鱼脑、肝脏组织中的抑制率; 肝脏组织中过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 以及鳃组织中 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性均被显著激活, 其最大活性分别是对照的 121.34% (0.04 mg·L⁻¹ 暴露组)、114.80% (0.04 mg·L⁻¹ 暴露组) 和 348.59% (0.20 mg·L⁻¹ 暴露组). 实验结果揭示, 长期暴露引起机体组织的氧化应激可能是水环境中 C₆₀ 的致毒机制之一.

关键词: 纳米材料; 富勒烯; 鲫鱼; 暴露; 生态毒性; 氧化伤害

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)04-0855-07

Oxidative Damages of Long-term Exposure to Low Level Fullerenes (C₆₀) in *Carassius auratus*

ZHU Xiao-shan¹, ZHU Lin^{1,2}, LANG Yu-peng¹, LI Yan¹, DUAN Zheng-hua¹, YAO Kun¹

(1. College of Environmental Science & Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, Nankai University, Tianjin 300253, China)

Abstract: To determine the potential effects of fullerenes (C₆₀) on aquatic organism, larval *Carassius auratus* was exposed to low level C₆₀ (0.04-1.0 mg·L⁻¹) for 32 days. Then the oxidative damages in brain, liver and gill tissue of larval *Carassius auratus* were measured. The results showed that: compared to the control, the reduced glutathione (GSH) contents in all different tissues decreased significantly ($p < 0.05$), and the most serious inhibition of GSH with a 14.3% inhibition rate was found in the gill tissue of larval crucian exposed to 1 mg·L⁻¹ C₆₀ aqueous suspension; whereas the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities in liver tissue, Na⁺-K⁺-ATPase activities in gill tissue were stimulated significantly ($p < 0.05$), and the maximal activity of them were 121.34% (exposed to 0.04 mg·L⁻¹ C₆₀ aqueous suspension), 114.80% (exposed to 0.04 mg·L⁻¹ C₆₀ aqueous suspension) and 348.59% (exposed to 0.20 mg·L⁻¹ C₆₀ aqueous suspension) respectively than that of control. The experiment results indicated that oxidative damages induced by long-term exposure might play a role in the bio-toxicity of C₆₀ to larval crucian.

Key words: nanomaterials; fullerene C₆₀; *Carassius auratus*; exposure; ecotoxicity; oxidative damages

人工纳米材料(manufactured nanomaterials, MNMs),是指至少在一个几何面上的关键尺寸低于 100 nm,并具有高度均匀性的材料,特别是指以应用为目的被人工制造出来的产品,包括纳米颗粒、纳米管、纳米线和富勒烯与其衍生物等纳米尺度材料^[1~3].由于 MNMs 具有许多优良而又奇异的物理或化学性质(例如由纳米尺度所引起的尺寸效应、量子效应、巨大的表面效应以及界面效应等),因而在医药、工业、建筑、染料、涂料、食品、化妆品和环保等产业中具有十分诱人的前景,其应用越来越广泛.但是,也正因为人造纳米材料的这些奇异特性,及其日益增加的产量和应用,其潜在的环境和健康风险同样引起了广泛的关注^[1~3].三维碳纳米材料富勒烯(C₆₀)目前正被工业生产^[1,4],并在涂料、电子和生物

医学等领域获得广泛应用^[2,4],因此 C₆₀ 进入环境中的可能性很高.尽管 C₆₀ 本身的水溶性很低($< 10^{-9}$ mg·L⁻¹)^[5,6],但还是可以通过多种途径提高其水溶性或得到能稳定在水中的纳米尺度悬浮聚合物(nC₆₀).不同方法制备的 nC₆₀ 其急性毒性的大小也不同,如nC₆₀/aq(C₆₀加入水中后经长时间搅拌制得,没有添加任何助溶剂)对细菌^[5]、大型蚤(*Daphnia*)^[7,8]、黑头呆鱼(Fathead minnow, *Pimephales promelas*)^[7,8]的急性毒性小于 nC₆₀/THF(以四氢呋喃

收稿日期: 2007-05-02; 修订日期: 2007-07-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(30470319); 高等学校博士点专项基金项目(20070055033)

作者简介: 朱小山(1977~),男,博士,主要研究方向为环境生物与生态毒理学, E-mail: zxsx1977@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

