

## 纳米硒对斑马鱼胚胎毒性的研究

严旭霞, 傅玲琳, 王彦波\*

(浙江工商大学海洋资源与营养生物学研究中心, 浙江 杭州 310035)

**摘要:** 为研究纳米硒对斑马鱼胚胎毒性大小, 使用光镜和电镜等技术对硒代蛋氨酸和纳米硒进行了比较研究。结果显示, 纳米硒粒子的粒径分布均匀, 平均粒径约 25 nm。纳米硒在斑马鱼受精后 96 和 120 h 的半数致死浓度分别为 7.18 和 5.68  $\mu\text{mol/L}$ ; 而 DL-硒代蛋氨酸在斑马鱼受精后 96 和 120 h 的半数致死浓度分别为 67.32 和 54.66  $\mu\text{mol/L}$ 。此外, 在斑马鱼受精后 120 h, 纳米硒和 DL-硒代蛋氨酸的半数致畸浓度分别为 3.27 和 44.22  $\mu\text{mol/L}$ 。研究表明, 在直接暴露的条件下, 纳米硒的毒性要大于 DL-硒代蛋氨酸。

**关键词:** 斑马鱼; 纳米硒; DL-硒代蛋氨酸; 半数致死浓度; 孵化率

**中图分类号:** S 965

**文献标志码:** A

硒是人和动物所必需的微量元素, 具有重要的生理作用。缺硒可引起畜禽多种疾病, 如鸡的渗出性素质病, 猪的肝脏坏死和牛、羊的肌肉营养不良等, 并可导致生长发育迟缓, 繁殖力下降。但硒的有益剂量和毒性剂量之间范围狭窄, 超过临界浓度则毒性很强, 所以对硒的代谢和改性(modification)研究就显得十分重要, 纳米技术的兴起给我们提供了新的科研思路。20 世纪 60 年代诺贝尔物理奖获得者 Feynman 在美国物理年会上作了极富预见性的报告: 若从原子和分子水平上控制物质, 将会出现新的作用力和新的应用效应。这一阐述启发我们将纳米技术结合应用到水产动物营养研究, 以提高硒等微量元素的生物利用度。研究发现, 纳米硒作为直径小于 100 nm 的粒子<sup>[1]</sup>, 具有特殊的理化性质和低毒的特点, 引起了广泛的关注。近年来, 国内外学者开展了纳米硒在肉鸡、仔猪和小鼠上的应用研究<sup>[2-3]</sup>, 结果表明, 纳米硒与硒代蛋氨酸的生物活性相同, 但相比而言, 纳米硒毒性更低。然而, 尽管亚硒酸钠、酵母硒、硒代蛋氨酸等在水产动物上有应用研究, 但是目

前纳米硒在水生动物中的应用和相关毒性评价研究仍鲜见。斑马鱼(*Danio rerio*)作为一种模式动物, 在科学研究和化学物安全评估中广泛使用, 鉴于此, 本研究以斑马鱼胚胎为实验对象。前期研究已证明, 硒代蛋氨酸在各种硒化合物中具有最佳的生物利用度(bioavailability)<sup>[4]</sup>, 所以本实验以 DL-硒代蛋氨酸作为参比, 研究和评价纳米硒对斑马鱼胚胎的毒性, 旨在为水产动物毒理学理论的扩充奠定基础, 同时也为纳米硒在水产动物营养中的应用奠定理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验材料

实验用产胚胎的成年斑马鱼为 AB 品系, 养殖系统为美国 Aquatic Habitats 公司的全封闭循环系统, 纳米材料的分析和表征采用 Nano-ZS 型激光粒度仪(英国马尔文公司)和 JEM-1230 型透射电子显微镜(日本电子公司), 胚胎观察和计数采用 Nikon SMZ1500 型体式显微镜(上海千欣仪器有限公司)。试剂均为分析纯, 购于上海生物

收稿日期:2013-06-02 修回日期:2013-09-27

资助项目:国家自然科学基金项目(31072221)

