

纳米氧化锌对斑马鱼肠组织的氧化损伤

刘 林, 赵群芬*, 朱帅旗, 许 峰

(宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211)

摘要:为探讨纳米氧化锌颗粒(ZnO-NPs)对斑马鱼肠组织的损伤及损伤机理,研究了 ZnO-NPs 对肠组织结构、抗氧化酶活性及相关凋亡基因表达的影响。将斑马鱼分别暴露于浓度为 0、0.05、0.1、5、10、25 和 50 mg/L 的 ZnO-NPs 水体中,在 4、24 和 96 h 时,用比色法测定了肠组织中丙二醛(MDA)含量、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性;用实时荧光定量法测定了 *Bcl-2*、*Bax*、*p53* 和 *MDM2* mRNA 表达水平的变化;在第 7、15 和 30 天时用 H.E 染色技术观察了肠组织解剖结构变化。与对照组相比,实验组结果显示:斑马鱼肠中的 MDA 含量均高于对照组;随着时间的延长,组织中 GSH-PX 和 GST 活性呈先升高后下降的趋势;肠组织中 *Bax/Bcl-2* 和 *p53* 的 mRNA 的表达量均升高,而 *MDM2* 的 mRNA 表达量则随着时间的延长和浓度的增加表现为先降低后升高;H.E 染色观察到肠组织结构发生变化,表现为杯状细胞增多,肿胀变形,部分细胞质空泡化,肠中淋巴细胞增多,肠绒毛侵蚀变形,且有时间和浓度依赖性。结果表明:ZnO-NPs 能诱导斑马鱼肠组织产生氧化应激作用,使组织中抗氧化酶活性发生变化,诱导肠中细胞凋亡相关基因的表达,并且能对肠组织结构造成损伤。

关键词: 斑马鱼; ZnO-NPs; 肠组织; 氧化损伤

中图分类号: S 917.4; X 171.5

文献标志码: A

纳米材料是由粉末或块状天然或人工材料颗粒组成的,是基本颗粒的三维空间中至少有一维处于纳米尺度范围超精细颗粒材料的总称,纳米颗粒使用量占整个材料的所有使用颗粒总数的 50% 以上。每年纳米材料的使用量正在以数百吨的速度增加^[1],早在 2006 年,Science 和 Nature 上就有学者提出了纳米材料存在生态风险的问题^[2-3]。随着纳米材料的使用,纳米颗粒对人类健康和环境安全的影响也随之增加,因此,评估纳米材料的生物性安全是十分必要的^[4]。

肠道不仅在消化吸收营养物质过程中发挥着重要作用,而且是集内分泌、免疫和屏障等功能为一体的重要器官。肠道的健康水平决定了动物的健康状况^[5]。灌胃中剂量的锌能造成大鼠(*Rattus norvegicus*)小肠黏膜肠细胞高度水肿,使膜性结构的脂质双分子层的生理性稳态和细胞表

面的糖蛋白含量发生改变,甚至能对细胞器造成破坏,最终导致细胞代谢停止、功能丧失,细胞死亡^[6]。Ito 等^[7]在研究口服微囊毒素对小鼠(*Mus musculus*)的毒害中发现,微囊毒素能使肠绒毛顶端受到严重损坏,并且存在于小肠和大肠的杯状细胞分泌的黏液中,说明毒物能在肠内累积,并能对肠组织造成损伤。还有研究报道,纳米铁能使虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)肠组织上皮细胞肿胀,影响肠的消化功能,甚至使肠组织中毒^[8],说明当有外源物质进入生物体内时,使肠组织受到明显的应激效应,甚至会造成肠组织结构的变化。

纳米氧化锌(ZnO-NPs)因具有荧光性、吸收和散射紫外线等理化性质,广泛应用于生产和生活中^[9]。在生产和使用 ZnO-NPs 时,不可避免地释放到环境中,从而给环境造成潜在的风险^[10]。随着 ZnO-NPs 的大量使用,其对生物的毒性报道

收稿日期:2015-05-04 修回日期:2015-07-13

资助项目:水产学浙江省重中之重(一级)学科开放基金(xkzsc1415)

通信作者:赵群芬,E-mail:zhaqunfen@nbu.edu.cn

也越来越多。Zhu 等^[10]指出 ZnO-NPs 可能会对长期暴露于其下的水生生物消化道产生毒性作用,进而降低摄食率,影响机体正常机能。熊道文等^[11]也曾报道 ZnO-NPs 能引起斑马鱼 (*Danio rerio*) 肠组织中超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量变化,但未观察到氧化损伤。有关 ZnO-NPs 对肠毒性的研究,多停留于现象观察或生理水平上的检测,缺乏 ZnO-NPs 对肠组织毒性机制的全面研究。本研究选择斑马鱼为受试对象,通过研究暴露于不同浓度 ZnO-NPs 下成年斑马鱼肠组织结构的变化、抗氧化酶活性和凋亡基因的相对表达量的影响,探讨 ZnO-NPs 暴露对斑马鱼肠的毒害机制,对评估 ZnO-NPs 肠毒性及其水生生态风险具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

斑马鱼购于宁波市天胜花鸟市场,鱼龄 120 d 左右,平均体质量 (0.35 ± 0.1) g, 平均体长 (3.2 ± 0.4) cm, 水温 (26 ± 0.5) °C, 驯养 1 周后用于毒理实验(驯养期间无斑马鱼死亡), 驯养用水为自来水曝气 12 h, 光照/黑暗周期为 14 h: 10 h, 每日投食 2 次, 实验期间不断充氧。