THF 为助溶剂)。尽管 nC_{60}/aq 的急性毒性较小,但是由于 nC_{60}/aq 在制备过程中没有添加任何有机物, C_{60} 在波浪的作用下就有可能形成 nC_{60}/aq ^[8], 从生态学角度出发, nC_{60}/aq 是富勒烯进入水环境后最可能的存在形式。因此,在研究 C_{60} 的生态毒性时,应重点考虑 nC_{60}/aq 的环境暴露可能导致的健康危害。迄今为止有关 nC_{60}/aq 的长期暴露对水生生物的影响鲜见报道,相关的毒理学数据极为缺乏^[9]。已有文献报道了 nC_{60}/THF 的暴露能对大口黑鲈 (Largemouth bass, *Micropterus salmoides*) 和黑头呆鱼产生氧化伤害^[4,7], 本实验室在研究 nC_{60}/TTA (以甲苯 toluene、四氢呋喃 THF 和丙酮 acetone 为助溶剂) 对斑马鱼 (Zebrafish, *Danio rerio*) 的发育毒性时也有类似发现^[10]。考虑到鲫鱼 (*Carassius auratus*) 在我国分布广泛,而且易于养殖。因此,为进一步揭示 MNMs (C_{60}) 对水生生物的潜在健康危害,本研究采用半静水式实验方法,分析了 nC_{60}/aq 的长期暴露 (32 d) 对鲫鱼幼体的氧化伤害,以便能更好地评估 C_{60} 进入水环境后的生态风险和直接或间接的健康影响。

1 材料与方法

1.1 材料

试剂: 未经修饰的富勒烯 (C_{60} , 纯度: 99.5%, SES, USA), 美国 Rice 大学赠送; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 纯度: 99.5%), 十二烷基硫酸钠 (SDS); 牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin, 纯度 > 98.0%), 考马斯亮兰 (Coomassie Brilliant Blue G-250) 均购自 Sigma-aldrich 公司。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、 Na^+-K^+-ATP 酶和还原型谷胱甘肽 (GSH) 测试试剂盒, 均自南京建成生物工程研究所购得。其余都为国产优级纯或分析纯试剂。

主要仪器: Tecnai G2 T20ST 型透射电子显微镜 (飞利浦, 荷兰); BI9000AT 型激光粒度分析仪 (BRUOKHAVEN 公司, 美国); 755B 紫外分光光度计 (Shanghai Precision & Scientific Instrument CO., LTD, 上海); J22HS 高速冷冻离心机 (Beckman 公司)。

1.2 nC_{60}/aq 实验溶液

nC_{60}/aq 贮备液: 根据 Lyon 等^[5] 和 Cheng 等^[11] 的方法并略有变动, 准确称取未经修饰的粉末状 C_{60} 500 mg 加入到 1 L MilliQ water 中, 剧烈搅拌, 2 月后停止搅拌然后静置 72 h, 所得上层均匀橙黄色悬浮液即为 nC_{60}/aq 水悬浮液。将该溶液移入棕色玻璃瓶中, 密封后室温避光保存。该溶液可在实验室内保持

稳定长达 1 个月。

nC_{60}/aq 浓度测定: 根据 Lyon 等^[5] 和 Deguchi 等^[12] 的方法并略做修改。 nC_{60}/aq 水悬浮液和高浓度高氯酸镁溶液混合后, 可通过加入甲苯将 C_{60} 萃取出来, 然后于 336 nm 处采用分光光度法进行比色测定。取 2 mL 的 nC_{60}/aq 悬浮液和 2 mL 的高氯酸镁 (100 mmol/L) 溶液在玻璃瓶内混合, 然后再加入 4 mL 优级纯甲苯, 迅速密封, 超声振荡 5 ~ 10 min, 直到出现白色乳状液为止, 然后置于摇床上, 150 ~ 200 r/min 快速振摇 30 min, 得到清澈透明双层溶液。将其置于 -20℃ 冰箱内冷冻处理, 一段时间后取出观察, 未被冷冻的即为有机相甲苯溶液, 迅速倒出, 在室温下以甲苯为参比于 336 nm 处测定其吸光度, 然后与预先做好的 C_{60} 甲苯溶液的标准曲线进行比较, 即可计算出 nC_{60}/aq 的浓度。

nC_{60}/aq 实验溶液: 将上述 nC_{60}/aq 储备液用脱氯自来水稀释至所需浓度, 所得溶液即为 nC_{60}/aq 实验溶液。

nC_{60}/aq 的表征: 取少量 nC_{60}/aq 实验溶液, 用激光动态光散射系统对其进行粒径分析, 并进一步用透射电子显微镜技术进行验证和分析其形貌。

