

文章编号: 1000-0615(2018)11-1804-13

DOI: 10.11964/jfc.20171211076

## 纳米ZnO和常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼毒性效应的比较

兰丽贞, 刘林, 马宁宁, 叶庄新, 赵群芬\*

(宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315211)

**摘要:** 为比较纳米ZnO、常规ZnO和ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼氧化应激毒性的强弱, 探究纳米ZnO的毒性作用与其释放的Zn<sup>2+</sup>和本身特性的关系, 研究了纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼肝脏、肠、鳃组织中抗氧化酶活性及炎症凋亡基因表达的影响。实验将斑马鱼分别暴露于纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>水体中, 在4、24和96 h后, 用分光光度法检测斑马鱼肝脏、肠、鳃中过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、活性氧自由基(ROS)的变化; 采用荧光定量PCR技术, 测定实验组中肝脏、肠和鳃中*Bax*、*Bcl-2*、*TNF-α*及*IL-6*的mRNA相对表达量。结果显示, 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>均引起斑马鱼各组织的氧化应激反应, 且使组织中凋亡基因和炎症基因表达水平发生变化, 激活生物体内的细胞坏死和细胞凋亡途径, 引起细胞死亡或机体炎症, 其中纳米ZnO的致氧化损伤作用最强。研究表明, 纳米ZnO对斑马鱼的氧化应激毒性强于常规ZnO和ZnSO<sub>4</sub>, 而纳米颗粒本身特性是导致纳米ZnO毒性作用的主要原因。

**关键词:** 斑马鱼; 纳米ZnO; 常规ZnO; ZnSO<sub>4</sub>; 毒性效应

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

水生生态系统的污染是一个日益严重的问题<sup>[1]</sup>。随着纳米技术的迅速发展, 纳米材料在电子设备、化工材料及生物传感器等多个领域得到广泛应用, 金属氧化物纳米粒子是最广泛使用的工程纳米粒子, 应用在各种商业产品中<sup>[2]</sup>。有研究报道, 纳米金属、纳米金属氧化物等纳米材料, 能溶解出有毒的离子或重金属从而对细胞造成损伤<sup>[3]</sup>。纳米材料在使用和运输中不可避免的会释放到环境中, 最终的归宿不是土壤就是水体, 所以对水生动物和人类健康会造成潜在的威胁。

纳米ZnO是典型的金属氧化纳米材料, 因具有高稳定性、防腐、光催化性等独特的理化性质, 而被广泛应用于工业和日常生活中, 对水生态系统和生物造成潜在危险<sup>[3]</sup>。研究发现, 纳米ZnO溶出锌离子对鱼的胚胎产生毒性, 使胚胎孵化率降低<sup>[4]</sup>; 也有研究报道, 纳米ZnO的毒性

与其尺寸大小和溶解出的Zn<sup>2+</sup>有关<sup>[5]</sup>。Fernández等<sup>[3]</sup>研究显示, 纳米ZnO、Zn<sup>2+</sup>能对鱼类细胞产生毒害作用, 块状ZnO却无毒害作用, 而在藻类的实验中发现, 纳米ZnO、常规ZnO溶出的Zn<sup>2+</sup>是产生毒性的主要机制。Wiench等<sup>[6]</sup>比较了纳米ZnO和常规ZnO对水蚤(*Daphnia*)的急性和慢性毒性, 结果发现, 纳米材料和非纳米材料间无显著差别, 急性实验中发现可能是溶解出的Zn<sup>2+</sup>作用。Wong等<sup>[7]</sup>研究发现纳米ZnO对水生物的毒性主要是由纳米ZnO释放的Zn<sup>2+</sup>引起的。但也有研究者发现纳米ZnO对斑马鱼的毒性作用小于常规ZnO颗粒, Zhu等<sup>[8]</sup>研究结果显示, 纳米ZnO能以更低的剂量对水蚤产生毒性。在研究纳米ZnO颗粒和ZnCl<sub>2</sub>对斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎的毒性作用中发现纳米ZnO的毒性效应主要由于其释放的Zn<sup>2+</sup>起作用<sup>[4]</sup>。后来有学者又指出, 纳米ZnO的生物毒性不全部来自于其释放的Zn<sup>2+</sup>所造成的毒性

收稿日期: 2017-12-09 修回日期: 2018-05-03

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: zhaoqunfen@nbu.edu.cn

影响, 纳米效应也起到了一定作用, 因此释放的Zn<sup>2+</sup>并未完全解释纳米ZnO引起的毒性作用<sup>[9]</sup>。

纳米材料由于具有很高的催化活性和很大的比表面积, 其与生物分子相互作用时伴随着化学反应的发生<sup>[10]</sup>。研究者认为, 纳米ZnO进入生物体后, 由于其表面的电子活性位点可以与氧分子发生反应, 诱导产生活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS), 而过量产生的ROS可能会破坏机体自身的抗氧化机制, 引起氧化应激, 影响生物体的生长发育及生理机能, 进而导致生物体病变或死亡<sup>[11]</sup>。污染物对生物的毒性机制多表现为氧化损伤, 生物体在污染物的胁迫下产生过多的ROS, 能破坏自身抗氧化系统的平衡<sup>[12]</sup>, 因此很多学者将抗氧化系统指标作为敏感生物标志物<sup>[13]</sup>。斑马鱼作为模式生物, 对水质污染与毒性物质反应灵敏, 可在短时间内调查污染状况或者用于特定污染物的检查<sup>[14]</sup>。本研究采用成体斑马鱼为受试对象, 研究纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对其肝脏、肠和鳃组织中过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、活性氧自由基(ROS)活性影响, 比较纳米ZnO、常规ZnO和ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼氧化应激毒性的强弱, 并分析纳米ZnO的毒性作用与其释放的Zn<sup>2+</sup>和本身特性的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

成年蓝色斑马鱼购于宁波市天胜花鸟市场, 鱼龄120 d左右, 体长为(3.00±0.6) cm, 体质量为(0.36±0.1) g, 实验前驯养7 d(驯养期间无斑马鱼死亡), 驯养用水为自来水加入去氯剂后不断曝气12 h, 水温(26±0.5) °C, 光照/黑暗周期为16 h: 8 h, 每日投食2次(早晚各一次), 虹吸法清除排泄物及余食。

纳米ZnO (25 ±2) nm购于杭州大洋纳米科技有限公司, 常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>均为分析纯, 过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、ROS试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

### 1.2 毒性试验

实验组斑马鱼分别采用10 mg/L纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>, 对照组采用曝气的自来水, 每组3个平行。毒性实验参照GB/T13276-1991,

采用半静态暴露方式, 水量以鱼的负荷计算约为1 L水中暴露1 g鱼, 实验期间不喂食。

### 1.3 斑马鱼生理指标的测定

在处理4、24和96 h时, 每组随机选取5尾斑马鱼, 立即将斑马鱼处死, 解剖取肝脏、肠和鳃组织, 冷生理盐水漂洗, 滤纸吸干水分称湿重, 加入预冷的0.86%生理盐水(组织湿重: 生理盐水=1: 9), 冰水浴中使用超声波细胞破碎仪将组织充分匀浆化呈乳白色, 4 °C, 2 000 r/min离心10 min, 取上清进行GSH、ROS含量及CAT、GST活性的测定, 具体操作按南京建成试剂盒说明书进行, 蛋白质含量用考马斯亮蓝法测定。

### 1.4 斑马鱼凋亡及炎症基因表达的测定

根据GenBank中斑马鱼*Bcl-2*基因序列、*Bax*基因序列、*IL-6*基因序列和*TNF-α*基因序列, 用斑马鱼管家基因*β-actin*为内参, 设计*Bcl-2*、*Bax*、*IL-6*、*TNF-α*和*β-actin*基因引物(表1)。