ZnO-NPs [(25 ± 2) nm]: 购于杭州大洋纳米新材料有限公司, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Tli RNaseH Plus)、RNAiso Plus 试剂盒(购于 TaKaRa), 丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 测定试

剂盒购于南京建成生物研究所。

1.2 实验方法

将健康的斑马鱼分别暴露于浓度为 0、0.05、0.1、5、10、25 和 50 mg/L 的 ZnO-NPs 溶液中, 每组 3 个平行, 暴露实验参照 GB/T 13276 - 1991^[12], 分别在 4、24 和 96 h 时取各组斑马鱼的肠组织, 取少量肠组织加入 RNA 保护液, -80 °C 保存, 用于 RNA 提取。剩余肠组织加入预冷的匀浆介质 (0.01 mol/L Tris-HCl、0.001 mol/L EDTA-2Na、0.01 mol/L 蔗糖, pH 7.4) 研磨, 3 000 r/min 离心, 取上清液, 用于生理指标的测定。另取 7、15 和 30 d 的肠组织, 10% 的甲醛中固定 24 h 后, 用于石蜡切片的制作。

组织形态学观察 取固定于甲醛中的肠组织, 酒精梯度脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片机切片, 烤片, H. E 染色, 中性树胶封片, Olympus 显微镜观察并拍照。

抗氧化指标的测定 采用考马斯亮蓝法对上清液样品中总蛋白含量进行测定; MDA 含量、GST、GSH-PX 活性测定均按试剂盒说明书操作。

组织 RNA 的提取和细胞凋亡基因的检测

用 RNAiso Plus 试剂对肠组织进行 RNA 提取, mRNA 的反转录按 Prime Script[™] RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa 公司) 说明书操作; 利用 RT-PCR, 以 β -actin 为内参基因, 对 *Bcl-2*、*Bax*、*p53*、*MDM2* mRNA 的表达量进行检测, 引物的合成由上海生工有限公司完成, 用 premier 5.0 软件, 设计各个基因引物(表 1), 采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法分析荧光定量结果^[13]。

表 1 real-time PCR 所用的引物
Tab. 1 Primers sequences used for real-time PCR

基因 gene	基因编号 genetic code	正向引物 5'-3' forward primer 反向引物 5'-3' reverse primer	退火温度 / °C annealing temperature
<i>β-actin</i>	NM_131031.1	ACCACCACAGCCGAAAGAG (F) GGCAACGGAAACGCTCA (R)	56
<i>Bcl-2</i>	NM_001030253.2	ATGTGCGTGAAAGCGTCAAC (F) GAAGGCATCCCAACCTCCATT (R)	56
<i>p53</i>	NM_001271820.1	GGGCAGGGAGCGTTATGA (F) AGAGTCGCTTCTTCCTTCGTC (R)	56
<i>MDM2</i>	AF010255.1	CCGACGCCTCCACTTCTC (F) ATAAGGTGCCAGTCCTTCC (R)	56
<i>Bax</i>	AF231015.1	CGATACGGGCAGTGGA (R) TCGGCTGAAGATTAGAGTTGTTT (F)	56

1.3 实验数据的处理

用 SPSS19.0 统计分析软件进行数据统计, 并进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 采用 Tukey's test 多重比较; $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 ZnO-NPs 对斑马鱼肠组织结构的影响

对照组 (图版 a-1, a-2, a-3) 斑马鱼肠组织结构完整, 肠组织结构可分为黏膜层、黏膜下层、肌层和浆膜层。肠黏膜上皮由单层柱状上皮细胞和杯状细胞构成, 杯状细胞 H. E 染色呈空泡化, 柱状细胞呈柱状, 单层排列; 15 d 的对照组 (图版 a-2) 能清晰见到中央乳糜管, 且其附近有淋巴细胞存在。与对照组相比, 最低浓度组 (0.05 mg/L) 在处理 7 d 时杯状细胞增多 (图版 b-1, b-2, b-3), 随着暴露浓度的增加和时间的延长, 0.1 mg/L 组和 5 mg/L 组在 15 d (图版 c-2、d-2), 其余各组在 30 d 时也表现为杯状细胞增多 (图版 c-3, d-3, e-3, f-3, g-3)。各实验组在处理 15 d 时杯状细胞开始肿胀变形 (图版 b-2, c-2, d-2, e-2, g-2), 其中除了浓度为 0.05 和 0.1 mg/L 组外, 其他各实验组还观察到部分细胞细胞膜受损, 细胞核消失, 细胞空泡化 (图版 d-2, e-3, g-1), 在 25 mg/L 组发现肠中淋巴细胞增多 (图版 f-1, f-2), 肠绒毛侵蚀变形 (图版 f-1)。

2.2 ZnO-NPs 对斑马鱼肠中抗氧化酶活性的影响

实验组肠中 MDA 含量均高于对照组; 暴露 4 和 24 h, 10 mg/L 组 MDA 含量极显著增加 ($P < 0.01$), 达到最大, 分别为对照组的 3.5 和 5 倍; 处理 96 h 时, 浓度为 0.1 mg/L 组 MDA 含量极显著增加 ($P < 0.01$), 是对照组的 4 倍, 达到最大 (图 1)。

不同浓度 ZnO-NPs 处理 4 h, GSH-PX 活性极显著增加 ($P < 0.01$), 10 mg/L 组 GSH-PX 活性达最大, 是对照组的 2.96 倍; 暴露 24 h, 在 10 mg/L 时 GSH-PX 活性极显著增加 ($P < 0.01$), 是对照组的 2.23 倍; 其他高浓度组 (25 和 50 mg/L) 肠中 GSH-PX 活性略有升高 ($P > 0.05$); 处理 96 h, 肠中 GSH-PX 活性均下降, 但未达到显著水平 ($P > 0.05$) (图 2)。

