

纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼的神经毒性及 *mTOR* 基因的作用

陈金, 范蓉, 张萍, 尚楠, 贺凯宏, 葛翠翠, 张玲, 牛侨, 张勤丽

山西医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 山西 太原 030001

摘要:

[背景] 纳米氧化铝 (AINPs) 由于其独特的理化特性, 在光电子学、颜料、催化剂和制陶业等领域有着广泛的应用。在生产过程中 AINPs 可能通过生产制造、加工和废料排放等途径直接或间接地进入环境中, 然而现有的毒理学信息不足以评估 AINPs 对水生生物、职业暴露人群及公众的潜在风险。

[目的] 本研究旨在探讨 AINPs 对斑马鱼幼鱼的神经毒作用及特异性敲低 *mTOR* 基因对斑马鱼幼鱼的毒作用。

[方法] 斑马鱼胚胎在受精后 6 h 分别暴露于 6.25、12.5、25.0、50.0、100 mg/L 的 AINPs 悬浊液, 各组均为 60 颗受精卵。检测幼鱼相应的运动行为学指标, 包括: 在黑暗状态下的运动能力、趋触反应、光照惊恐反应和黑暗逃避反应; 检测氧化应激指标, 包括: 超氧化物歧化酶活性、乳酸脱氢酶活性; 检测幼鱼 *mTOR* 和 *Beclin1* 基因表达变化。另设置空白对照组、阴性对照组、AINPs 组、*mTOR* 敲低组及 *mTOR* 敲低 + AINPs 组, 在斑马鱼受精卵受精后的 20~60 min 内, 暴露于 100 mg/L AINPs 悬浊液, 并在显微镜下注射反义寡核苷酸特异性敲低 *mTOR* 基因, 在受精后第 6 天检测幼鱼的运动行为学改变。

[结果] 随着 AINPs 暴露剂量逐渐加大, 斑马鱼在黑暗状态下的自发运动速率呈现逐渐减慢的趋势, 在 100 mg/L 时运动速率低于对照组 ($P=0.003$)。25、50、100 mg/L AINPs 组斑马鱼幼鱼趋触反应明显降低 ($P<0.05$)。在 50、100 mg/L 时斑马鱼幼鱼光照惊恐反应能力降低 ($P<0.05$)。在 25、50、100 mg/L 时斑马鱼幼鱼黑暗逃避反应能力降低 ($P<0.001$)。各暴露组超氧化物歧化酶活性均降低 ($P<0.001$); 12.5 mg/L 及以上组的乳酸脱氢酶活性均降低 ($P<0.05$)。25、50、100 mg/L AINPs 组 *mTOR* 基因表达均降低 ($P<0.05$), 100 mg/L AINPs 组 *Beclin1* 基因表达升高 ($P=0.003$)。与 AINPs 组相比, *mTOR* 敲低 + AINPs 组斑马鱼光照惊恐反应和黑暗逃避反应能力降低 (均 $P<0.05$)。

[结论] 斑马鱼胚胎及幼鱼暴露 AINPs 可能导致幼鱼运动行为学改变, 导致幼鱼产生氧化应激, 其机制可能与 *mTOR* 基因的表达降低有关。特异性敲低 *mTOR* 基因表达使得 AINPs 对斑马鱼幼鱼毒性增强。

关键词: 纳米氧化铝; *mTOR*; 神经毒性; 氧化应激; 基因改变; 斑马鱼

Al₂O₃ nanoparticles induced neurotoxicity and role of *mTOR* gene in zebrafish larvae CHEN Jin, FAN Rong, ZHANG Ping, SHANG Nan, HE Kai-hong, GE Cui-cui, ZHANG Ling, NIU Qiao, ZHANG Qin-li (Department of Occupational Medicine, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] Al₂O₃ nanoparticles (AINPs) are widely used in optoelectronics, pigments, catalysts, and ceramic industry because of its unique physical and chemical properties. AINPs can be released into the environment directly or indirectly during processes such as product manufacturing, processing, and waste discharge. However, available toxicological information is insufficient to assess the potential risks of AINPs to aquatic organisms, occupationally exposed populations, and the public.

[Objective] We aims to explore the neurotoxicity of AINPs on zebrafish larvae and the role of specifically knocked down *mTOR* gene in the relevant toxic effects.

[Methods] Zebrafish embryos were exposed to 6.25, 12.5, 25.0, 50.0, and 100 mg/L AINPs at 6

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18788

基金项目

国家自然科学基金项目 (81673142)

作者简介

陈金 (1990—), 男, 硕士生;
E-mail: chenjin2015@163.com

通信作者

张勤丽, E-mail: zhangql9306111@gmail.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-11-26

录用日期 2019-02-27

文章编号 2095-9982(2019)05-0431-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

陈金, 范蓉, 张萍, 等. 纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼的神经毒性及 *mTOR* 基因的作用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (5): 431-437.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18788

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Qin-li, E-mail: zhangql9306111@gmail.com