通信作者:王彦波, E-mail:wangyb@mail.zjgsu.edu.cn

工程股份有限公司。

## 1.2 实验方法

**纳米硒的制备与表征** 参照 Zhang 等<sup>[5]</sup>的方法进行纳米硒的制备,2 mg 牛血清白蛋白(BSA)加入到 5 mL 含有 20 mmol/L 还原型谷胱甘肽(GSH)和 5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ 的溶液中,调节 pH 到 7.0 ~ 7.5,得到纳米硒,测定粒径并表征。

**斑马鱼胚胎毒性实验** 斑马鱼的养殖环境温度 28 °C,光照周期为 14L:10D。在光照周期里光照的第 1 个小时内收集胚胎,弃去未受精和发育不良的胚胎以及粪便等杂质,剩余的胚胎清洗后加入培养液,放入光照培养箱中培养至约 6 hpf (hours post-fertilization, hpf),在体式显微镜下挑选发育正常的受精胚胎备用。

参照 Ma 等<sup>[6]</sup>的方法进行硒浓度的初次设定和预实验,结合预实验设定纳米硒的浓度梯度为 0、2、4、6、8 和 10  $\mu\text{mol/L}$ ,DL-硒代蛋氨酸的浓度梯度为 0、20、40、60、80 和 100  $\mu\text{mol/L}$ 。将挑选得到的胚胎进行暴露处理,无菌 96 孔细胞培养板每孔中分别加入 200  $\mu\text{L}$  含有不同浓度和形态硒的培养液,每排(12 个孔)为 1 个重复,每个处理设 3 个重复,每孔中随机放入一个健康胚胎。为了避免溶剂蒸发改变硒的浓度,96 孔板用保鲜膜封好,放入 28 °C 光照培养箱进行培养。接着连续观察 5 d,每天记录胚胎的情况,包括死亡、畸形、孵化等现象,实验期间不换水。

统计每个处理组在 96 和 120 hpf 的胚胎死亡率以及在 120 hpf 的胚胎畸型率。死亡率/% = 死亡胚胎数/实验胚胎数  $\times 100$ ,畸型率/% = 畸型胚胎数/实验胚胎数  $\times 100$ ,其中畸型胚胎数为各种畸型累计值,用 SPSS 软件进行分析,并用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,得到纳米硒与 DL-硒代蛋氨酸的半数致死浓度( $\text{LC}_{50}$ )和半数致畸浓度( $\text{TC}_{50}$ )。

## 2 结果

### 2.1 纳米硒的制备与表征

纳米硒平均粒径约 25 nm(图 1),纳米硒粒子分布均匀(图 2)。

### 2.2 斑马鱼毒性实验

2 种硒溶液毒性 $\text{LC}_{50}$ 和 $\text{TC}_{50}$  通过光镜观

察,实验过程中可见不同浓度硒溶液暴露条件下斑马鱼胚胎产生的典型畸型(图 3),其中包括体轴弯曲(AM)、心包水肿(PE)、卵黄囊水肿(YES)、游囊膨胀不全(USB)等。