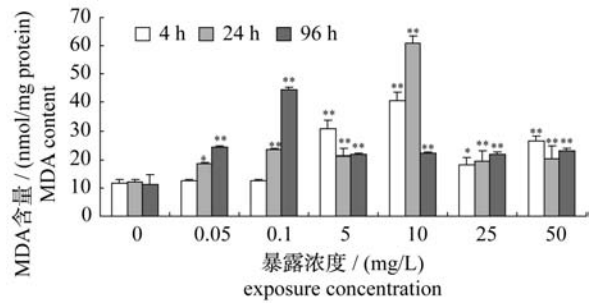


图 1 斑马鱼肠中 MDA 含量的变化

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 下同

Fig. 1 Changes of MDA content in zebrafish intestine
“*” indicates significant differences among treatments ($P < 0.05$), “**” indicates significant differences among treatments ($P < 0.01$), the same as below

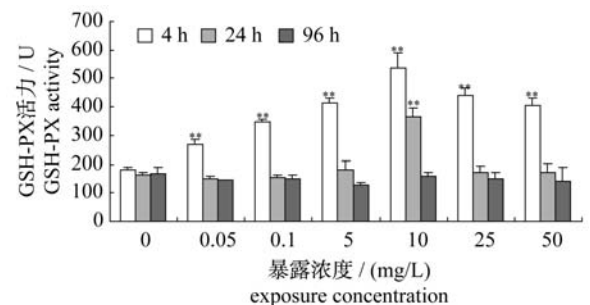


图 2 斑马鱼肠中 GSH-PX 活性的变化

Fig. 2 Changes of GSH-PX activity in zebrafish intestine

处理 4 和 24 h, 实验组斑马鱼肠中 GST 活性均升高 (除处理 4 h 时 0.05 mg/L 组), 处理 4 h, 50 mg/L 组 GST 活性最大, 是对照组的 2.19 倍; 处理 24 h, 0.1 mg/L 组 GST 活性极显著升高 ($P < 0.01$), 是对照组的 1.98 倍; 处理 96 h, 低浓度组 (0.05、0.1 mg/L) GST 活性极显著升高 ($P < 0.01$), 其余实验组 GST 活性均下降, 且在 5 mg/L 时 GST 活性极显著下降 ($P < 0.01$), 是对照组的 75% (图 3)。

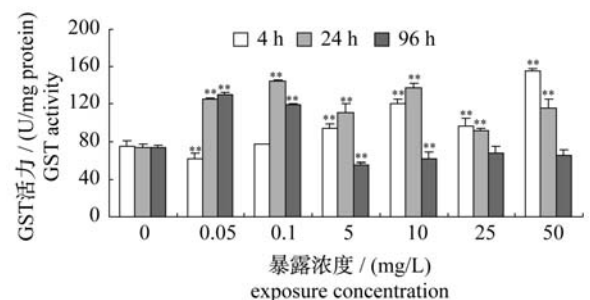


图 3 斑马鱼肠中 GST 活性的变化

Fig. 3 Changes of GST activity in zebrafish intestine

2.3 ZnO-NPs 对斑马鱼肠中凋亡基因的影响

肠中 *p53* mRNA 表达量均高于对照组。不同浓度组,在处理 4 和 24 h 时,浓度为 10 mg/L 组 *p53* mRNA 表达量最大,分别是对照组的 2.04 和 1.78 倍;处理 96 h 时,浓度为 5 mg/L 时 *p53* mRNA 表达量最大,是对照组的 2.33 倍(图 4)。

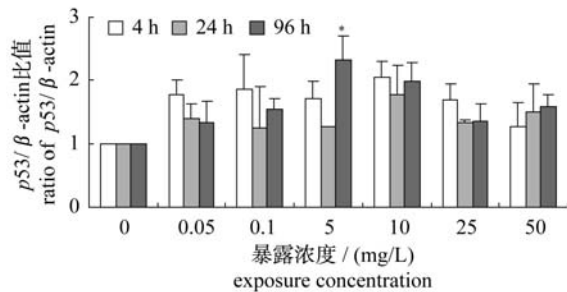


图 4 ZnO-NPs 对斑马鱼肠中 *p53* 基因的影响

Fig. 4 Effects of the ZnO-NPs on *p53* in zebrafish intestine

处理 4 和 24 h,低浓度组(0.05、0.1、5 mg/L)肠中 *MDM2* 表达量下降,而高浓度组(10、25、50 mg/L)肠中的 *MDM2* 表达量增加,且在处理 4 h,浓度为 25、50 mg/L 时,*MDM2* 表达量极显著增加($P < 0.01$);处理 24 h,浓度为 50 mg/L 时,*MDM2* 表达量极显著增加($P < 0.01$);处理 96 h,低浓度组(0.05 mg/L) *MDM2* 的表达量低于对照组,其他实验组 *MDM2* 表达量高于对照组,当 50 mg/L 时 *MDM2* 表达量极显著高于对照组($P < 0.01$),是对照组的 2.72 倍(图 5)。

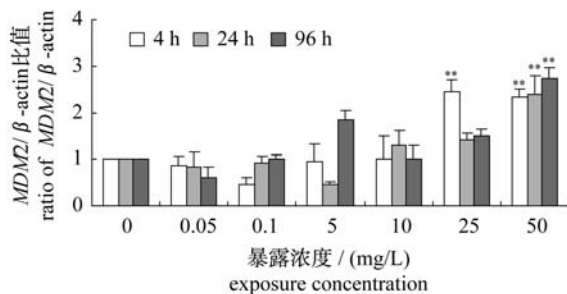


图 5 ZnO-NPs 对斑马鱼肠中 *MDM2* 基因的影响

Fig. 5 Effects of the ZnO-NPs on *MDM2* in zebrafish intestine

低浓度组(0.05、0.1 mg/L) *Bcl-2* mRNA 相对表达量降低,而高浓度组(25、50 mg/L) *Bcl-2* mRNA 相对表达量升高。浓度为 5、10 mg/L 组