Competing interests None declared

Received 2018-11-26

Accepted 2019-02-27

►To cite

CHEN Jin, FAN Rong, ZHANG Ping, et al. Al₂O₃ nanoparticles induced neurotoxicity and role of *mTOR* gene in zebrafish larvae[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(5): 431-437.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18788

hours post-fertilization, with 60 fertilized eggs in each dose group. The testing indicators of larvae included motor behavioral indicators (locomotor activity in darkness, thigmotaxis, light-evoked startle response, and darkness-evoked escape response), oxidative stress indicators (superoxide dismutase activity and lactate dehydrogenase activity), and *mTOR* and *Beclin1* mRNA expression changes. Another batch of embryos were divided into blank control group, negative control group, AINPs group, *mTOR* knockdown group, and *mTOR* knockdown+AINPs group. In 20-60 min after fertilization, the zebrafish eggs were exposed to 100 mg/L AINPs and were injected with antisense oligonucleotides to specifically knock down *mTOR* gene under the microscope. The behavioral changes of larvae were detected on the 6th day after fertilization.

[Results] With increasing exposure dose of AINPs, the spontaneous movement velocity of zebrafish in darkness gradually decreased. The velocity in the 100 mg/L group was lower than that in the control group ($P=0.003$). Thigmotaxis was significantly lower in the 25, 50, and 100 mg/L AINPs groups ($P<0.05$). Light-evoked startle response was attenuated in the 50 and 100 mg/L groups ($P<0.05$). Darkness-evoked escape response was attenuated in the 25, 50, and 100 mg/L groups ($P<0.001$). The activity of superoxide dismutase was decreased in each exposed group ($P<0.001$); the activity of lactate dehydrogenase was decreased in the groups exposed to AINPs greater than or equal to 12.5 mg/L ($P<0.05$). The expression of *mTOR* gene was down-regulated in the 25, 50, and 100 mg/L groups of AINPs ($P<0.05$), and the expression of *Beclin1* gene was up-regulated in the 100 mg/L concentration group ($P=0.003$). The *mTOR* knockdown+AINPs group's zebrafish light-evoked startle response and darkness-evoked escape response were attenuated compared with the AINPs group ($P<0.05$).

[Conclusion] Exposure to AINPs during embryo and larvae development may cause changes in motor behavior and oxidative stress in zebrafish larvae, which may be related to decreased expression of *mTOR* gene. Specific knockdown of *mTOR* gene could enhance the toxic effect of AINPs on zebrafish larvae.

Keywords: aluminum nanoparticles; *mTOR*; embryo developmental toxicity; oxidative stress; genetic alteration; zebrafish

随着纳米粒子技术的发展, 纳米技术正朝着大规模生产和应用的方向发展, 纳米氧化铝 (Al_2O_3 nanoparticles, AINPs) 由于其独特的理化特性, 在光电子学、颜料、催化剂和制陶业等领域有着广泛的应用。在生产过程中 AINPs 可能通过生产制造、加工和废料排放等途径直接或间接地进入环境, 然而现有的毒理学信息不足以评估 AINPs 对水生生物、职业暴露人群及公众的潜在风险。研究提示, AINPs 可对水体中许多藻类产生毒作用^[1-2]。AINPs 的神经毒性具有粒径依赖性, 与微米氧化铝相比, AINPs 可以引起大鼠脑组织更严重的氧化应激反应^[3]。13 nm 粒径的 AINPs 可以引起雄性大鼠的脑、肝和肾组织损伤, 氧化应激的改变是其主要的发生机制^[4]。AINPs 还可以引起雄性小鼠抑郁样行为^[5]、与慢性阻塞性肺疾病有关的肺脏毒性^[6-7]、及促进 ICR 雄性小鼠脑中淀粉样蛋白沉积^[8]。AINPs 可对雄性小鼠生殖系统产生损伤^[9]。50 nm 的 AINPs 会对斑马鱼幼鱼早期的运动行为产生毒作用^[10]。与 50 nm 粒径的 AINPs 相比, 13 nm 的 AINPs 遗传毒作用更强^[11]。

AINPs 对幼鼠神经发育以及记忆能力有一定毒作用, 且纳米粒径越小毒作用越大^[12], 对大鼠可引起神经元发生自噬以及线粒体损伤^[13], 对小鼠可引起线粒体功能损伤、氧化应激、神经退行性变^[14]。*mTOR* 对于神经细胞自噬起关键作用, 主要通过调控凋亡和自噬通路来影响神经细胞发育^[15]。本课题组前期研究提示 50 nm 粒径的 AINPs 可导致斑马鱼体内 *mTOR*、

ULK1、*Beclin1* 等多种自噬相关基因改变, 其中 *mTOR* 基因表达降低可能起着关键作用^[16], 但其毒性机制尚不清楚。为进一步阐明 AINPs 的毒作用机制, 本研究采用行为学、氧化应激、基因改变及基因敲低相结合的方法, 从而研究 AINPs 的毒性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

产卵的亲代成年 TU 野生型斑马鱼 (中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心, 中国), 13 nm 粒径 AINPs (Sigma, 美国)。SYBR Green PCR 试剂盒 (大连宝生物, 中国), 反转录试剂盒 (康为世纪, 中国), 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 测定试剂盒 (南京建成, 中国), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒 (凯基生物, 中国), 蛋白定量试剂盒 (康为世纪, 中国), 反义寡核苷酸吗啉基 (morpholino, GENE TOOLS, 美国)。