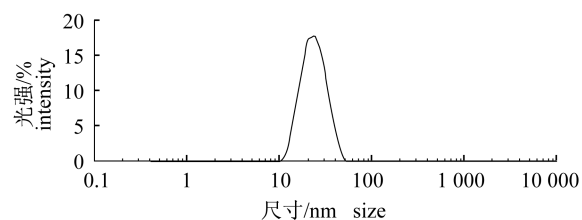


图 1 硒纳米粒子粒径分布

Fig. 1 The size distribution of nano-selenium

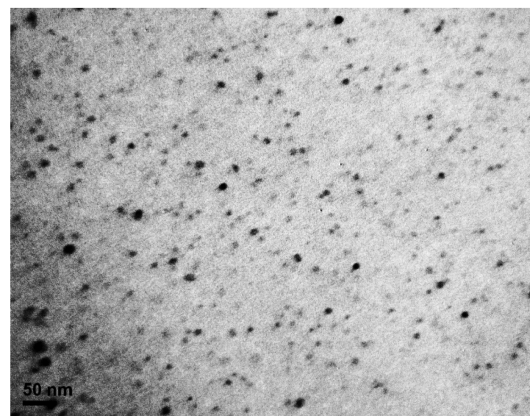


图 2 纳米硒粒子的透射电子显微观察

Fig. 2 TEM micrograph of nano-selenium

斑马鱼胚胎在纳米硒和 DL-硒代蛋氨酸溶液中孵育至 96 和 120 hpf 时,统计每个浓度下的死亡率。畸型胚胎数的统计是累计畸型率,在 120 hpf 时为全部畸型数与死亡个数的总和,从而得到相应的畸型率。从图 4 和图 5 可以看出,随着硒浓度及作用时间的增加,纳米硒和硒代蛋氨酸导致斑马鱼死亡的胚胎数以及畸型的胚胎数都呈现增加趋势,通过计算得出纳米硒在 96 hpf 的 $\text{LC}_{50}$ 为 7.18  $\mu\text{mol/L}$ ,在 120 hpf 的 $\text{LC}_{50}$ 为 5.68  $\mu\text{mol/L}$ ;DL-硒代蛋氨酸在 96 hpf 的 $\text{LC}_{50}$ 为 67.32  $\mu\text{mol/L}$ ,在 120 hpf 的 $\text{LC}_{50}$ 为 54.66  $\mu\text{mol/L}$ 。此外,在 120 hpf 时纳米硒的 $\text{TC}_{50}$ 为 3.27  $\mu\text{mol/L}$ ,而 DL-硒代蛋氨酸的 $\text{TC}_{50}$ 为 44.22  $\mu\text{mol/L}$ 。

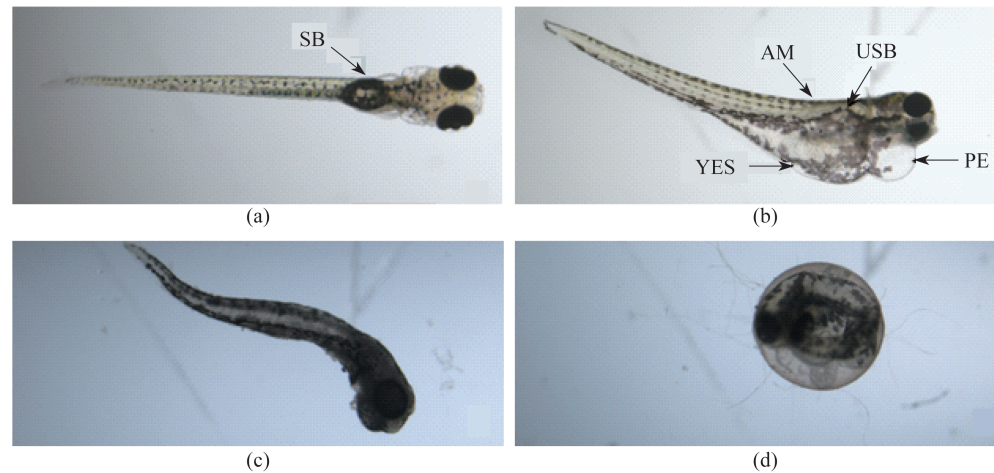


图3 纳米硒致斑马鱼胚胎的主要畸型表型

(a)对照组:在120 hpf时,大部分斑马鱼胚胎可以明显地观察到游囊呈现打开状态,没有可观察到的畸型表型;(b)硒处理组:斑马鱼胚胎中可以明显观察到各种畸型表型的胚胎,包括体轴弯曲(AM)、心包水肿(PE)、卵黄囊水肿(YES)、游囊膨胀不全(USB)等;(c)硒处理组:一部分胚胎孵化后死亡;(d)硒处理组:一部分胚胎无法孵化而死亡