处理 4 和 24 h 后,*Bcl-2* 基因的表达量降低;而 96 h 时,在 10、25、50 mg/L 组 *Bcl-2* mRNA 相对表达量极显著增加($P < 0.01$),是对照组的 3.66、3.31 和 4.12 倍(图 6)。

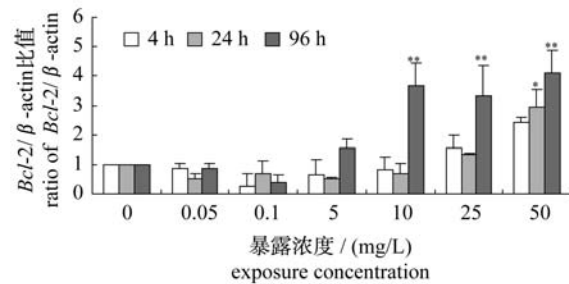


图 6 ZnO-NPs 对斑马鱼肠中 *Bcl-2* 基因的影响

Fig. 6 Effects of the ZnO-NPs on *Bcl-2* in zebrafish intestine

实验组肠中 *Bax* mRNA 的相对表达量均高于对照组。处理 4 和 24 h,浓度为 0.05 mg/L 组,肠中 *Bax* mRNA 的相对表达量极显著增加($P < 0.01$),是对照组的 5.95 和 3.57 倍;处理 96 h,浓度为 25 mg/L 组,*Bax* mRNA 的相对表达量极显著增加($P < 0.01$),是对照组的 6.66 倍(图 7)。

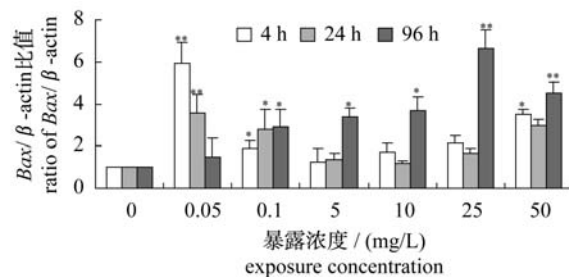


图 7 ZnO-NPs 对斑马鱼肠中 *Bax* 基因的影响

Fig. 7 Effects of the ZnO-NPs on *Bax* in zebrafish intestine

3 讨论

肠道是鱼类消化吸收和免疫的主要场所,与外界物质广泛接触,不仅承担着吸收和转运营养物质的功能,同时也承担着抵御外界有害物质侵入的屏障作用,因此维持肠道的正常生理结构和功能显得尤为重要。

研究者发现,不同粒径的 ZnO-NPs 均会造成细胞存活率下降,自由基增加,脂质氧化,细胞膜受损和 DNA 损伤^[14],而且还能引起鱼类胚胎发育迟缓,生长缓慢,存活率下降^[15]。有研究者认

为,粒径越小,更容易产生过多的自由基^[16]。作者也进行了相关研究,比较了 ZnO-NPs、ZnSO₄ 和常规氧化锌对斑马鱼肠组织的毒性作用,发现纳米颗粒的毒性最大。

有研究表明,当生物处于不利环境中时会诱导肠组织产生过多的氧自由基攻击细胞膜,造成胞质空泡化,杯状细胞肿胀变形^[17-18],使肠组织分泌黏液能力下降,降低了肠组织对外界环境毒物的抵抗能力;肠绒毛结构受到破坏,使肠黏膜的保护作用受阻,肠道抵抗能力下降,容易受外来污染物的侵蚀,同时还会影响肠道的吸收功能;上皮黏膜细胞增生,杯状细胞增多^[8,19],降低了生物体对外界环境的抵抗能力^[20],说明生物体生长发育受损,免疫能力下降,抗氧化能力下降。另有研究报告,环境污染物能引起肠中淋巴细胞增多,增加组织清除环境异物的能力,从而减轻有毒物对机体的损伤^[21]。本研究中,低浓度组(0.05 mg/L)和高浓度组(25、50 mg/L)首先出现杯状细胞增多的现象,说明低浓度会增加肠组织分泌黏液的能力,增加对外界毒物的抵抗能力,而高浓度组也出现类似现象,可能是浓度过高会引起 ZnO-NPs 团聚沉积在水底,从而减弱了 ZnO-NPs 对鱼类的毒害影响,而较高浓度组(5、10 mg/L)后出现此现象可能是肠黏膜免疫系统发挥作用,使杯状细胞增加延后。研究发现,除最高浓度组(50 mg/L)在暴露初期(7 d)观察到肠组织杯状细胞变形外,其余各组均在暴露后期(15 d)开始出现类似现象;且只有在较高浓度组(大于 5 mg/L)中有空泡化现象,说明一定浓度范围内,肠的损伤有浓度和时间依赖性。研究中还观察到只有在浓度为 25 mg/L 组的肠组织中淋巴细胞增多,肠绒毛侵蚀变形,推测可能是低浓度组对肠的毒害作用较小,而高浓度组出现大量的 ZnO-NPs 颗粒的沉积,减弱了 ZnO-NPs 对肠组织的损伤。