1.3 鲫鱼 (*Carassius auratus*)

鲫鱼幼鱼购自天津市塘沽区花鸟虫鱼市场, 所有鲫鱼均来自同一鱼场, 经 5% 食盐水消毒后进入实验室。鲫鱼幼鱼平均全长为 (5.06 ± 0.54) cm, 平均体重为 (1.48 ± 0.33) g。实验前, 鲫鱼幼鱼先在曝气自来水中驯养 10 d。驯养期间幼鱼生长无异常。

1.4 暴露过程

选取个体差异不大, 健康活泼的鲫鱼幼体用于暴露实验。鲫鱼幼体随机分出 4 组, 每组 10 条鱼, 实验前快速测其全长和体重, 然后将每组鲫鱼幼鱼分别放入含 20 L nC_{60}/aq 实验溶液的玻璃缸 (试验前先用浓硝酸浸泡, 清洗后再用相应试验浓度的 nC_{60}/aq 实验溶液浸泡 48 h) 中, 其中 1 组为对照组, 另外 3 组为浓度组, nC_{60}/aq 浓度依次为 0.04、0.20、1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 。暴露时间为 32 d, 期间用曝气机连续充气, 每天定时投喂饵料。暴露期间, 每隔 48 h 更新 1/2 的 nC_{60}/aq 实验溶液。实验期间, 水温控制在 $(23 \pm 2) ^\circ C$, pH 值稳定在 8.0 ± 0.2 , 硬度约为 102 $mg \cdot L^{-1}$ (以 $CaCO_3$ 计), 自然光照。实验期间幼鱼无死亡。

1.5 取样和样品预处理

暴露 32 d 后取样: 将鲫鱼取出, 进行活体解剖, 快速取出脑组织、肝脏组织和全鳃, 用冰生理盐水

(0.86%)清洗其中血液,滤纸吸干,迅速称取适量置于冰浴中,加入冰生理盐水,体积质量比为 10:1,用玻璃匀浆器匀浆,将匀浆液于 4℃,10 000 r/min 下离心 10 min,取上清液置于 -20℃ 冰箱内保存待用,所有指标当天测定完毕。

1.6 GSH 含量及酶活性的测定

脑、肝脏和鳃组织中 GSH 的含量及 SOD、CAT 和 ATPase 酶活性的测定参考试剂盒使用说明书进行。

其中,GSH 的测定原理为:GSH 与二硫代二硝基苯甲酸反应能产生一种黄色化合物,通过比色测量可确定 GSH 在组织中的含量。

SOD 活性的测定原理为:通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生 O₂⁻,后者能氧化羟胺生成亚硝酸盐,在显色剂的作用下得到稳定的粉红色偶氮染料,用可见分光光度计测其吸光度。如样品中含有 SOD 时,SOD 能清除 O₂⁻,使形成的亚硝酸盐减少。因此,可通过比色测定对照和样品的吸光度值,再经公式计算即可求出被测样品中的 SOD 活力。SOD 酶活力单位定义为:每 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个酶活力单位(U)。

CAT 活性的测定原理为:CAT 在一定条件下能直接分解其底物——过氧化氢(H₂O₂),使反应液中 H₂O₂ 的浓度降低,相应的吸光度也降低,因此,通过比色测定对照和样品的吸光度值求得被测样品中 CAT 的活性。CAT 酶活力单位定义为:每 g 组织蛋白中 CAT 每 s 分解吸光度为 0.50 ~ 0.55 的底物中的过氧化氢相对量为 1 个 CAT 的酶活力单位(U)。

ATPase 活性的测定原理为:由于 ATPase 可分解 ATP 生成 ADP 及无机磷,因此可通过测定无机磷的量来确定 ATPase 活性大小。ATPase 酶活力单位定义为:每 h 每 mg 组织蛋白的组织中 ATPase 分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为 1 个 ATPase 酶活力单位(U)。

1.7 总蛋白含量的测定

蛋白质含量用 Bradford 方法测定,以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白^[13]。

1.8 统计分析

每组实验均重复 3 次,实验结果表示为平均数 ± 标准误差(Mean ± SD),使用 SPSS13.0 统计软件和单边 ANOVA 法(以 Tukey 作为 post hoc test)在组间和组内进行差异显著性分析, *p* < 0.05 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 nC₆₀/aq 在水中的粒径和形貌