Fig.3 Nano-selenium induced the main phenotype of zebrafish embryos

(a) control: at 120 hpf, most of zebrafish embryos inflated the swim bladder successfully. No abnormal phenotype was observed; (b) selenium treatment: Abnormal phenotypes were observed obviously in parts of zebrafish embryos, such as axial malformation (AM), pericardial edema (PE), yolk-sac edema (YSE), uninflated the swim bladder (USB), etc; (c) selenium treatment: Parts of zebrafish embryos died after hatching; (d) selenium treatment: Parts of zebrafish embryos died before hatching

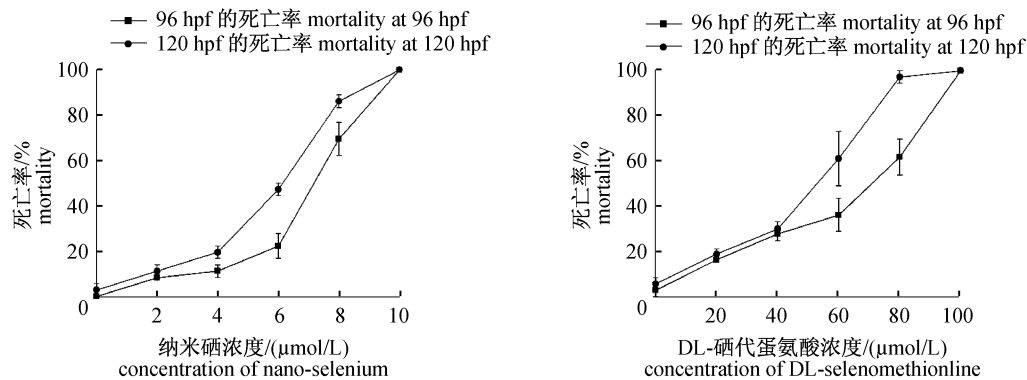


图4 纳米硒和 DL-硒代蛋氨酸诱导斑马鱼胚胎至 96 和 120 hpf 的致死曲线

Fig.4 Zebrafish embryos' concentration-mortality relationship by exposure in nano-selenium and DL-selenomethionine at 96 and 120 hpf, respectively

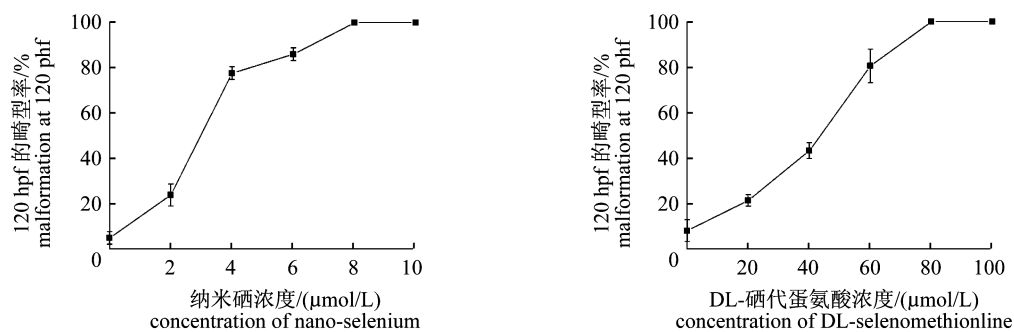


图5 纳米硒和 DL-硒代蛋氨酸诱导斑马鱼胚胎至 120 hpf 的致畸曲线

Fig.5 Zebrafish embryos' concentration- malformation relationship by exposure in nano-selenium and DL-selenomethionine at 120 hpf

### 3 讨论

硒在动物的多种生理活动中扮演着重要的角色,其毒性往往依赖其化学形式、种类以及动物自身的生理状态、营养水平等<sup>[7]</sup>。纳米硒作为一种新型硒的形式受到了广泛的关注,与其他形式的硒比较,纳米硒 LD<sub>50</sub>更高,更加安全。