表1 目的基因及内参基因的引物

基因 gene	正向引物forward 5'-3' 反向引物reverse 5'-3'	退火温度/°C annealing temperature
<i>β-actin</i>	ACCACCACAGCCGAAAGAG (F) GGCAACGGAAACGCTCA (R)	56
<i>Bcl-2</i>	ATGTGCGTGGAAAGCGTCAAC (F) GAAGGCATCCCAACCTCCATT (R)	56
<i>Bax</i>	CGATACGGGCAGTGGCA (R) TCGGCTGAAGATTAGAGTTGTTT (F)	56
<i>IL-6</i>	TCCTGTCTGTACTACTGGCTAC (R) GAGACTCTTTACGTCCACATCCT (F)	56
<i>TNF-α</i>	TCAGTGCAATCCGCTCAATC (R) GTCTGTGCCAGTCTGTCTCC (F)	56

荧光定量PCR (RT-PCR)反应体系(20 μL): SYBR Premix Ex *Taq*™ II (2×)10 μL、正向及反向引物各0.8 μL、cDNA模板2 μL、补无菌水至总体积。扩增条件为预变性95 °C 5 min; 95 °C变性20 s, 57 °C退火 25 s, 72 °C延伸25 s, 40个循环, 反应结束后制备溶解曲线。每个反应设3个平行, 为排除假阳性所检测样品均包含1个无模板的阴性对照。

### 1.5 数据的处理

实验数据以平均数±标准差(mean±SD)来表示, 数据采用SPSS 19.0软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA), 并以LSD进行多重比较, 认为P<0.05时存在显著性差异, P<0.01时存在极显著差异。

## 2 结果

### 2.1 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中CAT活性的影响

实验组斑马鱼肝脏中CAT活性均低于对照组(图1-a)。处理4 h时,实验组CAT活性与对照组相比,活性大小依次是纳米ZnO>ZnSO<sub>4</sub>>常规ZnO,其中纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>处理组斑马鱼肝脏中CAT活性达到极显著水平( $P<0.01$ )。而在处理24 h时,仅ZnSO<sub>4</sub>导致CAT活性极显著低于对照组( $P<0.01$ )。常规ZnO均未对肝中CAT活性造成明显影响( $P>0.05$ )。处理4、24 h时,纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>处理组斑马鱼肠中CAT活性均高于对照组(图1-b),其中纳米ZnO暴露4 h时肠中CAT活性达到最大值,为对照组的216.87%。在96 h时,与对照组相比,实验组斑马鱼肠中CAT活性均低于对照组,其中ZnSO<sub>4</sub>处理组CAT活性极显著降低( $P<0.01$ )。当处理4、24和96 h,实验组斑马鱼鳃中CAT活性呈先上升后下降的趋势(图1-c)。其中,与对照相比,斑马鱼暴露于纳米ZnO 24 h时,鳃中CAT活性显著性增加( $P<0.01$ ),达到对照组的137.59%;在96 h时则显著性降低( $P<0.01$ ),仅为对照的61.63%。

### 2.2 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中GSH含量的影响

纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>胁迫下,斑马鱼中肝脏、肠和鳃各组织中GSH含量的变化显示,纳米ZnO处理组斑马鱼肝脏中GSH含量均低于对照组(图2-a),且在处理4和96 h时,差异极显著( $P<0.01$ ),在处理初期(4 h)时达到最小值,仅为对照组的63.31%。暴露96 h后,ZnSO<sub>4</sub>、常规ZnO处理组斑马鱼肝脏中GSH含量稍低于对照组,但差异不显著( $P>0.05$ )。与对照组相比,暴露24 h时,纳米ZnO和ZnSO<sub>4</sub>处理均诱导斑马鱼肠中GSH含量极显著升高( $P<0.01$ ),分别为对照组的1.25和1.36倍。而处理96 h后,纳米ZnO和ZnSO<sub>4</sub>实验组均低于对照水平,其中ZnSO<sub>4</sub>实验组达到显著水平( $P<0.05$ )(图2-b)。当暴露时间为4 h、24 h时,纳米ZnO、常规ZnO处理组斑马鱼鳃中GSH含量均高于对照组(图2-c)。在96 h时,实验组鳃中GSH含量有所降低,各组中GSH的含量依次为纳米ZnO>ZnSO<sub>4</sub>>常规ZnO,但仅纳米ZnO处理显著降低( $P<0.05$ )。

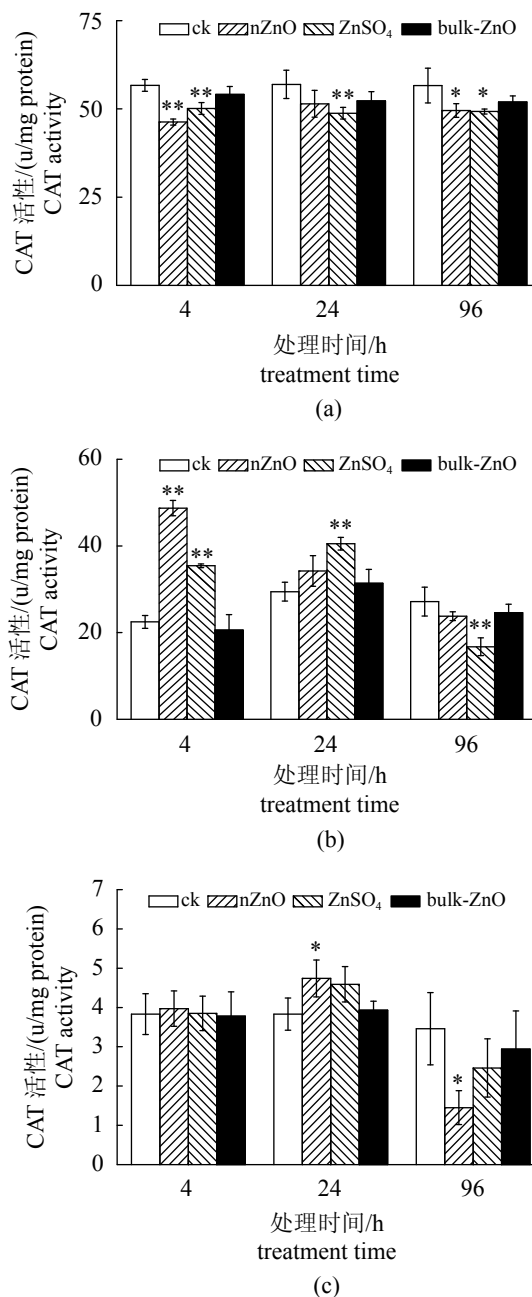


图1 斑马鱼肝、肠、鳃中CAT活性变化

(a) 肝脏, (b) 肠, (c) 鳃; \*表示各处理间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示各处理差异极显著( $P<0.01$ )

Fig. 1 Changes of CAT activity in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a) liver, (b) intestine, (c) gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level., \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