SB25-12DTDN 超声波清洗机 (宁波新芝生物, 中国), QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国), 透射电子显微镜 (JEM-100CX, 日本), nano-ZS90 纳米粒度仪 (Malvern Panalytical, 英国), Image-pro plus 图像分析软件 (Media Cybernetics, 美国), EthoVision XT 动物运动跟踪系统 (Noldus Information Technology, 荷兰), DanioVision 斑马鱼行为轨迹跟踪系统 (Noldus Information Technology, 荷兰), BioSpectrometer 分光光度计 (Eppendorf, 德国), ZXS-1090 真彩触摸屏生

化培养箱(上海智城, 中国)。

1.2 AINPs悬浊液的制备

AINPs 常温下为白色粉末状固体, 不溶于水, 表面积为 $85\sim 115\text{ m}^2/\text{g}$, 熔点为 2040°C , 初沸点为 2980°C , 相对分子质量为 101.96, pH 为 4.5~5.5, 纯度为 99.8%。将 AINPs 溶于斑马鱼胚胎培养液 (5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.33 mmol/L CaCl_2 和 0.33 mmol/L $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 为 7.2), 悬浊液经过 30 min 超声混匀后, 吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 滴到有炭膜的铜网上, 待铜网干燥后, 在透射电镜 (transmission electron microscope, TEM) 下观察粒子分散情况, 加速电压为 80 kV。用图像分析软件对 AINPs 悬浊液的 TEM 结果分析平均粒径; 在 25°C 左右, 用纳米粒度仪检测超声混匀的 AINPs 悬浊液的 Zeta 电位。

1.3 神经毒性实验

1.3.1 分组及染毒 AINPs 毒性测定包括 5 个剂量组 (6.25、12.5、25.0、50.0、100 mg/L) 和 1 个对照组。实验组在胚胎受精 6 h 后 (6 hour post-fertilization, 6 hpf) 暴露于不同浓度的 AINPs 悬浊液, 每组 60 颗受精卵, 并每天更换 AINPs 悬浊液; 对照组只加入斑马鱼胚胎培养液, 实验在 28.5°C 的培养箱中进行, 并给予 14/10 h 光/暗循环。

1.3.2 行为分析 在斑马鱼幼鱼 144 hpf 后进行行为学分析实验, 用动物运动跟踪软件分析幼鱼游动视频。通过软件以每秒 25 帧的跟踪速率从视频量化鱼类运动参数, 包括平均速率、总移动距离和实验设定的 24 微孔板外圈活动累积时间百分比等。实验的 24 微孔板模型设置如图 1 所示, 斑马鱼幼鱼可以在每个孔中自由游动, 其游动轨迹被箱体内部的摄像机记录并传入计算机, 由 DanioVision 软件记录并分析。光照条件设置: 首先 3 min 黑暗 (0 lux), 然后 1 min 光照 (100 lux), 最后再 3 min 黑暗期 (0 lux)。

斑马鱼幼鱼趋触性反应能力用幼鱼在 24 微孔板中每一个小孔中观察区外圈的累积持续时间百分比表示; 斑马鱼在黑暗状态的平均速率与光照 1 min 的平均速率之差, 为光照惊恐反应的速度变化; 斑马鱼在光照状态的平均速率与转入黑暗状态 1 min 的平均速率之差的相反数, 为黑暗逃避反应速度变化。

1.3.3 生化分析 收集 144 hpf 的斑马鱼幼鱼并制备幼鱼匀浆液, 严格按照 SOD、LDH 和 BCA 蛋白定量试剂盒的说明书操作, 测定其组织 SOD 和 LDH 的活性, 并重复测定 3 次。

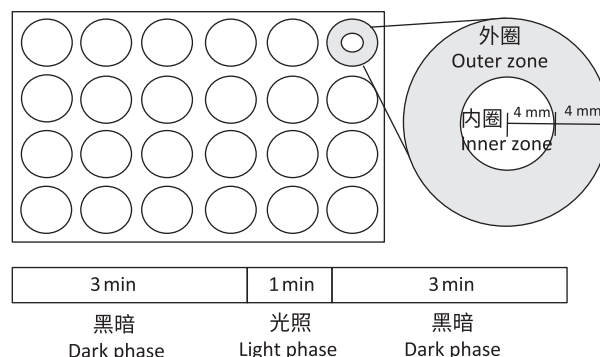


图 1 斑马鱼幼鱼行为实验的时间示意图

Figure 1 Schematic diagram of the behavioral experimental design of zebrafish larvae

1.3.4 RNA 分离和实时荧光定量 PCR 检测 提取斑马鱼幼鱼体内 mRNA, 用反转录试剂盒反转录成 cDNA。使用 SYBR Green PCR 试剂盒进行定量 PCR, 并使用 QuantStudio 3 实时荧光定量 PCR 仪进行分析。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法^[17] 分析测试基因的倍数变化。*mTOR*、*Beclin1* 和 *actin* 的引物序列如下: *actin* 正向引物 5'-CGGGTGGATTGACACTTT-3', 反向引物 5'-CTCCCTGAGTCTGGGTCGTC-3'; *Beclin1* 正向引物 5'-GCTCTGCTCCGTTAGTGA-3', 反向引物 5'-GAGCCACGCCATCTTGTTTG-3'; *mTOR* 正向引物 5'-GAAGGTGGAAGTGTTTGAGC-3', 反向引物 5'-TAGCGAGCGTGTGTAGTTG-3'。