本实验得出的结果显示纳米硒对斑马鱼胚胎的 LC<sub>50</sub>(96 和 120 hpf)均比有机硒(DL-硒代蛋氨酸)小,此外在 120 hpf 时,纳米硒的 TC<sub>50</sub>也显著减少。这个结果与大部分实验结果相反,究其原因,其他动物实验中所得到的 LD<sub>50</sub>(半数致死剂量),一般是通过灌胃<sup>[4]</sup>、日粮添加<sup>[3]</sup>等处理方式,而本实验是通过在胚胎的培养液中添加不同浓度的硒来开展。本实验中的半数致死浓度是衡量存在于水中的不同形式的硒对斑马鱼胚胎毒性大小的重要参数,结果显示其致死效应与受试动物斑马鱼胚胎暴露时间有着密切关系,不同的暴露时间会使不同总量的硒进入到斑马鱼胚胎,从而产生相应的致死效应。无机硒和有机硒具有不同的吸收特征和代谢途径<sup>[8]</sup>,而纳米硒作为纳米粒子的一种,具有纳米粒子特殊的理化性质<sup>[2]</sup>,所以纳米硒的吸收特征可能既不同于普通的无机硒,也不同于有机硒,需要进一步的验证。Li 等<sup>[7]</sup>以青鳉(*Oryzias latipes*)为实验动物,开展了纳米硒和无机硒的毒性实验,结果因为纳米硒具有更高的体内聚积性而具有更强的毒性,其 LC<sub>50</sub>小于无机硒,与本实验的结果相吻合,这也在 TC<sub>50</sub>的结果中得到了进一步证实。同时,王华丽<sup>[4]</sup>用相同硒含量的不同粒径的纳米硒进行小鼠灌胃研究,结果显示,尽管不同粒径的纳米硒处理之间无显著性差异,但小尺寸的纳米硒较中尺寸和大尺寸的纳米硒具有更强的肝脏积累趋势。研究表明,硒化氢是硒在动物体内硒甲基化代谢的一个关键的中间物<sup>[9]</sup>,其毒性要比氰化氢大 100 倍<sup>[10]</sup>,本实验所用的纳米硒平均粒径为 25 nm,属于小尺寸的纳米硒粒子,这也可能因为在相同的时间内更多的纳米硒进入了斑马鱼胚胎中,促进了硒的甲基化代谢,从而产生了更多的中间产物硒化氢,使其毒性进一步增强,并且硒化氢的积累可能会产生其他一些与硒相关的不利影响<sup>[9]</sup>。

硒中毒已经在不同动物试验中进行了研究,

而生长延迟被认为是动物硒中毒的一个主要特征,本实验结果也证实了这一点。究其原因因为硒调节减少了生长激素和生长调节素 C 的产生,以及降低了胰岛素样生长因子结合蛋白和胰岛素样生长因子-I 的合成来延缓动物生长<sup>[11]</sup>。研究表明<sup>[12]</sup>,48 ~ 72 h 是斑马鱼胚胎发育的孵化期,胚胎在这段时期里陆续孵化。Ma 等<sup>[6]</sup>用不同浓度的亚硒酸钠处理斑马鱼胚胎,结果显示硒暴露会影响斑马鱼胚胎发育率,并且影响其生长发育。与本实验中观察到的随着纳米硒浓度的升高,孵化率呈现明显的下降趋势相吻合。而在日本鹌鹑(*Coturnix japonica*)上的研究同样发现,相对高剂量的硒喂食母鹌鹑也会降低其受精蛋的孵化率<sup>[13]</sup>。