### 2.3 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中GST活性的影响

暴露于纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>下的斑

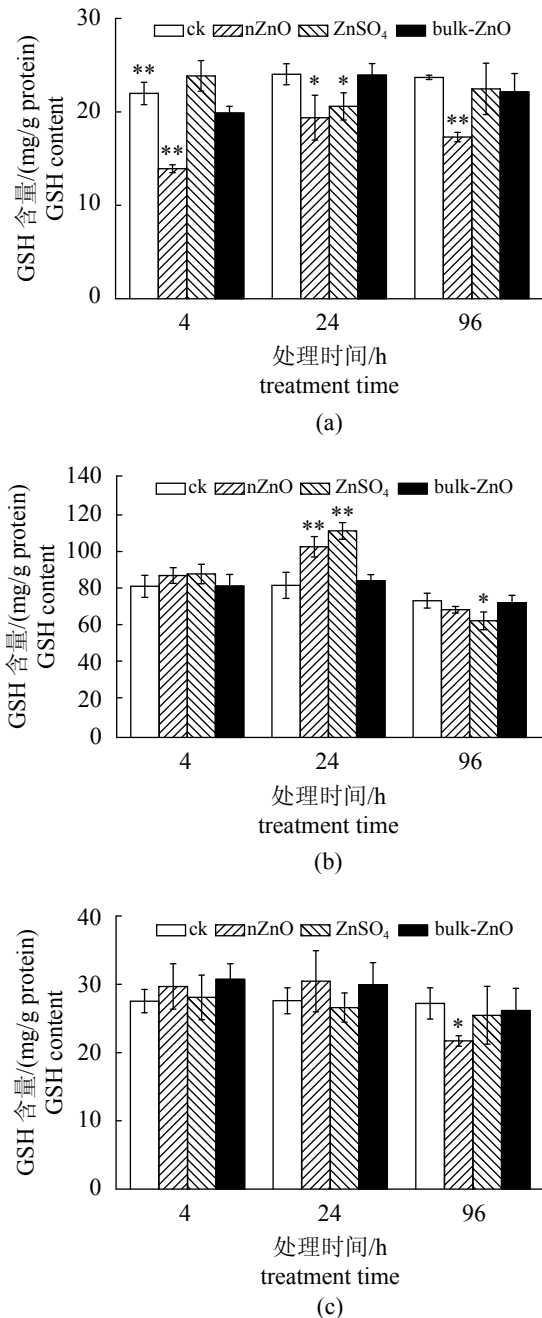


图2 斑马鱼肝脏、肠、鳃中GSH含量变化

(a)肝脏, (b)肠, (c)鳃; \*表示各处理间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示各处理差异极显著( $P<0.01$ )

Fig. 2 Changes of GSH contents in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a)liver, (b)intestine, (c)gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level., \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

马鱼肝脏、肠和鳃各组织中GST活性的变化结果显示, 与对照组相比, 处理24、96 h时, 纳米ZnO和ZnSO<sub>4</sub>均诱导GST活性极显著升高( $P<0.01$ ), 而且ZnSO<sub>4</sub>处理24 h时肝脏中GST活性达到最

大, 为对照组的128.95%。常规ZnO处理组仅在暴露96 h时对GST活性有明显影响, 显著低于对照水平( $P<0.05$ )(图3-a)。与对照组相比, 处理4 h、24 h时, 实验组斑马鱼肠中GST活性均高于对照组(图3-b), 其中纳米ZnO、常规ZnO处理均在24 h时达到最大, 分别为对照组的1.52和1.54倍。随着处理时间的延长, 暴露96 h时, 各处理组中斑马鱼肠中GST活性逐渐下降, 各组中GST的活性大小依次为ZnSO<sub>4</sub>>纳米ZnO>常规ZnO。暴露4、24 h后, 纳米ZnO、常规ZnO处理组斑马鱼鳃中GST活性均极显著高于对照组(图3-c), 且实验组中常规ZnO处理24 h时GST活性达到最大, 为对照组121.94%。处理96 h时, 纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>和常规ZnO处理均导致GST活性极显著低于对照组水平( $P<0.01$ )。

#### 2.4 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中ROS含量的影响

实验组中斑马鱼肝脏中ROS含量均高于对照组(图4-a), 处理4和24 h时, 随着处理时间的延长, 实验组肝脏中ROS含量逐渐增加; 暴露96 h, 纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>和常规ZnO处理组中ROS含量极显著升高( $P<0.01$ ), 分别为对照组的1.37、1.16和1.17倍。纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>和常规ZnO处理组斑马鱼肠中ROS含量均高于对照组(图4-b)。处理4、24和96 h, 与对照组相比, 纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>均诱导肠中ROS含量极显著升高( $P<0.01$ )。处理4、24 h时, 实验组中ZnSO<sub>4</sub>处理后ROS含量均达到最大, 而在暴露96 h后, 纳米ZnO处理组达到最大。与对照组相比, 实验组中鳃中ROS含量均升高, 增加量依次是纳米ZnO>ZnSO<sub>4</sub>>常规ZnO, 且各处理组斑马鱼鳃中ROS含量随着暴露时间的增加而逐渐上升(图4-c)。常规ZnO处理4、24 h时ROS含量均未出现明显变化, 仅在96 h后ROS含量显著高于对照组水平( $P<0.05$ )。

#### 2.5 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中Bcl-2基因表达量的影响

纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>处理下, 斑马鱼肝脏、肠和鳃各组织中Bcl-2 mRNA表达量的变化结果显示, 与对照组相比, 纳米ZnO和常规ZnO导致肝脏中Bcl-2 mRNA的表达量呈上升趋势(图5-a)。且在处理96 h时, 纳米ZnO处理组中Bcl-2 mRNA的表达量极显著升高( $P<0.01$ ), 是对照组的1.44倍。处理4、24 h时, 各实验组斑马鱼肠中

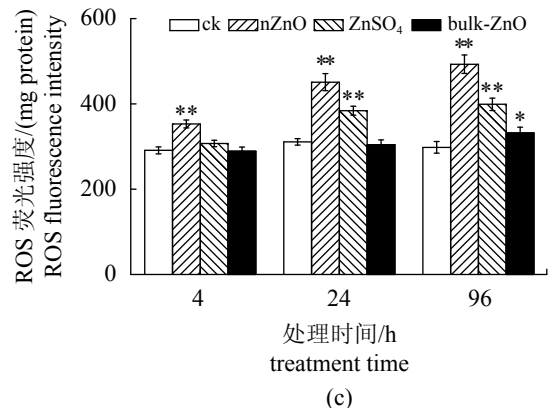
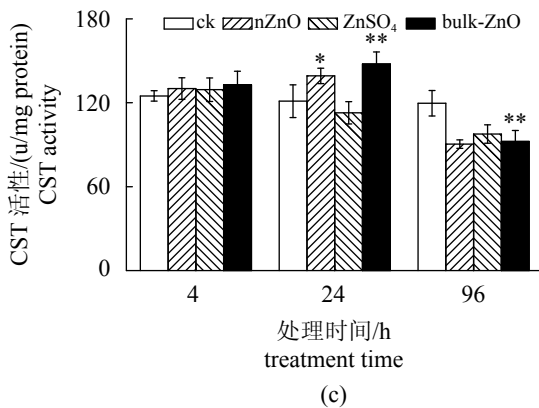
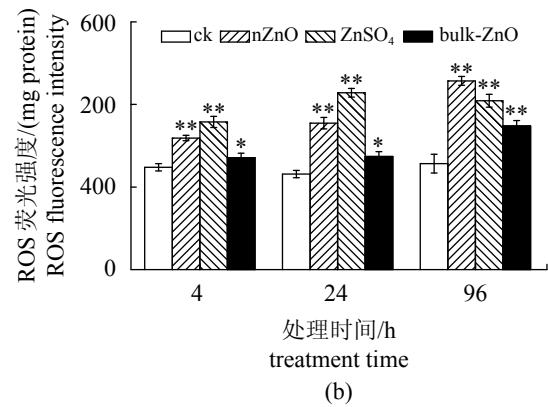
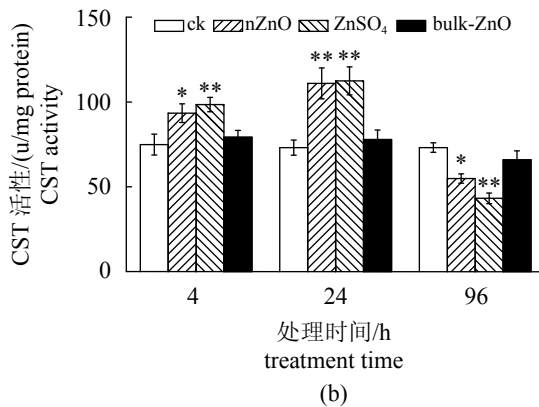
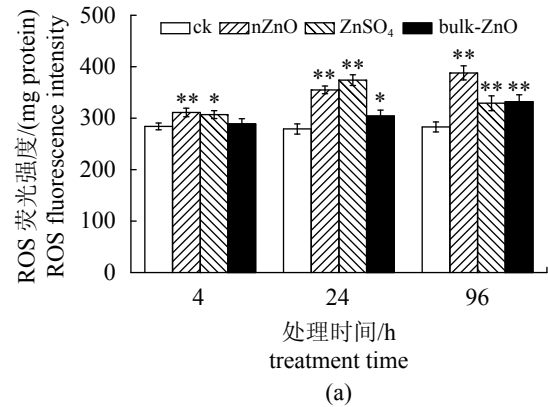
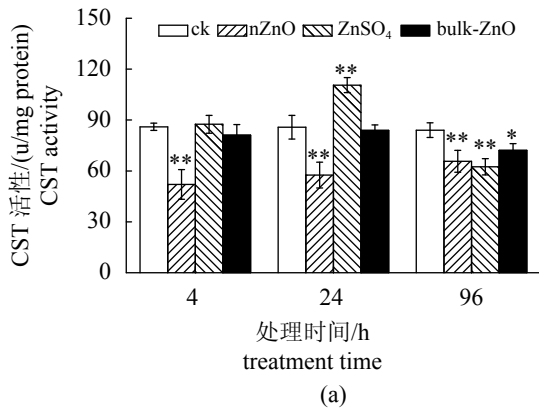