1.4 mTOR 基因敲低实验

1.4.1 分组及染毒 将收集到的 20 min 内的斑马鱼受精卵洗净后, 选取颗粒饱满的受精卵放于培养皿中, 并在受精后 20~60 min 内, 特异性敲低 *mTOR* 基因。实验共分为 5 组, 每组 100 颗斑马鱼受精卵。空白对照组, 只加入斑马鱼胚胎培养液; 阴性对照组, 每颗受精卵在显微镜下注射 $8\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的反义寡核苷酸 morpholino 阴性对照样品 (5'-CCTCTTACCTCAGACAATTATA-3') 500 pL; *mTOR* 敲低组, 每颗受精卵在显微镜下注射 $8\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 *mTOR* 基因敲低样品 (5'-CAGCGGAGATGCAGATCTCAGTA-3') 500 pL; AINPs 组, 加入用斑马鱼胚胎培养液配制好的 100 mg/L 的 AINPs 悬浊液; *mTOR* 敲低 + AINPs 组, 每颗受精卵在显微镜下注射 $8\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 morpholino *mTOR* 基因敲低样品 500 pL, 并加入 100 mg/L 的 AINPs 悬浊液。每天更换新制备的培养液。

1.4.2 行为分析及基因检测 144 hpf 时, 对斑马鱼幼鱼进行游动行为和基因改变分析, 方法见“1.3.2”及“1.3.4”。

1.5 统计学分析

采用统计分析软件SPSS 17.0对数据进行分析,计量数据描述采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态性检验采用Shapiro-Wilk检验,方差齐性检验采用Levene检验。组间差异比较采用单因素方差分析结合LSD-t检验,不满足正态或方差不齐采用秩检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 AINPs的表征

AINPs悬浊液经过30 min超声混匀后的TEM结果如图2所示,悬浊液中的AINPs颗粒呈现出多边形形态并且没有明显聚集。用图像分析软件对AINPs悬浊液的TEM结果进行分析,结果显示其平均粒径为 (20.9 ± 9.5) nm,用纳米粒度仪检测其Zeta电位为 (49.4 ± 2.2) mV。

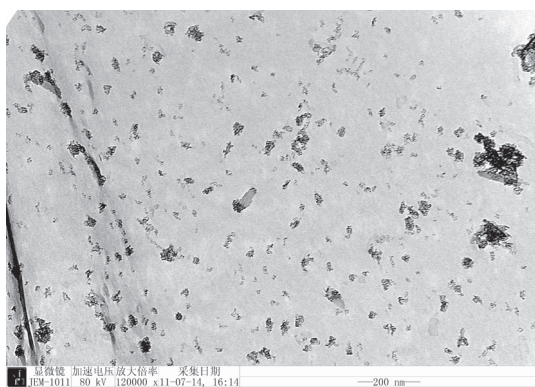


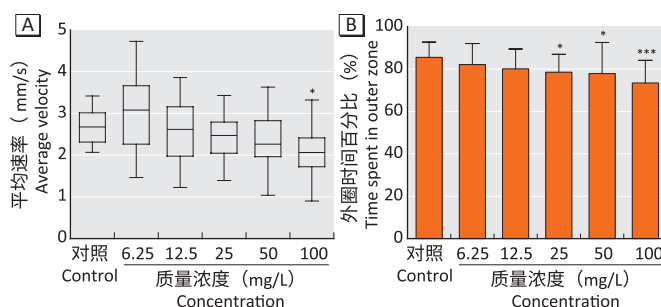
图2 TEM观察AINPs悬浊液经超声处理后的分散情况($\times 120\,000$)

Figure 2 TEM observation of dispersion of AINPs suspension after sonication

2.2 AINPs对斑马鱼胚胎的神经毒性

2.2.1 一般毒作用 将近90%的斑马鱼胚胎在72 hpf后孵化出幼鱼,各剂量组的累积孵化率与对照组相比差异无统计学意义。暴露于不同剂量AINPs至144 hpf时斑马鱼幼鱼的存活率与对照组相比差异无统计学意义。

2.2.2 行为学变化 暴露于不同剂量AINPs的斑马鱼在黑暗状态下的运动能力见图3A所示,各组差异有统计学意义($F=4.985$, $P=0.003$)。随AINPs质量浓度的增大,染毒组呈现出运动速率逐渐降低的趋势,在100 mg/L时速率低于对照组($P=0.003$)。黑暗状态下趋触反应如图3B所示,各组间差异有统计学意义($F=2.900$, $P=0.016$)。与对照组相比,AINPs大于等于25 mg/L时,染毒组趋触反应能力降低($P<0.05$)。



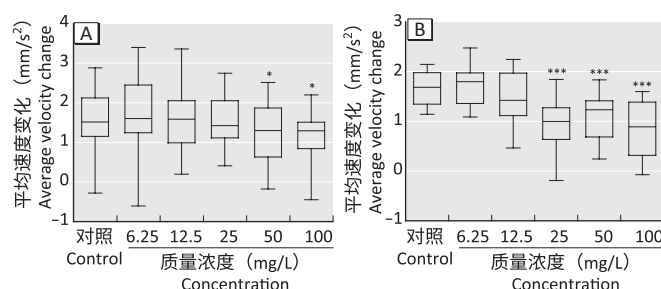
[注] 与对照组比较, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$ 。

[Note] Compared with the control group, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$.