研究发现,在低硒浓度下,硒在生物体内扮演着微量营养素的角色,合成一系列必需的化合物<sup>[10]</sup>,而硒已知的生理生化功能是通过至少 13 种以硒代半胱氨酸形式结合的硒蛋白来行使的,硒能够代替蛋氨酸中的硫来合成其类似物,即硒代蛋氨酸<sup>[9]</sup>。但当细胞中有一个更高的硒浓度时,过量的硒还将发生一些其他的反应。细胞中的硒化物能够和氨基酸上可利用的硫形成暂时的价键,这些氨基酸随后合成到各种酶和蛋白上。由于硒化物的结合改变了这些蛋白的三级结构,它们将不能行使其正常的功能<sup>[10]</sup>。并且动物不能将硒代蛋氨酸与蛋氨酸区分开来,也将合成大量的含硒蛋白,这些过量硒模拟含硫酶和含硫结构蛋白的存在可能导致动物胚胎畸型和胚胎毒性<sup>[9]</sup>。在本实验的硒处理组斑马鱼胚胎发生了体轴弯曲、心包水肿、卵黄囊水肿和游囊膨胀不全等畸型表型。Usami 等<sup>[14]</sup>用硒处理鼠胚胎,所有胚胎也都表现出形态异常甚至畸型。进一步说明本实验得到纳米硒对斑马鱼胚胎孵化率的影响也可能是影响了斑马鱼胚胎的发育从而导致了孵化率的下降。

纳米硒是单质硒,属于特殊的无机硒。无机硒可以在动物体内转化成有机硒,从而进行下一阶段的硒代谢。研究表明,甲硒醇是硒-甲基硒代半胱氨酸和硒代蛋氨酸在体内代谢的可能硒代谢产物<sup>[15]</sup>,并已有研究表明甲硒醇通过氧化应激损伤线粒体,产生细胞色素 C 释放到胞质中,从而激活半胱天冬酶级联反应和细胞凋亡<sup>[16]</sup>。本研究表明,在直接暴露的条件下,纳米硒的毒性要

大于 DL-硒代蛋氨酸。Li 等<sup>[7]</sup> 的研究也同样发现,水环境中添加相同浓度硒,纳米硒在青鳉体内也有一个更高的聚集性。鉴于此,纳米硒毒性要大于 DL-硒代蛋氨酸的另一个可能原因是高浓度硒促进产生了更多硒代谢产物甲硒醇,从而促进了细胞凋亡。当然,具体确切的作用机制还需要深入研究。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, *et al.* Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital cranial nerve systems[ J ]. *Journal of Health Science*, 2009, 55(1) : 95 - 102.
- [ 2 ] 王亮,单安山. 纳米硒在动物营养中的研究进展 [ J ]. *中国畜牧兽医*, 2011, 38(4) : 38 - 42.
- [ 3 ] Zhou X, Wang Y. Influence of dietary nano elemental selenium on growth performance, tissue selenium distribution, meat quality, and glutathione peroxidase activity in Guangxi Yellow chicken[ J ]. *Poultry Science*, 2011, 90(3) : 680 - 686.
- [ 4 ] 王华丽. 纳米硒的生物利用和毒性研究[ D ]. 合肥: 中国科学技术大学, 2007.
- [ 5 ] Zhang J, Wang H, Bao Y, *et al.* Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of selenoenzymes in both cultured cells and mice [ J ]. *Life Sciences*, 2004, 75(2) : 237 - 244.
- [ 6 ] Ma Y, Wu M, Li D, *et al.* Embryonic developmental toxicity of selenite in zebrafish (*Danio rerio*) and prevention with folic acid [ J ]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(8) : 2854 - 2863.
- [ 7 ] Li H, Zhang J, Wang T, *et al.* Elemental selenium particles at nano-size ( nano-Se ) are more toxic to Medaka (*Oryzias latipes*) as a consequence of hyperaccumulation of selenium; A comparison with sodium selenite [ J ]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 89 ( 4 ) : 251 - 256.
- [ 8 ] Wang Y, Fu L. Forms of selenium affect its transport, uptake and glutathione peroxidase activity in the Caco-2 cell model [ J ]. *Biological Trace Element Research*, 2012, 149(1) : 110 - 116.
- [ 9 ] Spallholz J E, Hoffman D J. Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds[ J ]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 57(1 - 2) : 27 - 37.
- [ 10 ] Davis E A, Maier K J, Knight A W. The biological consequences of selenium in aquatic ecosystems[ J ]. *California Agriculture*, 1988, 42(1) : 18 - 20, 29.
- [ 11 ] Zhang J, Wang H, Yan X, *et al.* Comparison of short-term toxicity between nano-Se and selenite in mice[ J ]. *Life Sciences*, 2005, 76(10) : 1099 - 1109.
- [ 12 ] Kimmel C B, Ballard W W, Kimmel S R, *et al.* Stages of embryonic development of the zebrafish [ J ]. *Developmental Dynamics*, 1995, 203 ( 3 ) : 253 - 310.
- [ 13 ] Wilaison S, Mori M. Effect of selenium on hatchability and cellular glutathione peroxidase mRNA expression during embryogenesis in Japanese quail (*Coturnix japonica*) [ J ]. *Journal of Poultry Science*, 2009, 46(4) : 340 - 344.
- [ 14 ] Usami M, Mitsunaga K, Nakazawa K, *et al.* Proteomic analysis of selenium embryotoxicity in cultured postimplantation rat embryos [ J ]. *Birth Defects Research-Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 2008, 83(2) : 80 - 96.
- [ 15 ] Spallholz J E, Palace V P, Reid T W. Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an *in vitro* chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids [ J ]. *Biochemical Pharmacology*, 2004, 67(3) : 547 - 554.
- [ 16 ] Miki K, Xu M, Gupta A, *et al.* Methioninase cancer gene therapy with selenomethionine as suicide prodrug substrate [ J ]. *Cancer Research*, 2001, 61 ( 18 ) : 6805 - 6810.