MDA 是脂质过氧化作用的产物,是细胞膜系统受损伤的重要指标,一定程度上根据 MDA 含量能评估组织的受损情况^[22]。研究者发现环境污染物能引起椎实螺(*Lymnaea luteola* L.)^[23]和鲤(*Cyprinus carpio*)^[24]组织中 MDA 含量的升高;污染物能刺激生物体内产生过多的氧自由基攻击细胞膜,造成脂质过氧化产物 MDA 含量的增加,本研究结果显示,低浓度组(0.05、0.1 mg/L)和较高浓度组(25 mg/L)的 MDA 含

量随着处理时间的延长而增加,说明肠组织受损程度加重;中浓度组(10 mg/L)MDA 含量的增加量高于高浓度组(25、50 mg/L),可能是高浓度组 ZnO-NPs 颗粒的沉积,造成了其毒性的下降。

GSH-PX 可以在 CAT 或者 H₂O₂ 含量低的组织中代替 CAT 清除 H₂O₂,从而防止机体造成损伤^[25]。Cozzari 等^[26]研究发现沙蚕(*Nereis succinea*)暴露于纳米银中 1 d 后,低浓度组(2.5 μg/g)GSH-PX 活性升高,而高浓度组(5 和 10 μg/g)处理 4 d 时,沙蚕体内的 GSH-PX 活性均显著下降($P < 0.05$);另有研究者发现,Cu²⁺能造成银鲳(*Pampus argenteus*)组织中 GSH-PX 活性先升高后下降^[27],生物体能通过适应性调节机体的相关生理机能活动,从而增强机体抗氧化防御系统清除活性氧自由基的能力,生物体受到环境污染物轻度胁迫时,酶活力随污染物浓度的增加而升高。本研究中也发现,处理 4 和 24 h,肠中 GSH-PX 活性升高,是生物体内的适应性调节机能,而中浓度组(10 mg/L)GSH-PX 活性的增加量高于高浓度组(25、50 mg/L),可能是高浓度组 ZnO-NPs 颗粒沉积造成其毒性下降;暴露 96 h, GSH-PX 活性的降低,可能是肠组织抗氧化系统功能损伤,造成鱼体内其他生理功能的下降,说明随着暴露时间的延长,ZnO-NPs 能引起斑马鱼肠组织受损。

GST 广泛存在于各种组织中,有解毒和清除过氧化物的双重功能,它具有 GSH-PX 活性,有清除脂质过氧化物的能力^[28]。研究发现,生存环境中添加 2.6 μM 的锌,贻贝(*Perna perna*)组织中 GST 活性在染毒 2 d 内有下降趋势,而染毒 7 和 21 d 后 GST 活性高于对照组^[29];紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)在受到环境胁迫时消化腺中 GST 活性升高^[30];环境污染物能诱导机体氧化应激胁迫,使 GST 活性升高,GST 活性下降一方面可能是底物 GSH 被大量消耗,另一方面可能是机体活性氧过多的积累造成细胞损伤,导致酶合成受阻,污染物甚至抑制 GST 的基因表达。本研究中处理 4 和 24 h,各实验组 GST 活性升高,96 h,低浓度组(0.05、0.1 mg/L)GST 活性升高,而其他实验组 GST 活性均下降。GST 活性升高,说明 ZnO-NPs 能引起肠组织的氧化应激效应,以减轻 ZnO-NPs 造成肠组织的氧化损伤程度;GST 活性降低,表明肠组织受到损伤,进一步证实随着处理

时间的延长,ZnO-NPs 能对肠组织造成损伤的结果。

p53 最重要的功能是能诱导应激信号引起细胞凋亡^[31],正常组织中 *p53* 的表达水平很低,当生物受到外界胁迫时,*p53* 的表达水平明显增加。*MDM2* 可能是 *p53* 最重要的抑制因子,能负向调节 *p53* 诱导凋亡的能力,*MDM2* 还可以降解 *p53*。有研究报道,纳米二氧化硅包被氧化锰能诱导 HeLa 细胞和 L929 细胞中 *p53* 基因表达量升高^[32]。本研究发现,ZnO-NPs 能激活肠中 *p53* 基因的表达量升高,低浓度组 *MDM2* 基因的表达量降低,高浓度组 *MDM2* 基因的表达量升高,说明 *p53* 基因的表达能诱导 *MDM2* 基因表达量的升高,同时 *MDM2* 的表达产物对 *p53* 基因的表达实施负调控,这与 Christen 等^[33]发现 *p53* 表达水平的降低可能与 *MDM2* 调控作用相关的结论相一致。

Bcl-2 和 *Bax* 在调控细胞凋亡过程中起重要作用,*Bax/Bcl-2* 比值决定了细胞对凋亡的敏感性以及细胞是否发生凋亡。*Bcl-2* 是细胞存活的促进因子,能抑制细胞的凋亡,*Bax* 能加速细胞凋亡。研究报道,羟基磷灰石纳米粒子使组织中 *Bax/Bcl-2* 的比值升高,并推测 *Bax/Bcl-2* 比值的升高可能会导致细胞凋亡^[18]。也有研究者发现纳米二氧化硅包被氧化锰能诱导细胞中 *Bax* 基因表达量升高,*Bcl-2* 基因表达量降低,*Bax/Bcl-2* 的比值增大,能激活凋亡蛋白酶活性从而诱导细胞凋亡^[30]。另有研究表明 ZnO-NPs 能激发 BJWT 和 BJshp53 细胞组织中 *Bax* 基因的表达,并且还预示 ZnO-NPs 引起的细胞凋亡与其产生的 ROS 相关^[34]。本研究也发现,低浓度组(0.05、0.1 mg/L)和处理 24 h 较高浓度组(5、10 mg/L),*Bcl-2* 基因表达量降低,而 *Bax* 基因表达量升高,*Bax/Bcl-2* 的比值增大;高浓度组(25、50 mg/L) *Bcl-2*、*Bax* 基因表达量增加,而 *Bax/Bcl-2* 的比值增大,说明 ZnO-NPs 处理能诱导肠组织细胞发生凋亡。