图3 暴露于不同浓度AINPs的斑马鱼在黑暗状态下的运动速率(A)及趋触反应(B) ($n=24$)

Figure 3 The velocity of movement in darkness (A) and thigmotaxis (B) of zebrafish exposed to designed concentrations of AINPs

斑马鱼胚胎受精144 h后,测得光照惊恐反应如图4A所示,各组间差异有统计学意义($F=2.383$, $P=0.041$)。与对照组比较,AINPs在50、100 mg/L时,幼鱼对光照反应能力降低($P<0.05$)。黑暗逃避反应如图4B所示,各组间差异有统计学意义($F=16.780$, $P<0.001$)。与对照组比较,AINPs大于等于25 mg/L时,幼鱼对黑暗逃避能力降低($P<0.001$)。



[注] 与对照组比较, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$ 。

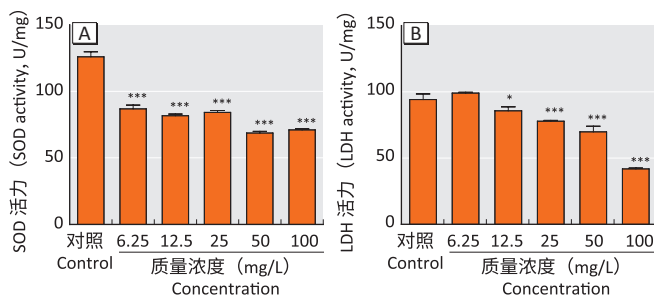
[Note] Compared with the control group, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$.

图4 暴露于不同浓度AINPs的斑马鱼的光照惊恐反应(A)及黑暗逃避反应(B) ($n=24$)

Figure 4 The light-evoked startle response (A) and darkness-evoked escape response (B) of zebrafish exposed to designed concentrations of AINPs

2.2.3 氧化应激及基因改变 斑马鱼幼鱼的SOD活性如图5A所示,各组间幼鱼SOD活性差异有统计学意义($F=93.910$, $P<0.001$)。与对照组相比,各暴露组斑马鱼幼鱼体内SOD活性均降低($P<0.001$)。LDH活性见图5B,各组间幼鱼LDH活性差异有统计学意义($F=53.208$, $P<0.001$)。AINPs ≥ 12.5 mg/L时LDH活性均降低($P<0.05$)。荧光定量PCR测定结果显示,各组间幼鱼mTOR基因表达差异有统计学意义($F=3.518$, $P=0.034$)。与对照组相比,AINPs ≥ 25 mg/L时mTOR基因表达均降低($P<0.05$)。且在100 mg/L时,mTOR基

因表达下调42.97%。各组间幼鱼 *Beclin1* 基因表达差异有统计学意义 ($F=4.504$, $P=0.015$), AINPs 在 100 mg/L 时其表达升高 ($P<0.05$)。见图 6。

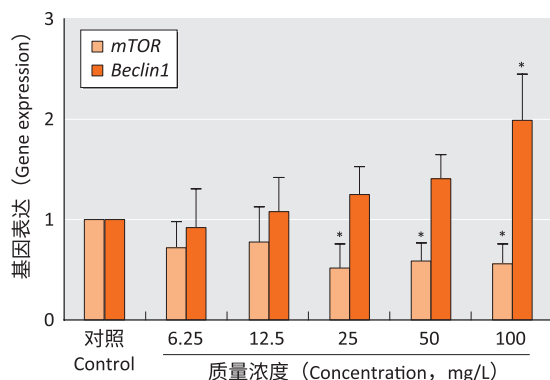


[注] 与对照组比较, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$ 。

[Note] Compared with the control group, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$.

图 5 暴露于不同浓度 AINPs 的斑马鱼幼鱼体内的 SOD 活性 (A) 和 LDH 活性 (B) ($n=6$)

Figure 5 SOD activity (A) and LDH activity (B) in zebrafish larvae exposed to designed concentrations of AINPs



[注] * : 与对照组比较, $P<0.05$ 。

[Note] * : Compared with the control group, $P<0.05$.

