

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160305003

刘源, 陈法军, 周可新. 纳米二氧化硅对两性生殖和孤雌生殖卤虫无节幼体毒性影响的比较研究[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(5): 86-93

Liu Y, Chen F J, Zhou K X. Comparative study on the toxicity of nano-SiO₂ on nauplii of amphigenetic *Artemia francisana* and parthenogenetic *Artemia parthenogenetica* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(5): 86-93 (in Chinese)

纳米二氧化硅对两性生殖和孤雌生殖卤虫无节幼体毒性影响的比较研究

刘源^{1,2}, 陈法军¹, 周可新^{2,*}

- 1. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095
- 2. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042

收稿日期: 2016-03-05 录用日期: 2016-05-04

摘要: 研究了纳米二氧化硅(Nano-SiO₂)悬浮液对美国大盐湖两性生殖型卤虫(*Artemia francisana*, GSL)和渤海湾孤雌生殖型卤虫(*Artemia parthenogenetica*, BH)无节幼体的急性毒性和抗氧化酶系统的影响。研究表明, Nano-SiO₂对 GSL 和 BH 无节幼体 24 h-LC₅₀ 分别为 23.02 mg·mL⁻¹和 20.96 mg·mL⁻¹, 属低级毒性。Nano-SiO₂降低了 GSL 和 BH 无节幼体还原型谷胱甘肽(GSH)含量, 抑制了过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 致丙二醛(MDA)含量升高, 表明氧化应激反应是导致 Nano-SiO₂对卤虫无节幼体致死的作用机制之一。

关键词: 纳米二氧化硅; 两性生殖卤虫; 孤雌生殖卤虫; 急性毒性; 氧化损伤

文章编号: 1673-5897(2016)5-086-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Comparative Study on the Toxicity of Nano-SiO₂ on Nauplii of Amphigenetic *Artemia francisana* and Parthenogenetic *Artemia parthenogenetica*

Liu Yuan^{1,2}, Chen Fajun¹, Zhou Kexin^{2,*}

- 1. College of Plant Protection, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China
- 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China

Received 5 March 2016 accepted 4 May 2016

Abstract: This paper investigated the acute toxicity of Nano-SiO₂ suspension to the Great Salt Lake bisexual *Artemia* (*Artemia francisana*, GSL) nauplii and the Bohai Bay parthenogenetic *Artemia* (*Artemia parthenogenetica*, BH) nauplii as well as the effects on their antioxidant systems. The results showed that 24 h-LC₅₀ of Nano-SiO₂ to GSL and BH nauplii were 23.02 mg·mL⁻¹ and 20.96 mg·mL⁻¹ respectively. Nano-SiO₂ reduced glutathione (GSH) contents in GSL and BH nauplii, inhibited their catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, increased malondialdehyde (MDA) contents, suggesting that oxidative stress was one of the lethal mechanisms of Nano-SiO₂ on *Artemia* nauplii.

Keywords: Nano-SiO₂; *Artemia francisana*; *Artemia parthenogenetica*; acute toxicity; oxidative damage

基金项目: 环保公益性行业科研专项资助(201309049)

作者简介: 刘源(1990-), 女, 硕士, 研究方向为水生态毒理学, E-mail: vainy21@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: zkx@nies.org

纳米二氧化硅(Nano-SiO₂)呈无定型白色粉末状,在自然界中广泛存在,是一种重要的高科技超微细(1~100 nm)无机新材料,具有良好的稳定性、易散性和融变性,广泛应用于环保、生物医学、涂料及生物技术等多个领域^[1-2]。随着纳米产业的发展,人体接触 Nano-SiO₂颗粒的机会大大增加。Nano-SiO₂颗粒可通过呼吸系统、皮肤接触以及饮食摄入等途径进入人体^[3-4],产生一定的生物效应。随着 Nano-SiO₂的广泛应用,其生物毒性效应引起国内外广泛关注。

Nano-SiO₂能引起实验小鼠的肺部毒性,并对抗氧化和脂质过氧化系统损害严重,引起严重的肺部急性损伤,导致肺纤维化、矽肺甚至肺癌;同时,还可能引起遗传物质的畸变或损伤^[5-6]。目前关于 Nano-SiO₂毒性效应的研究主要集中在哺乳动物上,对水生生物的影响研究相对较少。有学者以大型溞为模式生物研究了 Nano-SiO₂的生物毒性效应,发现大型溞对 Nano-SiO₂具有吸附和摄取能力,且其毒性相对较低,24 h-EC₅₀和 LC₅₀分别仅为 148.87 mg·L⁻¹和 660.94 mg·L⁻¹^[7]。