在细胞凋亡的过程中,*p53* 通过对下游靶基因 *Bax*、*MDM2* 等的调控,从而诱导细胞周期的阻滞、促进细胞凋亡和 DNA 损伤修复,维持基因组稳定,避免受损 DNA 的积累^[35]。本研究中发现 ZnO-NPs 胁迫下,肠中抗氧化酶活性发生变化,脂质过氧化物含量增加,肠组织结构发生变化,肠

中 *p53* 基因的表达能促进 *MDM2* 和 *Bax* 的表达,组织中 *Bax/Bcl-2* 的比值增大,说明 ZnO-NPs 诱发斑马鱼肠组织发生氧化应激作用,诱导肠组织中细胞的凋亡,使肠组织结构发生变化,且细胞凋亡的发生可能与组织中过多的过氧化物或活性氧有关。

ZnO-NPs 能造成斑马鱼肠组织结构发生变化,杯状细胞增多并伴有肿胀变形的现象,淋巴细胞增多,固有层细胞出现细胞空泡化,肠绒毛结构受到破坏。ZnO-NPs 使组织中 MDA 含量增加,抗氧化酶 GSH-PX、GST 活性发生变化,ZnO-NPs 能对肠组织造成损伤。肠组织中 *Bax/Bcl-2* 的表达量比值升高;*p53* 的 mRNA 相对表达量增加,组织中 *MDM2* 的 mRNA 的表达量也发生变化,说明 ZnO-NPs 可以诱导肠细胞凋亡,从而对肠造成损伤。

参考文献:

- [1] Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world[J]. Journal of Nanoparticle Research, 2012, 14(9): 253 - 262.
- [2] Maynard A D, Aitken R J, Butz T, et al. Safe handling of nanotechnology [J]. Nature, 2006, 444(7117): 267 - 269.
- [3] Nel A, Xia T, Meddler L, et al. Toxic potential of materials at the nanolevel [J]. Science, 2006, 311(5761): 622 - 627.
- [4] Hristozov D R, Gottardo S, Critto A, et al. Risk assessment of engineered nanomaterials; a review of available data and approaches from a regulatory perspective [J]. Nanotoxicology, 2012, 6(8): 880 - 898.
- [5] Kim J C, Hansen C F, Mullan B P, et al. Nutrition and pathology of weaner pigs: nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract [J]. Animal Feed Science and Technology, 2012, 173(1 - 2): 3 - 16.
- [6] Hempe J M, Cousins R J. Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats [J]. The Journal of Nutrition, 1992, 122(1): 89 - 95.
- [7] Ito E, Kondo F, Harada K. First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method [J].

- Toxicol,2000,38(1):37-48.
- [8] Li H,Zhou Q, Wu Y, *et al.* Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,2009,72(3):684-692.
- [9] Lü L N. The developmental toxicity study of nano-ZnO on zebrafish embryos [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2013. [吕丽娜. 纳米 ZnO 对斑马鱼胚胎的发育毒性研究. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2013.]
- [10] Zhu X S, Tian S Y, Cai Z H. Toxicity assessment of iron oxide nanoparticles in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages [J]. *PLOS One*, 2012, 7 (9):e46286.
- [11] Xiong D W, Fang T, Chen X D, *et al.* Oxidative stress effects and damage of nanoscale TiO₂ and ZnO on zebrafish [J]. *Chinese Journal of Environmental Science*,2010,31(5):1320-1327. [熊道文, 方涛, 陈旭东, 等. 纳米材料对斑马鱼的氧化损伤及应激效应研究. *环境科学*,2010,31(5):1320-1327.]
- [12] GB/T 13267-1991. Water quality-Determination of the acute toxicity of substance to a freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchana) [S]. Beijing:China Standard Press, 1991. [GB/T 13267-1991. 水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测试方法. 北京:中国标准出版社,1991.]
- [13] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4):402-408.
- [14] Lin W, Xu Y, Huang C C, *et al.* Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells [J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, 11 (1):25-39.
- [15] Zhu X, Wang J, Zhang X, *et al.* The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Nanotechnology*, 2009, 20 (19):195103.
- [16] Tang T S. In vitro toxicity of different-sized ZnO nanoparticles in Caco-2 cells [D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2014. [唐天舒. 不同粒径纳米氧化锌对结肠腺癌 Caco-2 细胞的毒性作用研究. 杭州: 中国计量学院, 2014.]
- [17] Lin S, Wang X, Ji Z, *et al.* Aspect ratio plays a role in the hazard potential of CeO₂ nanoparticles in mouse lung and zebrafish gastrointestinal tract [J]. *ACS Nano*, 2014, 8 (5):4450-4464.
- [18] Al B G A, Shaw B J, Handy R D, *et al.* Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 126:104-115.
- [19] Mehinto A C, Hill E M, Tyler C R. Uptake and biological effects of environmentally relevant concentrations of the nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceutical diclofenac in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44 (6):2176-2182.
- [20] Wang Z X, She R P, Chen Y, *et al.* Effect of different levels of zinc and selenium in diet on the structure of mucosa epithelium in broiler small intestine [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science and Technology*, 2003, 33 (7):18-21. [王子旭, 余锐萍, 陈越, 等. 日粮锌硒水平对肉鸡小肠黏膜结构的影响. *中国兽医科技*, 2003, 33 (7):18-21.]
- [21] Silva K T, Oliveira C R A, Rodrigues V C, *et al.* DBT-and DBTO₂-induced dysplasia and their associated proteomic alterations in the small intestines of wistar rats [J]. *Journal of Proteome Research*, 2014, 14 (1):385-396.
- [22] Shi Q H, Zhu Z J, Xu M, *et al.* Effect of excess manganese on the antioxidant system in *Cucumis sativus* L. under two light intensities [J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2006, 58 (1-3):197-205.
- [23] Ali D, Alarifi S, Kumar S, *et al.* Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 124-125:83-90.
- [24] Cao L P, Jia R, Du J L, *et al.* Toxicity effects of CCl₄ on DNA and expression of CYP3A gene in hepatocytes of *Cyprinus carpio* var. *Jian* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37 (10):1452-1459. [曹丽萍, 贾睿, 杜金梁, 等. CCl₄ 对建鲤肝细胞 DNA 的毒性作用及对 CYP3A 基因表达的影响. *水产学报*, 2013, 37 (10):1452-1459.]
- [25] Elia A C, Anastasi V, Dörr A J. Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of *Cyprinus carpio* exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization [J]. *Chemosphere*, 2006, 64 (10):1633-1641.
- [26] Cozzari M, Elia A C, Pacini N, *et al.* Bioaccumulation and oxidative stress responses measured in the estuarine rag worm (*Nereis*