图 6 暴露于不同浓度 AINPs 的斑马鱼幼鱼体内 *mTOR* 和 *Beclin1* 基因表达情况 ($n=6$)

Figure 6 The expression of *mTOR* and *Beclin1* genes in zebrafish larvae exposed to designed concentrations of AINPs

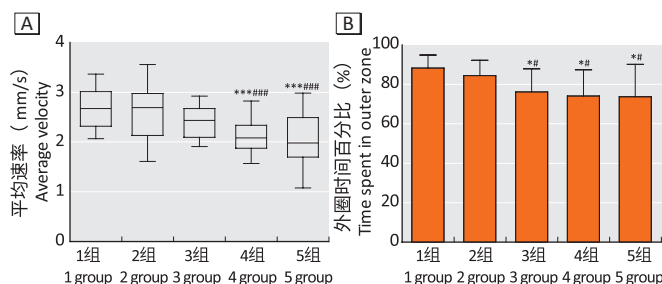
2.3 *mTOR* 基因敲低

2.3.1 *mTOR* 基因敲低效果 *mTOR* 基因敲低后: 与阴性对照组相比, *mTOR* 基因敲低组幼鱼体内 *mTOR* 基因表达下调31.97% ($P<0.001$); 与正常对照组相比, 幼鱼体内 *mTOR* 基因表达下调39.07% ($P<0.001$)。

2.3.2 *mTOR* 敲低后行为学改变 *mTOR* 基因敲低后, 各组间斑马鱼胚胎孵化率差异有统计学意义 ($F=2.776$, $P=0.036$)。 *mTOR* 敲低+AINPs 组存活率低于空白对照组、阴性对照组及 AINPs 组 ($P<0.001$)。

斑马鱼黑暗状态下的运动能力如图 7A 所示, 各组间差异有统计学意义 ($F=7.139$, $P<0.001$)。与阴性对照组、空白对照组比较, AINPs 组和 *mTOR* 敲低+AINPs 组黑暗状态下运动能力均降低 ($P<0.001$); *mTOR* 敲低+AINPs 组与 AINPs 组比较, 差异无统计学意义。

趋触反应改变如图 7B 所示, 各组间差异有统计学意义 ($F=3.721$, $P=0.007$)。与阴性对照组、空白对照组比较, *mTOR* 敲低组、AINPs 组和 *mTOR* 敲低+AINPs 组趋触反应均降低 ($P<0.05$); *mTOR* 敲低+AINPs 组与 AINPs 组比较, 差异无统计学意义。



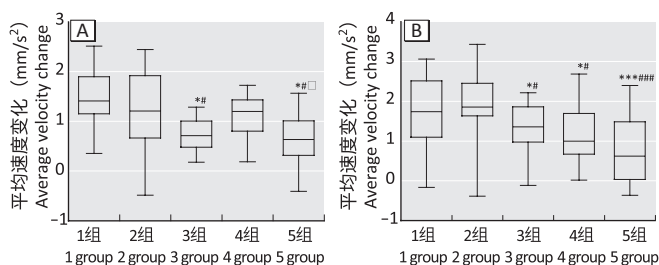
[注] 与阴性对照组比较, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$ 。与空白对照组比较, # : $P<0.05$; ### : $P<0.001$ 。1组: 空白对照; 2组: 阴性对照; 3组: *mTOR* 敲低; 4组: AINPs; 5组: *mTOR* 敲低+AINPs。

[Note] Compared with the negative control group, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$. Compared with the blank control group, # : $P<0.05$; ### : $P<0.001$. 1 group: Blank control; 2 group: Negative control; 3 group: *mTOR* knockdown; 4 group: AINPs; 5 group: *mTOR* knockdown+AINPs.

图 7 *mTOR* 基因敲低后斑马鱼幼鱼在黑暗状态下的运动能力 (A) 及趋触反应能力 (B) ($n=24$)

Figure 7 The velocity of movement in darkness (A) and thigmotaxis (B) of zebrafish larvae after *mTOR* knock down

光照惊恐反应能力 (图 8A) 和黑暗逃避反应能力 (图 8B) 比较结果显示, 各实验组间差异均有统计学意义 ($F=7.422$ 和 6.745 , 均 $P<0.001$)。光照惊恐反应能力: 与阴性对照、空白对照组比较, *mTOR* 敲低组和 *mTOR* 敲低+AINPs 组均降低 ($P<0.05$); 与 AINPs 组比



[注] 与阴性对照组比较, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$ 。与空白对照组比较, # : $P<0.05$; ### : $P<0.001$ 。□ : 与 AINPs 组比较, $P<0.05$ 。1组: 空白对照; 2组: 阴性对照; 3组: *mTOR* 敲低; 4组: AINPs; 5组: *mTOR* 敲低+AINPs。

[Note] Compared with the negative control group, * : $P<0.05$; *** : $P<0.001$. Compared with the blank control group, # : $P<0.05$; ### : $P<0.001$. □ : Compared with the AINPs group, $P<0.05$. 1 group: Blank control; 2 group: Negative control; 3 group: *mTOR* knockdown; 4 group: AINPs; 5 group: *mTOR* knockdown+AINPs.