图3 斑马鱼肝脏、肠、鳃中GST活性变化

(a)肝脏, (b)肠, (c)鳃; \*表示各处理间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示各处理差异极显著( $P<0.01$ )

Fig. 3 Changes of GST activities in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a)liver, (b)intestine, (c)gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level., \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

*Bcl-2* mRNA表达量均高于对照组(图5-b)。随着暴露时间延长至96 h, 肝脏中*Bcl-2* mRNA表达量呈上升趋势, 其中纳米ZnO处理组中的*Bcl-2* mRNA的表达量显著高于对照水平( $P<0.05$ )。在处理初期(4 h), 仅纳米ZnO处理组鳃中*Bcl-2*

图4 斑马鱼肝脏、肠、鳃中ROS含量变化

(a)肝脏, (b)肠, (c)鳃; \*表示各处理间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示各处理差异极显著( $P<0.01$ )

Fig. 4 Changes of ROS contents in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a)liver, (b)intestine, (c)gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level., \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

mRNA的表达量高于对照组(图5-c)。暴露24 h后, ZnSO<sub>4</sub>和常规ZnO处理组*Bcl-2* mRNA的表达量极显著上升( $P<0.01$ )。在处理96 h时, 各处理组*Bcl-2* mRNA表达量略低于对照组, 差异不显著( $P>0.05$ )。

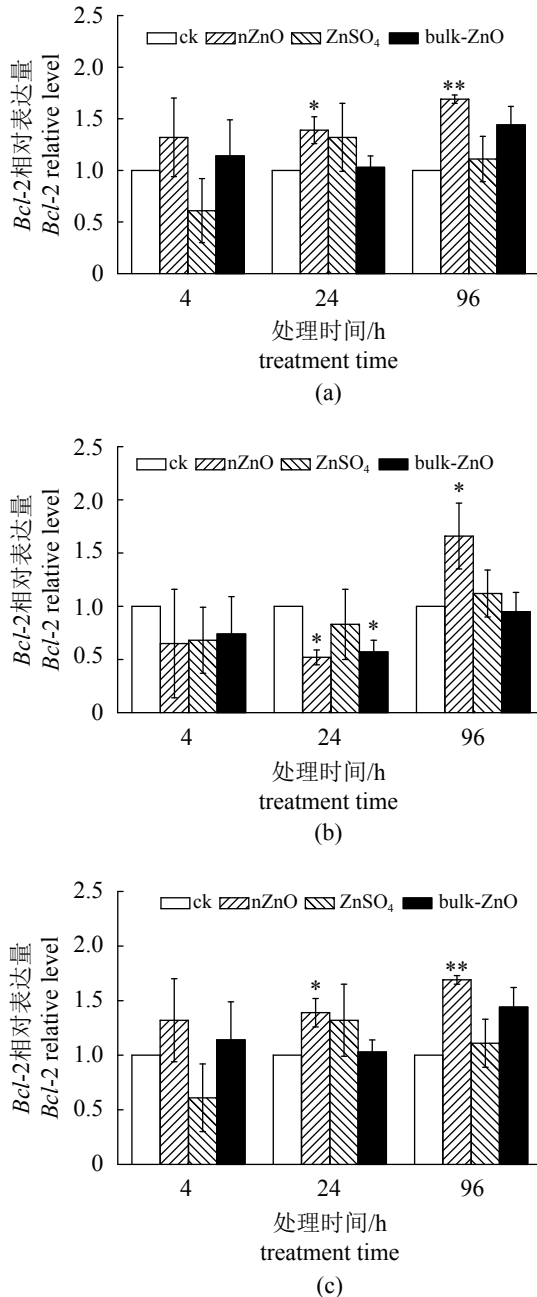


图5 斑马鱼肝脏、肠、鳃中 *Bcl-2* 基因表达量变化 (a) 肝脏, (b) 肠, (c) 鳃; \* 表示各处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示各处理差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Fig. 5 Changes of *Bcl-2* gene expressions in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a) liver, (b) intestine, (c) gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level, \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

## 2.6 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中 *Bax* 基因表达量的影响

纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>处理下, 斑马鱼中肝脏、肠和鳃各组织中 *Bax* mRNA 表达量的

变化显示, 处理4、24和96 h时, 实验组肝脏中的 *Bax* mRNA 表达量均高于对照组(图6-a), 其中纳米ZnO均诱导 *Bax* mRNA 表达量极显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且在96 h时达到最大值, 为对照组的12.79倍。常规ZnO处理组仅在24 h时极显著促进了肝脏中 *Bax* mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ )。处理4、24 h时, 各实验组斑马鱼肠中 *Bax* mRNA 表达量与对照组相比无显著差异 ( $P > 0.05$ )(图6-b)。暴露96 h后, ZnSO<sub>4</sub>和常规ZnO处理组 *Bcl-2* mRNA 的表达量大幅增加并高于对照组, 增加量依次是纳米ZnO > ZnSO<sub>4</sub> > 常规ZnO。ZnSO<sub>4</sub>和常规ZnO对斑马鱼鳃中 *Bax* mRNA 表达量无显著影响 ( $P > 0.05$ )(图6-c)。与对照相比, 处理4 h时, 纳米ZnO诱导 *Bax* mRNA 表达量显著升高 ( $P < 0.05$ ), 在96 h达到极显著水平 ( $P < 0.01$ )。

## 2.7 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中 *IL-6* 基因表达量的影响

纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼中肝脏、肠和鳃各组织 *IL-6* mRNA 表达量的影响显示, 各实验组肝脏中 *IL-6* mRNA 表达量均高于对照组(图7-a)。处理4 h时, 与对照组相比, *IL-6* mRNA 表达量均极显著高于对照水平 ( $P < 0.01$ )。在24 h时, 纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>处理组 *IL-6* mRNA 表达量均达到最大值, 分别为对照组的13.86倍和9.12倍, 常规ZnO处理后 *IL-6* mRNA 表达量略高于对照组, 差异不显著 ( $P > 0.05$ )。处理4、24和96 h时, 纳米ZnO处理组肠中 *IL-6* mRNA 表达量均极显著低于对照水平 ( $P < 0.01$ )(图7-b)。处理4、24 h, 与对照相比, ZnSO<sub>4</sub>处理组中 *IL-6* mRNA 表达量呈下降趋势, 并达到显著水平 ( $P < 0.05$ )。纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>、常规ZnO均能诱导斑马鱼鳃中 *IL-6* mRNA 表达量上调(图7-c), 但ZnSO<sub>4</sub>、常规ZnO处理组影响不明显 ( $P > 0.05$ ), 仅纳米ZnO处理4 h引起鳃中 *IL-6* mRNA 表达量显著高于对照水平 ( $P < 0.05$ )。