- diversicolor) exposed to dissolved, nano-and bulk-sized silver[J]. *Environmental Pollution*,2015,198:32-40.
- [27] Zhou J K, Xu S L, Qiu C G, *et al.* Effects of Cu^{2+} on acute toxicity, blood cell nuclear abnormal and antioxidant enzyme activity of *Pampus argenteus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38 (8): 1106-1112. [周健恺,徐善良,邱成功,等. Cu^{2+} 急性毒性下银鲳幼鱼红细胞核异常和抗氧化酶活性的变化. *水产学报*,2014,38(8):1106-1112.]
- [28] Mitra G, Mukhopadhyay P K, Ayyappan S. Modulation of digestive enzyme activities during ontogeny of *Labeo rohita* larvae fed ascorbic acid enriched zooplankton[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*,2008,149(4):341-350.
- [29] Trevisan R, Flesch S, Mattos J J, *et al.* Zinc causes acute impairment of glutathione metabolism followed by coordinated antioxidant defenses amplification in gills of brown mussels *Perna perna*[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part C: Toxicology & Pharmacology*,2014,159:22-30.
- [30] Wilhelm F D, Tribess T, Gaspari C, *et al.* Seasonal changes in antioxidant defenses of the digestive gland of the brown mussel (*Perna perna*) [J]. *Aquaculture*,2001,203(1):149-158.
- [31] Okal A, Mossalam M, Matissek K J, *et al.* A chimeric *p53* evades mutant *p53* transdominant inhibition in cancer cells [J]. *Molecular Pharmaceutics*,2013,10(10):3922-3933.
- [32] Yu C, Zhou Z, Wang J, *et al.* In depth analysis of apoptosis induced by silica coated manganese oxide nanoparticles *in vitro* [J]. *Journal of Hazardous Materials*,2015,283:519-528.
- [33] Christen V, Camenzind M, Fent K. Silica nanoparticles induce endoplasmic reticulum stress response, oxidative stress and activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway [J]. *Toxicology Reports*,2014,1:1143-1151.
- [34] Setyawati M I, Tay C Y, Leong D T. Effect of zinc oxide nanomaterials-induced oxidative stress on the *p53* pathway[J]. *Biomaterials*,2013,34(38):10133-10142.
- [35] Hu J, Liu Z S, Tang S L, *et al.* The effect of hydroxyapatite nanoparticles on hepatic arterial infusion of rabbit liver VX2 tumor growth and planting *bax/bcl-2* protein expression [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*,2007,24(4):438-440. [胡军,刘志苏,唐胜利,等. 羟基磷灰石纳米粒子肝动脉灌注对兔 VX2 肝种植瘤生长和 *bax/bcl-2* 蛋白表达的影响. *中华实验外科杂志*,2007,24(4):438-440.]