卤虫个体小,对环境变化反应灵敏,并对药物的毒性敏感等;此外,该虫易于获得并可长期保存,易于在实验室大量培养繁殖等。因此,卤虫被广泛地应用于生态毒理学和水体环境污染物的毒性评价研究中^[8]。在关于卤虫对纳米材料的生物监测研究中,近期有结果表明纳米聚苯乙烯会削弱卤虫的摄食、运动及幼体的生理学行为^[9],另有研究表明,Nano-PbO 会抑制细胞生长,将卤虫暴露在 Nano-PbO 悬剂中会导致其死亡^[10]。本试验以营两性生殖的入侵型美国大盐湖卤虫(*Artemia francisana* GSL)和营孤雌生殖的渤海湾本土卤虫(*Artemia parthenogenetica* BH)为对象,研究 Nano-SiO₂对 2 种卤虫无节幼体的急性毒性效应,通过测定胚胎中主要抗氧

化物含量和酶活性等研究 Nano-SiO₂暴露对其抗氧化系统的影响,并探讨 Nano-SiO₂对 2 种卤虫环境毒性的作用机理。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 供试卤虫

本实验以美国大盐湖和我国渤海湾盐场产的 2 种卤虫休眠卵作为试验材料,具体情况见表 1。

1.2 卤虫休眠卵的孵化方法及培养条件

孵化之前,分别对美国大盐湖卤虫(简称 GSL)休眠卵和渤海湾盐场卤虫(简称 BH)休眠卵(下文均用简称)2 种卤虫卵进行消毒处理,即将卤虫卵浸泡于 300 mg·L⁻¹ KMnO₄溶液中 5 min,再用人工海水充分冲洗至无色为止,然后分别取 1 g 卤虫卵加入 1 L 盐度为 35‰、pH 为 8.0 的人工海水中,并置于光照培养箱中孵化,温度控制为(27±0.5)℃、光周期为 16 h 光期:8 h 暗期、光照强度为 20 000 lux。孵化过程中,要不断地用充氧泵充气,充入的 CO₂可调节控制酸化条件,充入的 O₂可防止虫卵及孵化出的无节幼体因积聚而导致缺氧死亡。待卤虫卵孵化形成无节幼体之后,收集卤虫无节幼体,并将收集到的卤虫无节幼体置于 5 L 透明玻璃缸中培养,培养过程中用杜氏盐藻作为饲料饲养卤虫。由于 BH 卤虫具有孤雌和两性 2 种生殖方式,而实验中仅需要孤雌生殖卤虫,因此实验之前要进行区分,待卤虫孵化生长至可区分雌雄时,将未交配的雌体与雄体隔离开来分别饲养,当未交配雌体的卵囊开始明显并充满虫卵时,立即随机选取未交配的雌体置于盛有约 100 mL 水体的玻璃杯中单独培养,培养时间在 2 周以上,在单独培养期间产生后代的雌体被判定为孤雌体,即可用作实验用孤雌 BH 卤虫。

1.3 试剂与仪器

试验采用粒径为 20 nm 的 SiO₂,纯度>99.9%,

表 1 不同品系卤虫休眠卵
Table 1 Diapause eggs of different types of tested *Artemia*

品系 Strain	简称 Short name	国家 Country	产地 Producing area	生殖方式 Reproductive mode
大盐湖卤虫 the Great Salt Lake <i>Artemia</i>	GSL	美国 USA	犹他州 Utah	两性生殖 Amphigenetic
渤海湾盐场卤虫 the Bohai Bay <i>Artemia</i>	BH	中国 China	天津塘沽 Tangu, Tianjin	孤雌生殖 Parthenogenetic

购自南京海泰纳米材料有限公司。蛋白质考马斯蓝、还原型谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)检测试剂盒购于南京建成生物工程研究所,其余化学试剂均为国产分析纯试剂。试验所用仪器设备包括:KQ2200DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、MGC-450BPY-2 智能型光照培养箱(上海一恒科技有限公司)、H-1850R 高速冷冻离心机(无锡久平仪器有限公司)、FC 酶标仪(Multiskan, USA)、SJIA-1500W-II 超声波细胞破碎仪(宁波双嘉仪器有限公司)。

1.4 供试纳米 SiO_2 悬浮液配制

40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Nano- SiO_2 储备液制备:直接将 40 g Nano- SiO_2 颗粒加入 1 L 的盐度为 35‰ 的无菌人工海水培养液中(不使用助溶剂),在冰水浴中超声分散。试验共设置 13 个浓度的纳米 SiO_2 悬浮液处理组,即用盐度为 35‰ 的无菌人工海水将 40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Nano- SiO_2 储备液逐级稀释制备成 40、35、30、25、20、17.5、15、12.5、10、7.5、5 和 2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水溶性悬浮液。考虑到纳米材料在水中极易团聚沉淀,试验所用各浓度 Nano- SiO_2 悬浮液均为当天暴露前配制,使用前超声 5 min。