水中 nC₆₀/aq 的光学和 TEM 照片见图 1。nC₆₀/aq 水悬浮液外观呈橙黄色, nC₆₀/aq 均匀分布其中[图 1(a)]。从 TEM 照片可见, nC₆₀/aq 单体大多略呈圆形或椭圆形,棱角圆钝,具有明显的晶状结构,易于聚集成形成粒径更大团块[图 1(b)]。原因可能是 nC₆₀/aq 单体粒径小,比表面积大,颗粒的比表面能高,属于热力学不稳定体系,再加上颗粒间的范德华力、静电力等使 nC₆₀/aq 产生团聚。激光动态光散射系统分析和透射电子显微镜观察发现, nC₆₀/aq 颗粒粒径分布较宽,范围为 65 ~ 517 nm,平均粒径约为 320 nm。

2.2 GSH 含量的变化

GSH 是一种小分子三肽,作为机体抵抗污染

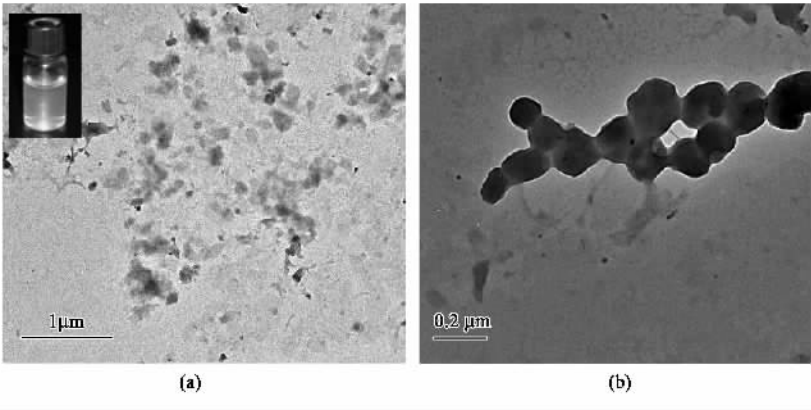


图 1 nC₆₀/aq 在水中的光学(左上角)和 TEM 照片

Fig.1 Optics (top left corner in image a) and TEM image of nC₆₀/aq

迫的第一道防线,在抗氧化防御过程中具有不可替代的作用,主要表现为 2 个方面,其一,在谷胱甘肽

硫转移酶的催化作用下,作为外源性污染物及其体内代谢产物所产生的亲电中间体的结合靶点,降低

其生物毒性;其二,作为抗氧化剂,在清除活性氧如 H_2O_2 以及 $\cdot\text{OH}$ 过程中发挥重要作用^[14].GSH 与抗氧化酶一样,既可用于污染的暴露而产生适应性诱导反应,也可由于污染的毒性作用而产生中毒反应,即有机体内 GSH 含量降低^[15].

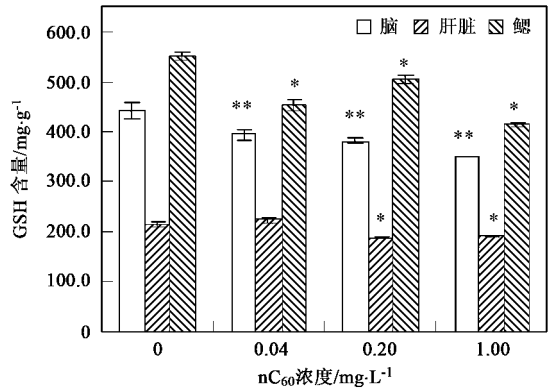
暴露 32 d 后,鲫鱼不同组织中 GSH 含量随浓度的变化如图 2 所示.可看到,不同组织中的 GSH 对 nC_{60}/aq 暴露胁迫的响应机制各不相同.脑组织中的 GSH 含量随 nC_{60}/aq 浓度的增加持续降低,表现出良好的剂量效应相关关系,表明在一定暴露浓度范围内,GSH 对 nC_{60}/aq 的适应性能力随着污染程度的增加而降低,而 nC_{60}/aq 对 GSH 的毒性效应则随着污染程度的增加而加大.与对照组相比,各组中 GSH 的含量均受到了极显著抑制($p < 0.01$),说明经过 32 d 的长期暴露,浓度低至 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 nC_{60}/aq 就已对鲫鱼脑组织构成了氧化胁迫.肝脏组织中的 GSH 含量在低浓度时($0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)上升,受到诱导,但与对照相比并无统计差异($p > 0.05$). nC_{60}/aq 浓度 $\geq 0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 GSH 含量显著低于对照,表明 nC_{60}/aq 对肝脏组织的伤害已开始超过机体的防御能力.鳃组织中的 GSH 含量最高,对 nC_{60}/aq 的暴露也最敏感, $0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的暴露能导致 GSH 含量显著的降低, $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ nC_{60}/aq 的暴露对鳃组织 GSH 含量的抑制率为 14.3%,高于对其他 2 种组织的抑制率. $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的 GSH 含量有所回升,可能是该浓度下鲫鱼幼鱼鳃组织内 CAT 受到显著激活导致机体抗氧化能力有所恢复的原因.实验结果表明,低浓度的 nC_{60}/aq 长期暴露能导致鲫鱼幼鱼机体抗氧化