Oxidative damage of zinc oxide nanoparticles to zebrafish intestine

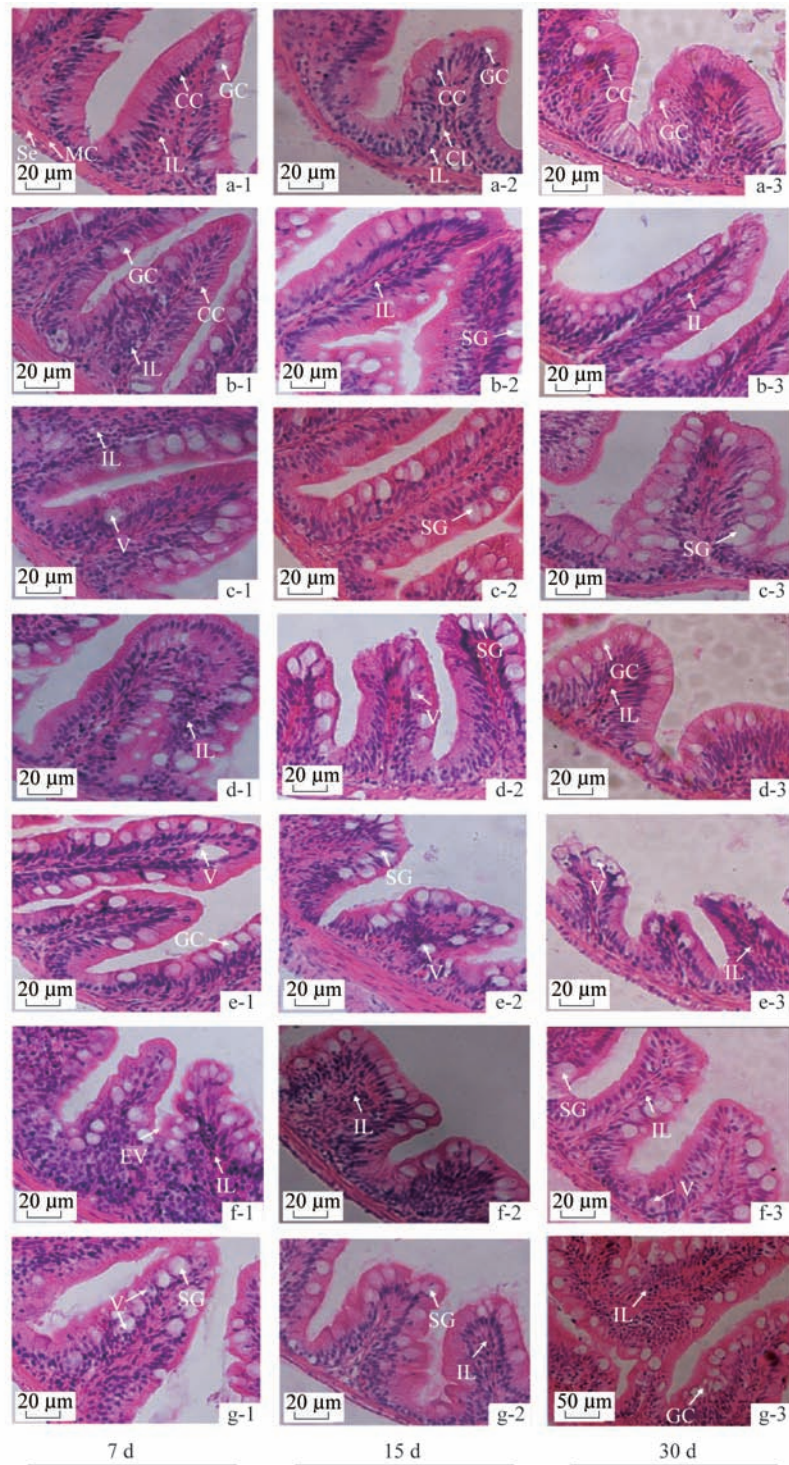
LIU Lin, ZHAO Qunfen*, ZHU Shuaiqi, XU Feng
(College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To analyze the mechanism and result of the zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) injury to zebrafish intestine tissue, this paper has studied the effect of ZnO-NPs on zebrafish intestine tissue structure, antioxidant enzyme activity and apoptotic gene expression. Zebrafish were exposed to the different concentrations of ZnO-NPs (0, 0.05, 0.1, 5, 10, 25, 50 mg/L). The malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-PX) and glutathione-s-transferase (GST) in the intestine tissues of zebrafish were measured by colorimetric method at the 4th, 24th and 96th hour. The mRNA expressions of *Bcl-2*, *Bax*, *p53* and *MDM2* in intestine tissues were also examined using quantitative real-time PCR assays. The change of anatomical structure in the intestine tissues of zebrafish was observed by Hematoxylin-Eosin (H-E) staining technique after zebrafish were exposed to ZnO-NPs for 7 d, 15 d and 30 d. Compared with the control group, the experimental groups were shown as: the MDA content was increased; with a longer exposure time, the activity of GSH-PX and GST first increased and then decreased; the mRNA expression level of genes *Bax/Bcl-2* ratio and *p53* of experimental groups increased; with a longer exposure time and a higher concentration, the mRNA expression level of gene *MDM2* first increased and then decreased. HE staining was observed in the experimental groups, changes in the structure of intestinal tissues were shown as the phenomena that the number of goblet cells and lymphocyte increased, goblet cells swelled, cytoplasmic vacuolation, leukomonocyte increased and erosion of villi was observed in zebrafish intestine depending on the time and dose. The results suggest that the oxidative damage of ZnO-NPs to the zebrafish intestine was caused by the increase of oxidative stress, which made enzyme inactivating, induced the expression of cell apoptosis-related genes and caused the damage to histological structure of intestine.

Key words: zebrafish; ZnO nanoparticles; intestine tissue; oxidative damage

Corresponding author: ZHAO Qunfen. E-mail: zhaqunfen@nbu.edu.cn

Funding projects: Opening Project of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Fisheries (xkzsc1415)



图版 ZnO-NPs 暴露下斑马鱼肠组织出现的病变 (HE)

a: 对照组, b: 0.05 mg/L, c: 0.1 mg/L, d: 5 mg/L, e: 10 mg/L, f: 25 mg/L, g: 50 mg/L。GC: 杯状细胞, CC: 柱状细胞, Se: 浆膜, MC: 基层, CL: 中央乳糜管, IL: 淋巴细胞, SG: 杯状细胞肿胀, V: 固有层空泡化, EV: 绒毛侵蚀

Plate Lesion of zebrafish intestine under ZnO-NPs stress (H&E stain)

a: control, b: 0.05 mg/L, c: 0.1 mg/L, d: 5 mg/L, e: 10 mg/L, f: 25 mg/L, g: 50 mg/L。GC: goblet cells, CC: columnar cells, Se: secreta, MC: muscular coats, CL: central lacteal, IL: lymphocyte, SG: swelling of goblet cells, V: vacuoles in the lamina propria, EV: erosion of villi