图 8 *mTOR* 基因敲低后斑马鱼幼鱼的光照惊恐反应 (A) 和黑暗逃避反应 (B) ($n=24$)

Figure 8 The light-evoked startle response (A) and darkness-evoked escape response (B) of zebrafish larvae after *mTOR* gene knockdown

较, *mTOR* 敲低 + AINPs 组降低 ($P < 0.05$)。黑暗逃避反应能力: 与阴性对照、空白对照组比较, *mTOR* 敲低组、AINPs 组和 *mTOR* 敲低 + AINPs 组均降低 ($P < 0.05$); 与 AINPs 组比较, *mTOR* 敲低 + AINPs 组存活率降低 ($P < 0.001$)。

3 讨论

斑马鱼具有饲养成本低、繁殖周期短、体外受精且胚胎透明等优点, 斑马鱼胚胎在研究纳米毒物的发育毒性、氧化应激等方面都较为理想^[18]。本研究用斑马鱼胚胎暴露于不同剂量的 AINPs, 以阐明 AINPs 毒性的剂量反应关系及确定可能的毒性机制。不同种类的纳米金属颗粒对斑马鱼及其胚胎有不同程度的毒性。例如纳米二氧化钛可导致斑马鱼胚胎孵化时间改变及孵化率降低^[19-20]。本研究发现, 暴露于 AINPs 后, 大多数斑马鱼胚胎在 48~60 hpf 之间孵化, 其孵化时间和孵化率方面均没有明显影响, 提示斑马鱼胚胎时期暴露于 AINPs 所产生的毒作用具有一定的隐匿性, 仅通过孵化时间和孵化率指标不容易发现。

本研究发现, 斑马鱼幼鱼在黑暗状态下的运动速率随 AINPs 剂量的增大呈现逐渐降低的趋势, 说明 AINPs 对斑马鱼幼鱼具有剂量依赖性毒性, 斑马鱼首先产生低剂量兴奋效应, 然后再随着剂量加大毒性效应逐渐增加。据文献报道, 斑马鱼胚胎受精后 96 h 将幼鱼暴露于纳米铜和纳米银颗粒 4 h 能降低斑马鱼的趋触性反应^[21], 趋触性可反映幼鱼的紧张程度^[22]。本研究发现, 随着 AINPs 剂量的增加, 斑马鱼幼鱼趋触性反应明显降低。怀疑 AINPs 暴露导致幼鱼紧张度下降和对幼鱼神经系统有一定毒性。

本研究发现, 50、100 mg/L AINPs 暴露导致幼鱼由黑暗状态突然转向光照状态后表现出游动速率变慢, 提示幼鱼光照惊恐反应能力受损。幼鱼在由光照状态突然转向黑暗状态时, 25、50、100 mg/L AINPs 暴露导致幼鱼游动速率变慢, 提示幼鱼黑暗逃避反应降低。幼鱼对强光和黑暗的反应能力主要受中枢神经系统支配, 提示 AINPs 可能对中枢神经产生毒作用, 从而导致幼鱼对光照和黑暗反应的能力下降。

据文献报道, 纳米 TiO_2 可导致斑马鱼幼鱼神经系统损坏^[23], 产生活性氧及下丘脑细胞死亡^[24]。本研究发现 AINPs 暴露的斑马鱼幼鱼体内 SOD 和 LDH 活性均降低, 说明 AINPs 颗粒暴露可能引起氧化应激, 导致炎症反应。*mTOR* 基因主要通过调控凋亡和自噬通

路来影响神经细胞发育^[15]。AINPs 导致神经细胞损伤的方式主要为引发神经细胞自噬。检测发现 25、50、100 mg/L AINPs 暴露组幼鱼体内 *mTOR* 基因表达降低, 从而可导致神经细胞受损。*Beclin1* 基因是引发细胞自噬的关键基因, 本研究发现暴露 AINPs 可导致斑马鱼幼鱼体内自噬基因 *Beclin1* 的表达上调及产生幼鱼神经行为毒作用, 提示斑马鱼体内神经细胞可能发生自噬从而导致幼鱼表现出运动神经行为受损。通过特异性敲低斑马鱼胚胎 *mTOR* 基因使得 AINPs 对斑马鱼幼鱼毒性增强, 说明 *mTOR* 基因可能在 AINPs 致斑马鱼幼鱼毒作用的机制中起着重要的作用。本研究提示 *mTOR* 基因表达降低可能导致神经细胞自噬的发生, 从而导致幼鱼行为学改变。

综上所述, 斑马鱼胚胎和幼鱼早期阶段是斑马鱼发育的重要阶段, 对于研究 AINPs 的神经毒性及胚胎发育毒性斑马鱼相对于其他哺乳动物有较多的优势, 如繁殖周期短、单次产卵多和饲养成本低等。斑马鱼早期胚胎及幼鱼透明的特性, 对于直接观察斑马鱼的内脏器官形态发育也有一定优势。本研究发现 AINPs 可能导致斑马鱼发育毒性, 诱导氧化应激, 并可能导致一些重要的基因表达发生改变。但是本研究对斑马鱼运动行为学检测指标不够全面, 对 AINPs 是怎样导致斑马鱼氧化损伤和基因改变的研究还不够深入, 对于 *mTOR* 基因表达降低的具体机制也需要进一步研究, 因此 AINPs 对斑马鱼的神经毒性机制仍待进一步研究。