1.5 无节幼虫急性毒性实验

取 5 mL 离心管分别加入 1.4 中配好的 8 种浓度的纳米 SiO_2 悬浮液 4 mL,每只离心管随机放入 GSL 或 BH 10 只无节幼体,放在光照培养箱中 27 $^{\circ}\text{C}$ 、16 h: 8 h 光暗环境下染毒。设盐度为 35‰ 无菌人工海水为空白对照,各处理重复 3 次。24 h 和 48 h 时观察卤虫无节幼体活动情况,根据卤虫趋光性在离心管的一侧用灯光照射,以卤虫无节幼体不能移到灯光处作为受抑制标志,轻轻晃动离心管,在解剖镜下观察,以卤虫无节幼体在 10 s 内不能游动作为死亡标志,记录受抑制的和死亡的卤虫无节幼体数^[11]。

1.6 无节幼虫抗氧化指标测定

将初孵化的 GSL 和 BH 无节幼体经滤纸过滤收集后,分别吸取 100 μL 无节幼体放到 100 mL 烧杯中,之后按 1.4 中 Nano- SiO_2 悬浮液的配制方法配制供试溶液。由于 Nano- SiO_2 对 2 种卤虫半数致死浓度(LC_{50})在 20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右,本实验只取 20、17.5、15、12.5、10、7.5、5、2.5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 7 种亚致死浓度来开展这部分实验,并以盐度为 35‰ 无菌人工海水为空白对照。实验期间温度控制在(27 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$,光暗条件为 16 h: 8 h,摇床转速为(135 $\pm$ 5) $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,以保证 Nano- SiO_2 处于良好的悬浮分散状态,以使卤

虫充分染毒。各浓度处理及空白对照各重复 3 次,处理时间为 24 h 和 48 h。试验处理结束后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min 后,加入 27 $^{\circ}\text{C}$ 去离子水继续离心收集卤虫无节幼体,去除表面附着的纳米 SiO_2 后,将去除残余水分的卤虫无节幼体称量,之后加入预冷匀浆介质(0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl、0.0001 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA-2Na、0.01 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、质量分数为 0.8% NaCl, pH = 7.4),离心匀浆液(4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min),取上清液置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存待用。蛋白含量和抗氧化指标(包括 GSH、SOD、CAT 和 MDA)测定均参考相应试剂盒说明书进行。

1.7 数据分析

将处理后的结果用统计分析软件 SPSS V22 的两因子方差分析方法(Two-way ANOVA)进行分析,以明确不同生殖方式、不同浓度 Nano- SiO_2 水溶性悬浮液处理及两者间的交互作用对所测指标的影响。处理间差异显著性采用 LSD 检验方法进行多重比较($P < 0.05$)。

2 结果 (Results)

2.1 Nano- SiO_2 处理浓度及卤虫生殖方式对无节幼体死亡率及酶活性的双因子方差分析

如表 2 所示,2 种生殖方式的卤虫无节幼体在 Nano- SiO_2 处理 24 h 后,5 种测定指标与卤虫的生殖方式及 Nano- SiO_2 的处理浓度均呈显著差异,且处理浓度对各种指标的影响更显著。同样地, Nano- SiO_2 处理 48 h 后,各测定指标与生殖方式及 Nano- SiO_2 的处理浓度也呈显著差异(除 GSH 含量指标),但两者之间的交叉互作效果并不明显。这说明 2 种卤虫对 Nano- SiO_2 的敏感程度与生殖方式有关,且呈显著差异。两性生殖的 GSL 比孤雌生殖的 BH 对 Nano- SiO_2 的敏感程度低。而各种指标敏感性随 Nano- SiO_2 浓度的升高呈递增或递减趋势。

2.2 Nano- SiO_2 对卤虫无节幼虫的急性毒性

如表 3、4 所示,随着在 Nano- SiO_2 暴露浓度的提高, GSL 和 BH 无节幼体的死亡率均呈上升趋势, Nano- SiO_2 处理 24 h 对 GSL 和 BH 无节幼体的 LC_{50} 分别为 21.636 和 20.816 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。BH 无节幼体相对 GSL 无节幼体对 Nano- SiO_2 的毒性更敏感。根据水生生物毒性分级标准,纳米 SiO_2 对卤虫急性毒性属于低毒性。