能力下降,产生氧化胁迫.

2.3 SOD 的活性变化

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是清除超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$)的特异性专一性酶,在生物体内最先与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 作用,将其分解为 H_2O_2 和 O_2 ,是最重要的抗氧化酶之一. SOD 对污染物胁迫相当敏感,在低浓度污染物暴露下或短时间内,由于酶合成增加,其活性往往出现诱导,以此清除体内多余的活性氧^[16],当活性氧的产生超出抗氧化防御系统的防御能力,SOD 活性又会受到抑制,其活性变化可作为污染物胁迫下机体氧化应激的敏感信号,可用作指示环境污染的早期预警.

鲫鱼幼鱼暴露于 nC_{60}/aq 32 d 后,不同组织中 SOD 酶活性随浓度的变化如图 3 所示.不同浓度暴露组鲫鱼幼鱼脑组织和鳃组织中的 SOD 酶活性变化与对照相比没有显著差异,各浓度组间 SOD 酶活性的变化也没有显著差异($p > 0.05$),可能是在这 2 个部位其他的抗氧化防御机制起主导作用,如 GSH 的抗氧化作用等(图 2).肝脏组织中 SOD 酶活性对 nC_{60}/aq 的暴露最敏感,不同浓度暴露组的鲫鱼幼鱼肝脏组织内 SOD 酶活性均显著受到诱导($p < 0.05$),当 nC_{60}/aq 浓度 $\geq 0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,酶活性开始下降,表明鲫鱼幼鱼所受到的氧化胁迫进一步上升.实验结果同样表明,低浓度的 nC_{60}/aq 长期暴露能导致鲫鱼幼鱼机体产生氧化应激.各个浓度组的鲫鱼幼鱼鳃组织中 SOD 活性的变化在各个组间,以及与对照组间,均无显著性差异($p > 0.05$)(图 3),说明低浓度的 nC_{60}/aq 暴露 32 d 对鲫鱼幼鱼鳃组织 SOD 活性没有明显影响.



* 表示该浓度与对照相比存在显著性差异($p < 0.05$),

** 表示存在极显著差异($p < 0.01$),下同

图 2 nC_{60}/aq 对鲫鱼幼鱼不同组织中 GSH 含量的影响

Fig.2 Effects of nC_{60}/aq at low concentration on the GSH contents of juvenile *Carassius auratus*

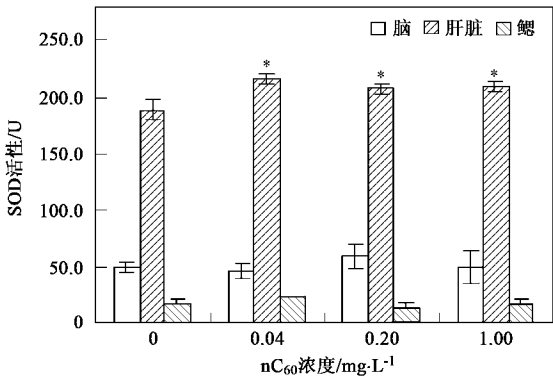


图 3 nC_{60}/aq 对鲫鱼幼鱼不同组织中 SOD 酶活性的影响

Fig.3 Effects of nC_{60}/aq at low concentration on the SOD activities of juvenile *Carassius auratus*

2.4 CAT 的活性变化

SOD 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 作用生成 H_2O_2 和 O_2 , CAT 又可继