## 2.8 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼各组织中 *TNF-α* 基因表达量的影响

纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>暴露下对斑马鱼中肝脏、肠和鳃各组织 *TNF-α* mRNA 表达量的变化(图8)。处理4 h时, 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>处理组肝脏中 *TNF-α* mRNA 表达量均上调(图8-a), 其中纳米ZnO、ZnSO<sub>4</sub>处理组极显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。暴露24 h后, 常规ZnO也诱导

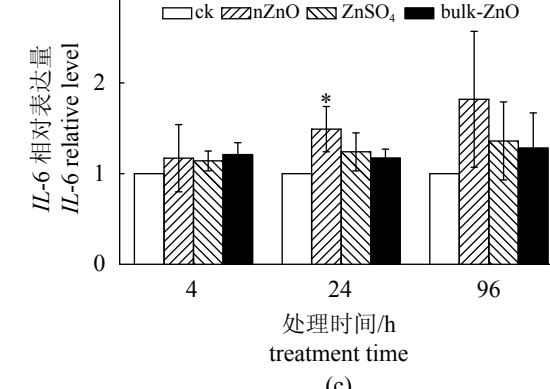
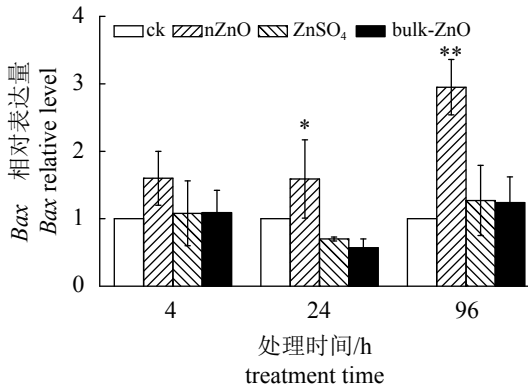
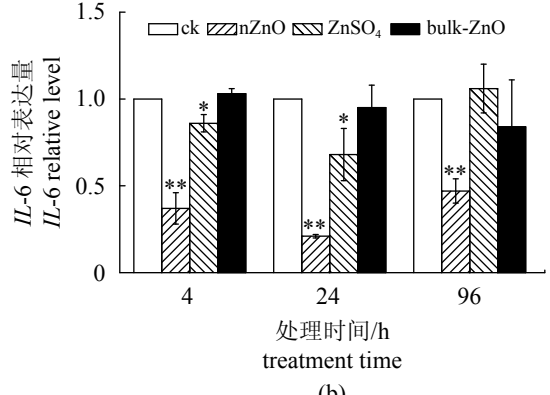
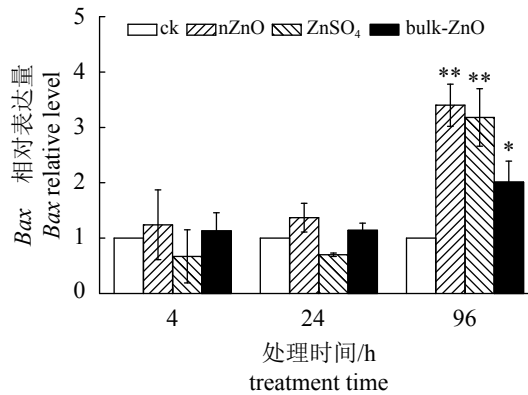
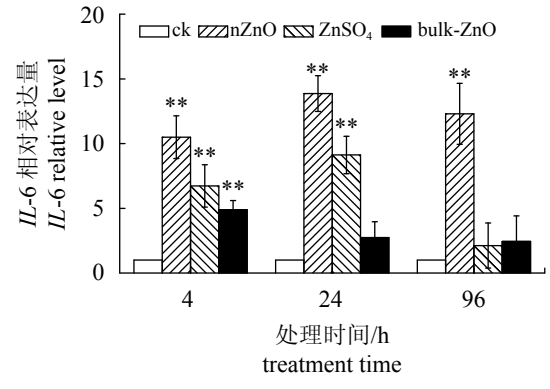
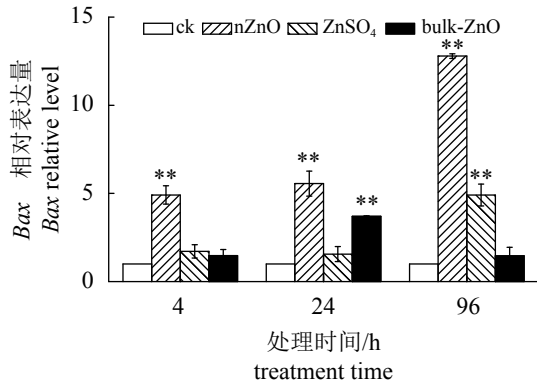


图6 斑马鱼肝脏、肠、鳃中*Bax*基因表达量变化 (a)肝脏, (b)肠, (c)鳃; \*表示各处理间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示各处理差异极显著( $P<0.01$ )

Fig. 6 Changes of *Bax* gene expressions in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a)liver, (b)intestine, (c)gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level, \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

斑马鱼*IL-6* mRNA表达量极显著上调( $P<0.01$ )。在96 h, 纳米ZnO导致*IL-6* mRNA表达量达到最大值。处理4、24 h时, 各实验组肠中*TNF- $\alpha$*  mRNA表达量均低于对照水平(图8-b)。暴露96 h

图7 斑马鱼肝脏、肠、鳃中*IL-6*基因表达量变化 (a)肝脏, (b)肠, (c)鳃; \*表示各处理间差异显著( $P<0.05$ ), \*\*表示各处理差异极显著( $P<0.01$ )

Fig. 7 Changes of *IL-6* gene expressions in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a)liver, (b)intestine, (c)gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level, \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

后, 与对照组相比, 纳米ZnO处理组肠中*TNF- $\alpha$*  mRNA表达量极显著上调( $P<0.01$ ), ZnSO<sub>4</sub>处理组*TNF- $\alpha$*  mRNA表达量极显著下调( $P<0.01$ ), 常规ZnO处理组*TNF- $\alpha$*  mRNA表达量则无明显变化