参考文献

- [1] MA S, ZHOU K, YANG K, et al. Heteroagglomeration of oxide nanoparticles with algal cells: effects of particle type, ionic strength and pH [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49 (2): 932-939.
- [2] YE N, WANG Z, WANG S, et al. Dissolved organic matter and aluminum oxide nanoparticles synergistically cause cellular responses in freshwater microalgae [J]. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2018, 53 (7): 651-658.
- [3] MIRSHAFA A, NAZARI M, JAHANI D, et al. Size-dependent neurotoxicity of aluminum oxide particles: a comparison between nano- and micrometer size on the basis of mitochondrial oxidative damage [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2018, 183 (2): 261-269.
- [4] MORSY G M, ABOU E K, ALI A A. Studies on fate and toxicity

- of nanoalumina in male albino rats : oxidative stress in the brain, liver and kidney [J] . *Toxicol Ind Health*, 2016, 32 (2) : 200-214.
- [5] ZHANG X, XU Y, ZHOU L, et al. Sex-dependent depression-like behavior induced by respiratory administration of aluminum oxide nanoparticles [J] . *Int J Environ Res Public Health*, 2015, 12 (12) : 15692-15705.
- [6] LI X, YANG H, WU S, et al. Suppression of PTPN6 exacerbates aluminum oxide nanoparticle-induced COPD-like lesions in mice through activation of STAT pathway [J] . *Part Fibre Toxicol*, 2017, 14 (1) : 53.
- [7] LI X, ZHANG C, BIAN Q, et al. Integrative functional transcriptomic analyses implicate specific molecular pathways in pulmonary toxicity from exposure to aluminum oxide nanoparticles [J] . *Nanotoxicology*, 2016, 10 (7) : 957-969.
- [8] SHAH S A, YOON G H, AHMAD A, et al. Nanoscale-alumina induces oxidative stress and accelerates amyloid beta (A β) production in ICR female mice [J] . *Nanoscale*, 2015, 7 (37) : 15225-15237.
- [9] 丁勇, 杨川丽, 陈佳慧, 等. 纳米氧化铝致雄性小鼠生殖系统损害 [J] . *毒理学杂志*, 2015, 29 (3) : 177-180.
- [10] 贺凯宏, 尚楠, 陈建平, 等. 纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼早期运动行为的影响 [J] . *生态毒理学报*, 2018, 13 (3) : 165-171.
- [11] ZHANG Q, WANG H, GE C, et al. Alumina at 50 and 13 nm nanoparticle sizes have potential genotoxicity [J] . *J Appl Toxicol*, 2017, 37 (9) : 1053-1064.
- [12] 丁勇. 纳米氧化铝致小鼠神经发育毒性及其机制初探 [D] . 太原 : 山西医科大学, 2015.
- [13] 常丽俊, 郭卫伟, 葛翠翠, 等. 纳米氧化铝对新生 Wistar 乳大鼠皮质神经元线粒体自噬的影响 [J] . *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28 (5) : 737-742.
- [14] LI X, ZHANG C, ZHANG X, et al. An acetyl-L-carnitine switch on mitochondrial dysfunction and rescue in the metabolomics study on aluminum oxide nanoparticles [J] . *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13 : 4.
- [15] XU J, HUAI Y, MENG N, et al. L-3-n-butylphthalide activates Akt/*mTOR* signaling, inhibits neuronal apoptosis and autophagy and improves cognitive impairment in mice with repeated cerebral ischemia-reperfusion injury [J] . *Neurochem Res*, 2017, 42 (10) : 2968-2981.
- [16] 贺凯宏. *mTOR* 信号分子在纳米氧化铝致斑马鱼幼鱼早期神经行为损伤中的作用 [D] . 太原 : 山西医科大学, 2018.
- [17] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 Method [J] . *Methods*, 2001, 25 (4) : 402-408.
- [18] JOHNSTON H J, VERDON R, GILLIES S, et al. Adoption of in vitro systems and zebrafish embryos as alternative models for reducing rodent use in assessments of immunological and oxidative stress responses to nanomaterials [J] . *Crit Rev Toxicol*, 2018, 48 (3) : 252-271.
- [19] SAMAE SM, MANTEGHI N, YOKEL RA, et al. Morphometric characteristics and time to hatch as efficacious indicators for potential nanotoxicity assay in zebrafish [J] . *Environ Toxicol Chem*, 2018, 37 (12) : 3063-3076.
- [20] SHIH Y J, SU C C, CHEN C W, et al. Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching [J] . *Chemosphere*, 2016, 154 : 109-117.
- [21] MCNEIL P L, BOYLE D, HENRY T B, et al. Effects of metal nanoparticles on the lateral line system and behaviour in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) [J] . *Aquat Toxicol*, 2014, 152 : 318-323.
- [22] SCHNÖRR S J, STEENBERGEN P J, RICHARDSON M K, et al. Measuring thigmotaxis in larval zebrafish [J] . *Behav Brain Res*, 2012, 228 (2) : 367-374.
- [23] MIAO W, ZHU B, XIAO X, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on lead bioconcentration and toxicity on thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae [J] . *Aquat Toxicol*, 2015, 161 : 117-126.
- [24] HU Q, GUO F, ZHAO F, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles exposure on parkinsonism in zebrafish larvae and PC12 [J] . *Chemosphere*, 2017, 173 : 373-379.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 王晓宇 ; 校对 : 汪源)