续分解 H₂O₂, 从而降低体内 H₂O₂ 的浓度, 起到保护机体免受活性氧物质伤害的作用。

暴露 32 d 后, 鲫鱼幼体不同组织中 CAT 活性的变化见图 4。由图 4 可见, 不同组织中 CAT 活性差异巨大, 肝脏组织中 CAT 活性最高, 是其他组织中 CAT 活性的 100 倍以上。不同浓度的暴露组鲫鱼幼鱼脑组织中的 CAT 活性与对照相比没有显著变化 ($p > 0.05$), 说明低浓度 nC₆₀/aq 暴露对脑组织 CAT 没有明显激活作用。肝脏组织中的 CAT 活性最敏感, 0.04 mg·L⁻¹ nC₆₀/aq 暴露能极显著诱导 CAT 活性上升 ($p < 0.01$), 当 nC₆₀/aq 浓度 ≥ 0.20 mg·L⁻¹ 时, 酶活性开始下降, 到 1.0 mg·L⁻¹ 时酶活性与对照相比没有显著差异 ($p > 0.05$), 结合上述 GSH (图 2) 和 SOD (图 3) 的分析, 可推测此浓度下自由基已开始在鱼体内积累, 并且随着量的增多, 开始攻击酶蛋白使 CAT、SOD 和 GSH 受到不同程度的抑制。鳃组织中 CAT 活性变化不同于脑组织和肝脏组织, 0.04 mg·L⁻¹ 浓度组的 CAT 活性与对照组相比无显著性差异, 说明 0.04 mg·L⁻¹ 的低浓度污染对 CAT 没有明显激活作用。从 0.20 mg·L⁻¹ 开始, nC₆₀/aq 对鲫鱼幼鱼鳃组织 CAT 活性表现出了显著的诱导作用 ($p < 0.01$), CAT 活性开始被激活, 到 1.0 mg·L⁻¹ 浓度组 CAT 活性开始下降, 但仍然比对照组高, 反映了氧自由基在鳃组织内的增多, 但还不足以使 CAT 产生中毒性反应, 这可能是由于别的抗氧化防御机制参与作用, 如可从图 2 看到, 此时鳃组织 GSH 进一步发生耗竭。实验结果进一步表明, 不同组织对污染暴露的应激方式各异, 抗氧化能力也不同, 低浓度的 nC₆₀/aq 长期暴露能导致鲫鱼幼鱼肝脏组织产生氧化应激, 受到氧化伤害。

2.5 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的变化

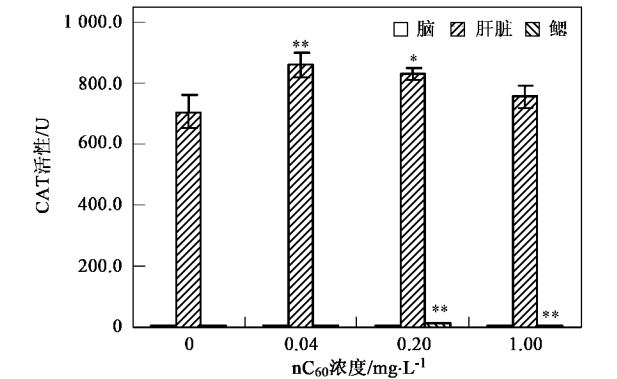


图 4 nC₆₀/aq 对鲫鱼幼鱼不同组织中 CAT 酶活性的影响
Fig. 4 Effects of nC₆₀/aq at low concentration on the CAT activities of juvenile *Carassius auratus*

Na⁺-K⁺-ATP 酶是生物体内重要的代谢酶之一, 是镶嵌在膜上的一种蛋白酶, 也是膜上主动转运离子泵的重要组成部分^[17], 它的主要功能是维持细胞质膜的离子通透性, 保持细胞内环境中各种离子浓度的相对稳定以及细胞内环境与体外环境的渗透压平衡。鲫鱼幼体不同组织中, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性大小不一致, 鱼鳃组织内 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性相对最高, 是其他组织好几倍 (图 5)。图 5 显示了 32 d nC₆₀/aq 暴露对鲫鱼幼鱼不同组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响。可见, 随着 nC₆₀/aq 暴露浓度的增加, 脑组织中 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性变化与对照相比没有显著差异 ($p > 0.05$), 表明低浓度 (≤ 1.0 mg·L⁻¹) nC₆₀/aq 暴露不足以影响脑组织中的细胞内稳态。0.04 mg·L⁻¹ nC₆₀/aq 能显著抑制肝脏组织中 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性, 但是随着浓度的增加, 酶活性恢复到正常水平, 这可能是鱼体肝脏组织内抗氧化系统发挥解毒功能的原因。鳃组织内 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性较高, 对 nC₆₀/aq 的暴露也比较敏感, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性在 0.20 mg·L⁻¹ 时被激活 ($p < 0.05$), 表明鳃组织细胞膜受到损伤, 影响到鱼体内的离子平衡。随着浓度的增加, 到 1.0 mg·L⁻¹ 时酶活性又开始下降, 联系此时鳃组织内 GSH 含量的不断消耗 (图 2), 可推测鱼体自我调节能力下降, 鳃组织损伤较重, 导致细胞膜的生理功能减弱。