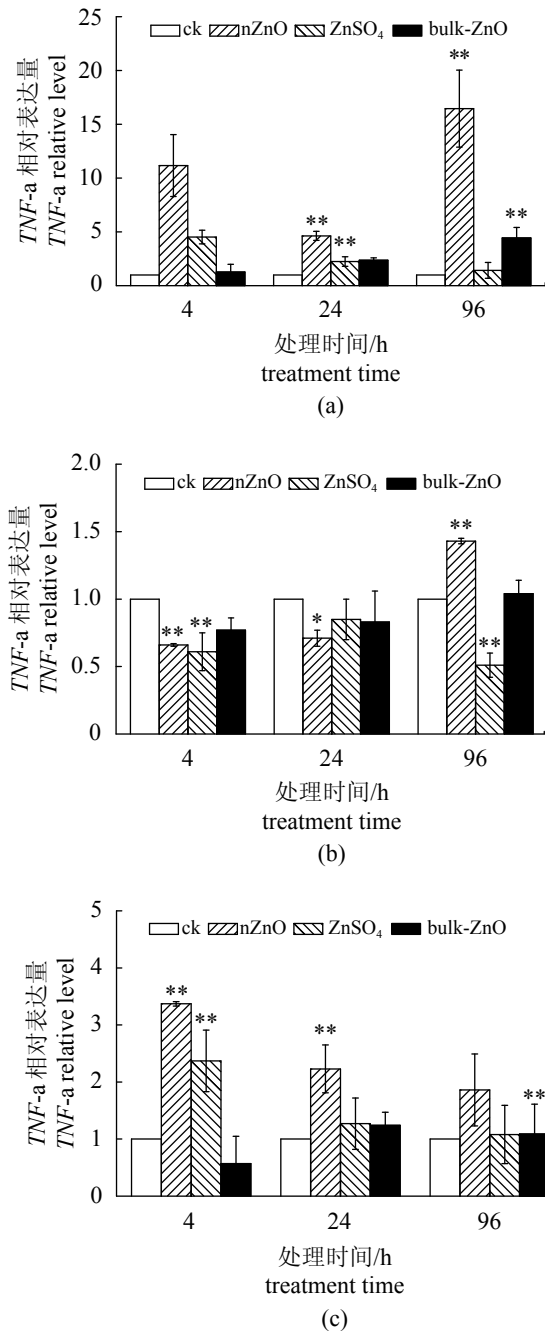


图 8 斑马鱼肝脏、肠、鳃中  $TNF-\alpha$  基因表达量变化 (a) 肝脏, (b) 肠, (c) 鳃; \* 表示各处理间差异显著 ( $P < 0.05$ ), \*\* 表示各处理差异极显著 ( $P < 0.01$ )

Fig. 8 Changes of  $TNF-\alpha$  gene expressions in the liver, intestine and gill of zebrafish

(a) liver, (b) intestine, (c) gill; \* indicates significant difference among treatments at 0.05 level, \*\* indicates significant differences among treatments at 0.01 level

( $P > 0.05$ )。纳米 ZnO、ZnSO<sub>4</sub> 处理组均鳃中  $TNF-\alpha$  mRNA 表达量在暴露 4 h 时达到最大值, 分别达到对照组的 3.37 和 2.37 倍 (图 8-c)。随着处理时间的延长, 纳米 ZnO、ZnSO<sub>4</sub> 处理组鳃中  $TNF-\alpha$  mRNA

表达量逐渐下降, 但仍高于对照组。常规 ZnO 对斑马鱼鳃中  $TNF-\alpha$  mRNA 表达量则无明显影响 ( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

#### 3.1 纳米 ZnO、常规 ZnO 和 ZnSO<sub>4</sub> 对抗氧化酶的影响

分子生物标志物的反应对于确定纳米材料的亚急性毒性和了解其毒性机制至关重要。CAT 是抗氧化防御系统中将自由基  $H_2O_2$  转化为水和氧的关键酶<sup>[15]</sup>。它对污染物非常敏感, 是环境污染预警中氧化应激信号的灵敏生物标志物。王敏等<sup>[16]</sup>研究发现, 纳米 ZnO 对鲤 (*Cyprinus carpio*) 肝组织 CAT 活性的有一定的抑制作用。纳米 ZnO、常规 ZnO 和 ZnSO<sub>4</sub> 刺激斑马鱼组织发生氧化应激, 诱导肝脏过氧化损伤, 改变 CAT 活性水平。纳米 ZnO 处理对组织产生了更明显的过氧化作用, 这与 Hao 等<sup>[17]</sup>报道的 ZnO 纳米颗粒比相同浓度的 ZnO 大颗粒及  $Zn^{2+}$  更能引起鲤鳃中 CAT 含量的升高的结果一致, 可能由于纳米颗粒的小尺寸效应和巨大比表面积, 使其与相同组成的微米颗粒相比, 具有较高的反应活性, 能产生更严重的生物毒性<sup>[18]</sup>。常规 ZnO 组 96 小时内 CAT 活性水平无显著变化, 这可能是由于大颗粒在水溶液中的聚合作用, 从而降低了它们的毒性。

谷胱甘肽 (GSH) 水平在过氧化物还原和清除自由基中起重要作用<sup>[19]</sup>。一些已发表的研究表明, 暴露于污染物后, GSH 含量会迅速升高, 而在长期或严重氧化条件下, GSH 含量会下降<sup>[20]</sup>。Khan 等<sup>[21]</sup>研究显示纳米 ZnO、纳米 TiO<sub>2</sub> 均能增加人类红细胞中的 GSH, 产生溶血现象。另有研究表明, 纳米二氧化硅进入小鼠体内在 24 和 48 h 时肝组织中的 GSH 含量降低, 进而说明生物体抗氧化能力下降<sup>[22]</sup>。在本实验中, 纳米 ZnO 处理相对于常规 ZnO 对 GSH 的影响更大, 可能是由于纳米 ZnO 具有较高的溶解度, 可释放更多的  $Zn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  能增加细胞内活性氧自由基 (ROS) 的生成, 导致机体抗氧化系统紊乱<sup>[11]</sup>, 这与 Cozzari 等<sup>[23]</sup>的研究结果类似。肠中 ZnSO<sub>4</sub> 引起了比纳米 ZnO 组和常规 ZnO 组更显著的过氧化反应, 可能由于  $Zn^{2+}$  主要在动物体的小肠内被吸收, 与血浆中白蛋白等蛋白质结合后, 通过血液循环流经机体各器官系统,  $Zn^{2+}$  含量过高会引起活性氧生成过多, 导致线粒体功能障碍, 进而引起细胞



凋亡<sup>[24]</sup>。

GST和其他生物转化酶已经被作为污染物暴露的生物标志物,并且在水污染的生物监测中大量应用<sup>[25]</sup>。GST通过结合GSH,催化各种亲电化合物向毒性物质的转化<sup>[26]</sup>。有结果表明纳米ZnO能通过氧化作用诱导产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的增加能调节GST活性的升高<sup>[1]</sup>。本研究中,起始阶段GST活性的增强,表明Ⅱ相生物转化代谢及抗氧化防御系统的激活,这可能是对应组织为了消除外源性化学物质和活性氧与GSH共轭,防止脂质过氧化的影响<sup>[27]</sup>。处理后期,GST活性受抑制,这种抑制可能是由于金属对酶的定向作用或间接通过ROS的产生引起的<sup>[28]</sup>。有研究表明,纳米ZnO颗粒和ZnCl<sub>2</sub>对斑马鱼胚胎产生了相似的氧化应激效应,抑制了胚胎孵化,认为纳米ZnO的毒性效应主要由其释放的Zn<sup>2+</sup>起作用<sup>[4]</sup>。本研究中也发现,ZnSO<sub>4</sub>处理对斑马鱼肝脏和肠中GST存在更明显的氧化作用。纳米ZnO能在溶液中释放部分Zn<sup>2+</sup>,但其释放的离子浓度低于同浓度的ZnSO<sub>4</sub>处理组,所以ZnSO<sub>4</sub>处理组对斑马鱼组织造成了更明显的毒性效应,而且肝脏和肠可能是ZnSO<sub>4</sub>毒性作用的主要靶组织。

纳米材料所产生的活性氧被认为是诱导氧化应激的一种常规机制。ROS生成和氧化应激是解释纳米毒性作用的最佳模式。Kang等<sup>[29]</sup>发现纳米ZnO引起Caco-2细胞中ROS含量增加,并且ROS含量的增加与氧化应激作用有关。纳米ZnO对斑马鱼胚胎的毒性中,发现ROS含量升高,并推测出ROS含量的增加,造成细胞膜不饱和和脂质过氧化,破坏抗氧化系统,引起抗氧化酶活性发生变化,甚至还能诱导细胞的凋亡<sup>[30]</sup>。Heinlaan等<sup>[31]</sup>研究了纳米ZnO和块状ZnO对大型蚤(*D. magna*)和仙女虾(*Thamnocephalus platyurus*)的毒性,发现纳米ZnO不需要进入到细胞便可引起毒性,使颗粒附近微环境发生变化,使金属的溶出率增加,造成细胞外产生过多ROS,使细胞膜受损。本实验中ROS能在肝脏、肠和鳃中积累,进而对组织造成损伤。纳米ZnO悬浮液及吸附在斑马鱼鳃上的纳米颗粒所产生的ROS可能会直接作用于鳃,减弱鳃组织的气体交换能力,进而对鱼体造成损伤。另外,通过饮食摄入的纳米ZnO,可在斑马鱼小肠中沉积,并且由于纳米ZnO的颗粒尺寸小,其可通过血液循环扩散到其他组织器官中。