## Toxicity evaluation of nano-selenium on zebrafish embryos

YAN Xuxia, FU Linglin, WANG Yanbo\*

(Marine Resources and Nutrition Biology Research Center, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China)

**Abstract:** Selenium is an essential trace element for humans and animals, involved in diverse physiological actions. Thus, different forms of selenium have been developed for future application. To evaluate the toxicity of nano-selenium on zebrafish (*Danio rerio*) embryos, the light and electron microscopic techniques were used in the present study with two different forms of selenium including DL-selenomethionine and nano-selenium. According to the laser particle size analyzer and electron microscope, the size distribution of nano-selenium particle was uniform. In addition, an average particle size of nano-selenium was about 25 nm. The results showed that the values of median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of nano-selenium at 96 hours post-fertilization (hpf) and 120 hpf, were 7.18 and 5.68  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. However, as for the treatment of DL-selenomethionine, the corresponding values of  $LC_{50}$  at 96 and 120 hpf, were 67.32 and 54.66  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. In addition, most of zebrafish embryos inflated the swim bladder successfully at 120 hpf in the groups treated without selenium. However, as for the zebrafish embryos treated with selenium at certain concentrations, abnormal phenotypes were observed in the present study such as axial malformation (AM), pericardial edema (PE), yolk-sac edema (YSE) and uninflated the swim bladder (USB). Parts of zebrafish embryos were even found dead before and/or after hatching. Through the statistical analysis of the data, the median teratogenic concentration ( $TC_{50}$ ) of nano-selenium and DL-selenomethionine was 3.27 and 44.22  $\mu\text{mol/L}$ , respectively at 120 hpf. It indicated that the toxicity of nano-selenium was significantly higher than that of DL-selenomethionine when treated indirectly on zebrafish embryos. The related mechanism should be studied in the future research. The present study was to present the related basis foundation and information for the safe application of nano-selenium particles and extend the corresponding toxicology theory for aquatic animals.

**Key words:** *Danio rerio*; nano-selenium; DL-selenomethionine;  $LC_{50}$ ; hatching rate

**Corresponding author:** WANG Yanbo. E-mail: wangyb@mail.zjgsu.edu.cn