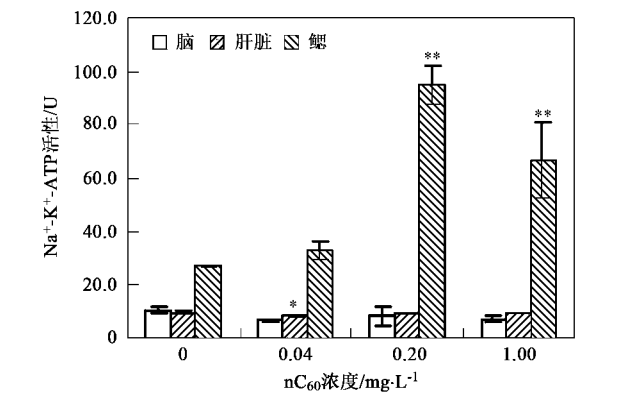


图 5 nC₆₀/aq 对鲫鱼幼鱼不同组织中 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响
Fig. 5 Effects of nC₆₀/aq at low concentration on the Na⁺-K⁺-ATPase activities of juvenile *Carassius auratus*

3 讨论

实验发现, 不同组织对 nC₆₀/aq 暴露胁迫的应激方式各异, 抗氧化能力也不同。脑组织中主要的解毒物质是 GSH, 随暴露浓度的增加 GSH 含量不断降

低,而其他指标没有显著变化,其原因有待进一步研究.Oberdörster 等则发现^[4],黑鲈幼鱼暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{nC}_{60}/\text{THF}$ 48 h,脑组织出现严重的脂质过氧化.两者的差异可能在于制备方法的不同所导致的理化性质的不同.肝脏组织中所有的被测指标都有显著变化,SOD 活性被显著诱导,CAT 活性在低浓度时被诱导,高浓度时活性下降,GSH 持续受到抑制,ATPase 在低浓度时受到抑制,表明肝脏可能是 nC_{60}/aq 毒性作用的重要靶器官之一.鳃组织中 ATPase 酶活性被显著激活,表明鳃组织细胞膜受到损伤.鳃组织内 GSH 含量则随浓度变化表现出降低-回升-降低的趋势,CAT 活性在暴露浓度增大时被激活.在研究 $\text{nC}_{60}/\text{THF}$ 对大嘴黑鲈幼鱼的急性毒性时,也发现在鱼鳃组织中 GSH 的耗竭^[4].因此可推测,鳃组织可能是鱼体最先受到伤害的部位.值得注意的是,各实验组中鲫鱼幼鱼不同组织中的 GSH 含量都发生显著降低,结合肝脏组织中 CAT 和 SOD 活性的诱导,提示长期暴露引起机体组织的氧化应激,可能是 nC_{60}/aq 的致毒机制之一.实际上,由图 2 可见, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nC_{60}/aq 实验组鲫鱼幼鱼各组织内的 GSH 含量均低于对照,处于持续耗竭状态,而 SOD、CAT 酶活性,包括鳃组织内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,则由低浓度的正诱导效应变为负诱导效应,说明 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ nC_{60}/aq 长期暴露下鲫鱼幼鱼机体的抗氧化防御功能已减弱,甚至使某些部位(如鱼鳃)的正常生理功能受到影响.

机体自稳态是正常生理功能的标志,也是机体健康的必须条件.细胞内氧化应激水平升高,会导致机体自稳态的破坏,降低机体的适应性反应,导致细胞正常功能的丧失,最终会导致细胞死亡^[14].实验发现,鳃组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性被显著激活,同时 GSH 含量的不断消耗(图 2),表明组织内抗氧化防御功能的衰竭,过量的氧自由基开始作用于鳃组织细胞膜,导致膜的损伤,使细胞膜生理功能下降,细胞内平衡被打破.陈霖等的研究发现^[18],水溶性富勒烯衍生物(DMA- C_{60})也能产生活性氧物质(ROS),使细胞内钙离子浓度升高,造成细胞膜损伤,加速细胞死亡.上述结果进一步表明,低剂量 nC_{60}/aq 长期污染胁迫下,体外和体内活性氧的产生及其氧化损伤可能是 nC_{60}/aq 致毒的重要机制.