### 3.2 纳米ZnO、常规ZnO和ZnSO<sub>4</sub>对凋亡和炎症基因的影响

细胞凋亡是机体的一种生理机制,在维持机体的环境稳定中起着重要的作用,但细胞凋亡通常会对机体产生负面影响。*Bcl-2*家族主要通过抑制线粒体的变化在细胞凋亡中起着重要作用<sup>[32]</sup>。*Bcl-2*蛋白能抑制细胞的凋亡,而*Bax*是促凋亡因子,当细胞接受凋亡信息后促凋亡因子*Bax*发生寡聚化,细胞色素C从线粒体释放到细胞质中,引起细胞凋亡<sup>[32]</sup>。*Bax*同时可激活*p53*的转录<sup>[33]</sup>。*Bcl-2/Bax*蛋白比值预测细胞是否发生凋亡,*Bcl-2/Bax*比值下降是细胞凋亡或细胞死亡的指标<sup>[34]</sup>。刘林等<sup>[35]</sup>用高浓度(25、50 mg/L)的纳米ZnO处理斑马鱼,发现肠组织中*Bcl-2*、*Bax*基因表达量增加,诱导肠组织细胞发生凋亡。一些研究报道,二氧化硅包覆的氧化锰能诱导HeLa细胞和L929细胞中*Bax*表达的增加和*Bcl-2*表达的降低,最终导致细胞周期G2/M期阻滞和细胞凋亡<sup>[36]</sup>。鲤暴露于氟中,发现肝中*Bcl-2*表达量和*Bcl-2/Bax*下降,*Bax*的表达增加<sup>[37]</sup>。污染物能影响斑马鱼脑部*Bcl-2* mRNA的表达水平<sup>[38]</sup>。*Bcl-2* mRNA的表达量的降低表明斑马鱼暴露于污染环境后,细胞可能发生凋亡。本研究中肝脏对于纳米ZnO的敏感性高于肠和鳃,肝脏可能是纳米ZnO产生毒性的主要器官,纳米ZnO对肝脏造成严重损伤,促进了细胞的凋亡。肠中*Bcl-2*表达量降低,表明斑马鱼暴露于污染环境后,肠组织细胞可能发生凋亡。一方面可能胁迫初期溶出的Zn<sup>2+</sup>对鱼类的免疫起诱导作用,而后较颗粒物沉积,使电离的Zn<sup>2+</sup>减少,刺激生物体的自身免疫反应,抑制细胞凋亡。

*TNF-α*是一种促炎症细胞因子,会因为损伤或感染表达量而增加。*TNF-α*表达量能作为先天性免疫反应<sup>[39]</sup>和组织损伤的可靠指标<sup>[40]</sup>。*TNF-α*可诱导和激活T、B淋巴细胞的分化,增强单核细胞的杀伤能力,提高中性粒细胞的溶酶体活性和吞噬能力<sup>[41]</sup>。*TNF-α*还可以诱导转录因子NK-KB的核转运,从而调控*IL-6*和*TNF-α*等炎症因子的表达。IL家族作为一类细胞因子,在炎症反应和免疫反应中具有重要的调节作用,目前已知大多数IL在免疫应答反应中都发挥免疫增强作用。在鱼类炎症反应中,*IL-6*是鱼类重要的细胞因子。有研究表明,羟基磷灰石纳米颗粒(nano-

HA)和纳米二氧化钛(nTiO<sub>2</sub>)能诱导TR146人体细胞的ROS水平升高, 并且诱导IL-6和TNF- $\alpha$ 细胞因子的表达, 并且随着处理浓度增加细胞因子的表达量也随之增加<sup>[42]</sup>。另有研究者发现, 低浓度组纳米二氧化硅能诱使PP2Ac细胞中TNF- $\alpha$ 因子表达量的下降<sup>[1]</sup>。细胞因子表达量的增加, 能参与炎症反应, 进而减轻组织损伤程度, 另一方面, 细胞因子表达量降低可能是组织中细胞中其他免疫炎症起作用或者生物体自身免疫系统发挥作用的结果。本研究也发现, 纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>均诱导肝组织中炎症因子的表达, 进而参与炎症反应, 减少不利环境对机体的损伤; 而暴露时间延迟导致炎症因子的表达量下降, 可能是大量纳米颗粒沉积造成其毒性下降, Zn<sup>2+</sup>含量过高, 激活生物体内的细胞坏死和细胞凋亡途径, 造成氧化应激效应引起细胞死亡或机体炎症<sup>[1]</sup>。炎症反应又进一步释放ROS, 造成恶性的循环最终引起机体损伤。

综上所述, 为探究纳米金属氧化物的毒性作用与其释放的离子和本身特性的关系, 利用纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>分别处理斑马鱼4、24和96 h, 利用分光光度法测定肝脏、肠和鳃中CAT活性、GSH含量、GST活性和ROS含量, 以此来揭示纳米ZnO、常规ZnO、ZnSO<sub>4</sub>对斑马鱼组织的氧化应激作用水平的差异。利用荧光定量技术检测斑马鱼肝脏、肠和鳃组织中的*Bcl-2*、*Bax*、*TNF- $\alpha$* 和*IL-6*的mRNA表达量, 用以分析3种物质对组织中炎症反应及细胞凋亡的影响。本研究发现纳米ZnO、常规ZnO和ZnSO<sub>4</sub>均引起斑马鱼鳃、肠、肝脏组织发生氧化应激反应, 同时诱导机体激活生物体内的细胞坏死和细胞凋亡途径引起细胞死亡或机体炎症。其中纳米ZnO对斑马鱼的氧化应激毒性强于常规ZnO和ZnSO<sub>4</sub>, 说明纳米颗粒本身特性是导致纳米ZnO毒性作用的主要原因, 但溶解释放的Zn<sup>2+</sup>对其毒性作用具有一定贡献。本研究结果有利于加深了解纳米材料对水生生物的毒性及毒性机理, 为建立纳米材料对生态系统的危害检测奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Willuweit A, Sass G, Schöneberg A, *et al.* Chronic inflammation and protection from acute hepatitis in transgenic mice Expressing TNF in endothelial cells[J]. *Journal of Immunology*, 2001, 167(7): 3944-3952.
- [2] Lam C W, James J T, McCluskey R, *et al.* Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation[J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 77(1): 126-134.
- [3] Fernández D, García-Gómez C, Babín M. *In vitro* evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 452-453: 262-274.
- [4] Brun N R, Lenz M, Wehrli B, *et al.* Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: Importance of zinc ions[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 476-477: 657-666.
- [5] Adam N, Schmitt C, Bruyn L D, *et al.* Aquatic acute species sensitivity distributions of ZnO and CuO nanoparticles[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 526: 233-242.
- [6] Wiench K, Wohlleben W, Hisgen V, *et al.* Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*[J]. *Chemosphere*, 2009, 76(10): 1356-1365.
- [7] Wong S W Y, Leung P T Y, Djurišić A B, *et al.* Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: Influences of aggregate size and ion solubility[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 396(2): 609-618.
- [8] Zhu X S, Zhu L, Chen Y S, *et al.* Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*[J]. *Journal of Nanoparticle Research*, 2009, 11(1): 67-75.
- [9] Manzo S, Miglietta M L, Rametta G, *et al.* Embryotoxicity and spermotoxicity of nanosized ZnO for mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 254-255: 1-9.
- [10] Srinivas A, Rao P J, Selvam G, *et al.* Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2012, 31(11): 1113-1131.
- [11] Ryu W I, Park Y H, Bae H C, *et al.* ZnO nanoparticle induces apoptosis by ROS triggered mitochondrial pathway in human keratinocytes[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 2014, 10(4): 387-391.
- [12] Yin Y, Jia J, Guo H Y, *et al.* Pyrene-stimulated reactive