4 结论

首次研究了人工纳米材料进入水体后,低剂量

长期暴露条件下对水生生物(鲫鱼)可能的氧化伤害作用机制,结果发现鲫鱼幼鱼不同组织对低剂量 nC_{60}/aq 暴露胁迫的应激方式各不相同:随暴露浓度的增加,脑组织中 GSH 含量不断降低,而其他指标没有显著变化;肝脏组织中 SOD 活性被显著诱导,CAT 活性在低浓度时被诱导,高浓度时活性下降,GSH 持续受到抑制,ATPase 在低浓度时受到抑制;鳃组织内 GSH 含量则随浓度变化表现出降低-回升-降低的趋势,CAT 和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性在暴露浓度增大时被显著激活.上述结果揭示,长期暴露引起机体组织的氧化应激,使机体抗氧化能力衰竭,应该是 nC_{60}/aq 的致毒机制之一.

参考文献:

- [1] Colvin V L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, **21**(10): 1166-1170.
- [2] US Environmental Protection Agency, National Center for Environmental Research, Science to Achieve Results (STAR) Program; National Science Foundation; National Institute for Occupational Safety and Health. Nanotechnology research grants investigating environmental and human health effects of manufactured nanomaterials: a joint research solicitation[EB/OL]. EPA, NSF, NIOSH. 2004. 09. <http://es.epa.gov/ncer/rfa/2004/2004-manufactured-nano.html>. 2005-02-15.
- [3] 朱小山,朱琳.人工纳米材料生物效应研究进展[J]. *安全与环境学报*, 2005, **5**(4): 86-90.
- [4] Oberdörster E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C_{60}) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, **112**(10): 1058-1062.
- [5] Lyon D Y, Adams L K, Falkner J C, *et al.* Antimicrobial activity of fullerene water suspensions: Effects of preparation method and particle size[J]. *Environmental Science and Technology*, 2006, **40**: 4360-4366.
- [6] Heyman D. Solubility of C_{60} in alcohols and alkanes[J]. *Carbon*, 1996, **34**: 627-631.
- [7] Zhu S Q, Oberdörster E, Haasch M L. Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C_{60}) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow[J]. *Marine Environmental Research*, 2006, **62** (Supplement 1): S5-S9.
- [8] Oberdörster E, Zhu S Q, Blickley T M, *et al.* Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C_{60}) on aquatic organisms[J]. *Carbon*, 2006, **44**: 1112-1120.
- [9] Moore M N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? [J]. *Environment International*, 2006, **32** (8): 967-976.
- [10] Zhu X, Zhu L, Li Y, *et al.* Developmental Toxicity in Zebrafish Embryos After Exposure to Manufactured Nanomaterials: Buckminsterfullerene Aggregates (nC_{60}) and Fullerenol [J].

- Environmental Toxicology and Chemistry, 2007, **26**(5): 976-979.
- [11] Cheng X, Kan A T, Tomson M B. Naphthalene adsorption and desorption from aqueous C_{60} fullerene[J]. Journal of Chemical and Engineering Data, 2004, **49**: 675-683.
- [12] Deguchi S, Alargova R G, Tsujii K. Stable dispersions of fullerenes, C-60 and C-70, in water. Preparation and characterization[J]. Langmuir, 2001, **17**: 6013-6017.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, **72**: 248-254.
- [14] 罗义. 氯酚类和四溴双酚-A 诱导鲫鱼活性氧产生及分子致毒机制的研究[D]. 南京: 南京大学, 2006.
- [15] Di Giulio R T, Washburn P C, Wenning R J, *et al.* Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1989, **8**: 1103-1123.
- [16] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free Radicals in Biology and Medicine[M]. (3rd ed). Oxford University Press, Oxford, UK, 1999.
- [17] 张纪亮, 李瑞霞, 王重刚. 三丁基锡对罗非鱼稚鱼生长和 ATP 酶活力的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, **45**(5): 692-696.
- [18] 陈霖, 杨新林, 彭鲲鹏, 等. 水溶性 C_{60} 衍生物的光致细胞膜毒性的动态研究[J]. 高技术通讯, 2001, **11**(2): 17-20.