- oxygen species generation and oxidative damage in *Carassius auratus*[J]. *Journal of Environmental Science and Health-Part A: Toxic/hazardous Substances and Environmental Engineering*, 2014, 49(2): 162-170.
- [13] Carvalho C D S, Bernusso V A, De Araújo H S S, *et al.* Biomarker responses as indication of contaminant effects in *Oreochromis niloticus*[J]. *Chemosphere*, 2012, 89(1): 60-69.
- [14] He J H, Gao J M, Huang C J, *et al.* Zebrafish models for assessing developmental and reproductive toxicity[J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2014, 42: 35-42.
- [15] El-Gendy K S, Radwan M A, Gad A F. *In vivo* evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides[J]. *Chemosphere*, 2009, 77(3): 339-344.
- [16] 王敏, 曹谨玲, 韩广建. 纳米氧化锌对鲤鱼肝、肾、脑cat活性的影响[J]. *淮海工学院学报(自然科学版)*, 2011, 20(3): 89-92.
- Wang M, Cao J L, Han G J. Effect of nanometer Zinc Oxides on CAT activities in liver, kidney, and brain of carps[J]. *Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition)*, 2011, 20(3): 89-92(in Chinese).
- [17] Hao L H, Chen L, Hao J M, *et al.* Bioaccumulation and sub-acute toxicity of zinc oxide nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*): A comparative study with its bulk counterparts[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013, 91: 52-60.
- [18] Berardis D B, Civitelli G, Condello M, *et al.* Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2010, 246(3): 116-127.
- [19] Weldy C S, Luttrell I P, White C C, *et al.* Glutathione (GSH) and the GSH synthesis gene *Gclm* modulate vascular reactivity in mice[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 53(6): 1264-1278.
- [20] 田文静, 白伟, 赵春禄, 等. 纳米ZnO对斑马鱼胚胎抗氧化酶系统的影响[J]. *中国环境科学*, 2010, 30(5): 705-709.
- Tian W J, Bai W, Zhao C L, *et al.* Effects of ZnO nanoparticles on antioxidant enzyme system of zebrafish embryos[J]. *China Environmental Science*, 2010, 30(5): 705-709.
- [21] Khan M, Naqvi A H, Ahmad M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic potentials of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles[J]. *Toxicology Reports*, 2015, 2: 765-774.
- [22] 靳翠红, 金一和, 王静, 等. 纳米和微米SiO<sub>2</sub>吸入染毒对大鼠氧化损伤指标的比较研究[J]. *卫生研究*, 2008, 37(1): 16-36.
- Jin C H, Jin Y H, Wang J, *et al.* Comparative study of the effect on oxidative damage in rats inhaled by nano-sized and micro-sized silicon dioxide[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2008, 37(1): 16-36(in Chinese).
- [23] Cozzari M, Elia A C, Pacini N, *et al.* Bioaccumulation and oxidative stress responses measured in the estuarine ragworm (*Nereis diversicolor*) exposed to dissolved, nano- and bulk-sized silver[J]. *Environmental Pollution*, 2015, 198: 32-40.
- [24] Wu W, Bromberg P A, Samet J M. Zinc ions as effectors of environmental oxidative lung injury[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 65: 57-69.
- [25] 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.
- [26] Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13(2): 57-149.
- [27] Paulino M G, Souza N E S, Fernandes M N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 80: 6-13.
- [28] Ahn J M, Eom H J, Yang X Y, *et al.* Comparative toxicity of silver nanoparticles on oxidative stress and DNA damage in the nematode, *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chemosphere*, 2014, 108: 343-352.
- [29] Kang T S, Guan R F, Song Y J, *et al.* Cytotoxicity of zinc oxide nanoparticles and silver nanoparticles in human epithelial colorectal adenocarcinoma cells[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2015, 60(2): 1143-1148.
- [30] Odzak N, Kistler D, Behra R, *et al.* Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media[J]. *Environmental Pollution*, 2014, 191: 132-138.
- [31] Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, *et al.* Toxicity of nanos-

- ized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(7): 1308-1316.
- [32] Zimmermann K C, Bonzon C, Green D R. The machinery of programmed cell death[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2001, 92(1): 57-70.
- [33] Li G, Bush J A, Ho V C. P53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 2000, 114(3): 514-519.
- [34] Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis[J]. *Genes & Development*, 1999, 13(15): 1899-1911.
- [35] 刘林, 赵群芬, 朱帅旗, 等. 纳米氧化锌对斑马鱼肠组织的氧化损伤[J]. *水产学报*, 2015, 39(11): 1702-1711. Liu L, Zhao Q F, Zhu S Q, *et al.* Oxidative damage of zinc oxide nanoparticles to zebrafish intestine[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(11): 1702-1711(in Chinese).
- [36] Yu C, Zhou Z G, 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.
- [37] Cao J L, Chen J, Wang J J, *et al.* Effects of fluoride on liver apoptosis and bcl-2, bax protein expression in freshwater teleost, *Cyprinus carpio*[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(8): 1203-1212.
- [38] Sarkar S, Mukherjee S, Chattopadhyay A, *et al.* Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: Expression of antioxidant genes[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2014, 107: 1-8.
- [39] Secombes C J, Wang T, Hong S, *et al.* Cytokines and innate immunity of fish[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2001, 25(8-9): 713-723.
- [40] Cho K, Adamson L K, Greenhalgh D G. Parallel self-induction of TNF- $\alpha$  and apoptosis in the thymus of mice after burn injury[J]. *Journal of Surgical Research*, 2001, 98(1): 9-15.
- [41] García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, *et al.* Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice[J]. *Hepatology*, 2006, 44(3): 581-591.
- [42] Tay C Y, Fang W R, Setyawati M I, *et al.* Nano-hydroxyapatite and nano-titanium dioxide exhibit different subcellular distribution and apoptotic profile in human oral epithelium[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2014, 6(9): 6248-6256.

## Comparative toxicity effect of nano-ZnO, bulk-ZnO, and ZnSO<sub>4</sub> on oxidative stress in zebrafish(*Danio rerio*)

LAN Lizhen , LIU Lin , MA Ningning , YE Zhuangxin , ZHAO Qunfen \*

(College of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** In order to explore the toxicity of nano ZnO and its relationship with the release of Zn<sup>2+</sup> and its own characteristics, zebrafish were exposed to the nano-ZnO, bulk-ZnO, and ZnSO<sub>4</sub> suspension for 4, 24 and 96 hours by using the acute toxicity test, and the glutathione-s-transferase (GST), catalase (CAT), and the levels of glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS), the relative expression levels of Bax, Bcl-2, TNF- alpha and IL-6 in liver, intestine and gill of zebrafish were measured. The objective of this study was to compare the the strength of oxidative stress effects of nano-ZnO, bulk-ZnO and ZnSO<sub>4</sub> in zebrafish, and discuss whether the toxicity of nano-ZnO is related to the releasing Zn<sup>2+</sup> or nanoparticles itself. Results showed that nano-ZnO, bulk-ZnO, and ZnSO<sub>4</sub> can cause oxidative stress in the tissues of zebrafish, and the nano-ZnO induced more oxidative damage than the other two forms of zinc. Consequently, we can conclude that the toxicity of nano-ZnO was higher than that of bulk-ZnO and ZnSO<sub>4</sub> on oxidative stress in zebrafish and the toxicity of nano-ZnO was mainly attributed to the nanoparticles itself.

**Key words:** *Danio rerio*; nano-ZnO; bulk-ZnO; ZnSO<sub>4</sub>; toxicity effect

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

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