2.3 Nano- SiO_2 对卤虫无节幼虫 SOD 活性的影响

不同浓度的 Nano- SiO_2 悬浮液对 2 种卤虫无节

表 2 不同 Nano-SiO₂水溶性悬浮液处理及不同卤虫生殖方式对无节幼体死亡率及酶活影响的双因子方差分析
Table 2 Two-way analysis of variance (ANOVAs) between different Nano-SiO₂ concentrations and reproduction types of *Artemia* nauplii and the mortality and antioxidant activities of *Artemia*

处理时间 Exposure time	测定指标 Indexes	生殖方式 Mode of reproduction		处理浓度 Concentration		交叉分析 Cross-analysis	
		<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
24 h	死亡率 Mortality	38.53	0.028*	740.43	0.002* *	3.35	0.019*
	SOD 活性 SOD activity	37.89	0.043*	243.18	0.001* *	7.89	0.062
	CAT 活性 CAT activity	57.23	0.048*	127.27	0.032*	5.24	0.091
	GSH 含量 GSH content	2.25	0.048*	5.65	0.008*	0.64	0.736
	MDA 含量 MDA content	28.19	0.032*	196.67	0.016*	6.32	0.065
48 h	SOD 活性 SOD activity	22.36	0.026*	235.17	0.023*	1.28	0.321
	CAT 活性 CAT activity	17.24	0.012*	723.13	0.008* *	3.85	0.117
	GSH 含量 GSH content	0.34	0.072	3.28	0.071	2.49	0.236
	MDA 含量 MDA content	21.33	0.050*	324.45	0.012*	6.38	0.078

注:* $P<0.05$,* * $P<0.01$ 。
Note:* $P<0.05$,* * $P<0.01$ 。

表 3 卤虫无节幼体死亡率(*y*)与 Nano-SiO₂ 浓度(*x*)的线性关系
Table 3 Linear relationship between *Artemia* nauplii mortality (*y*) and Nano-SiO₂ concentrations (*x*)

不同生殖方式的卤虫 <i>Artemia</i> with different modes of reproduction	回归方程 The regression equation	相关系数 <i>r</i> The correlation coefficient (<i>r</i>)	LC ₅₀
BH	$y=38.274x+1.679$	0.9753	20.816
GSL	$y=37.963x+2.655$	0.9762	21.636

表 4 Nano-SiO₂对 2 种生殖方式卤虫无节幼体死亡率的影响
Table 4 Effects of Nano-SiO₂ on the mortality of two *Artemia* nauplii with different reproduction types

处理浓度/(mg·mL ⁻¹) Concentration/(mg·mL ⁻¹)	死亡率/% Mortality/%	
	GSL	BH
0	0.00 a	0.00 a
2.5	0.00 a	0.00 a
5	0.4±0.1 a	2±0.8 a
7.5	8±0.5 b	10±0.60 b
10	13±1.3 bc	16±1.7 bc
12.5	25±2.3 c,A	32±2.7 d,B
15	37±2.7 cd,A	44±1.8 ef,B
17.5	42±3.2 de,A	47±2.0 f,B
20	48±2.1 def	49±2.5 f
25	60±3.3 f	61±2.7 g
30	73±2.5 g	75±3.3 h
35	83±2.7 h	86±3.0 i
40	96±1.8 i	98±3.3 j

注:不同小写字母表示 $P<0.05$,不同大写字母表示 $P<0.01$ 。
Note: Different lowercase letters showed significant difference ($P<0.05$), different capital letters showed significant difference ($P<0.01$).

幼体染毒 24 h 和 48 h 后,卤虫无节幼体组织匀浆中 SOD 活性变化如图 1 所示。不同浓度 Nano-SiO₂ 处理组中 2 种卤虫无节幼体 SOD 活性都显著低于对照组($P<0.05$),并随 Nano-SiO₂ 处理浓度升高,SOD 活性呈降低趋势,且处理相同时间后 GSL 的 SOD 活性高于 BH。BH 暴露 24 h 和 48 h 后,其 SOD 活性只在 5 mg·mL⁻¹ 及 12.5 mg·mL⁻¹ 2 个浓度处理组分别显著下降了 13.75% 和 12.19%(24 h)、18.50% 和 13.21%(48 h),而浓度在 5~10 mg·mL⁻¹ 之间,SOD 活性下降幅度不大。对 GSL 处理 48 h 后,其 SOD 活性也在 5 mg·mL⁻¹ 和 12.5 mg·mL⁻¹ 显著下降,降幅分别达 14.63% 和 13.92%。此外,2 种卤虫处理 48 h 后的 SOD 活性比处理 24 h 后的 SOD 活性低 18.9%~32.2%。以上结果表明 Nano-SiO₂ 对 2 种卤虫无节幼体组织的 SOD 活性都具有显著的抑制作用,并随处理时间增长,SOD 活性受到的抑制程度越高,且处理相同时间后 GSL 的 SOD 活性高于 BH 的 SOD 活性。

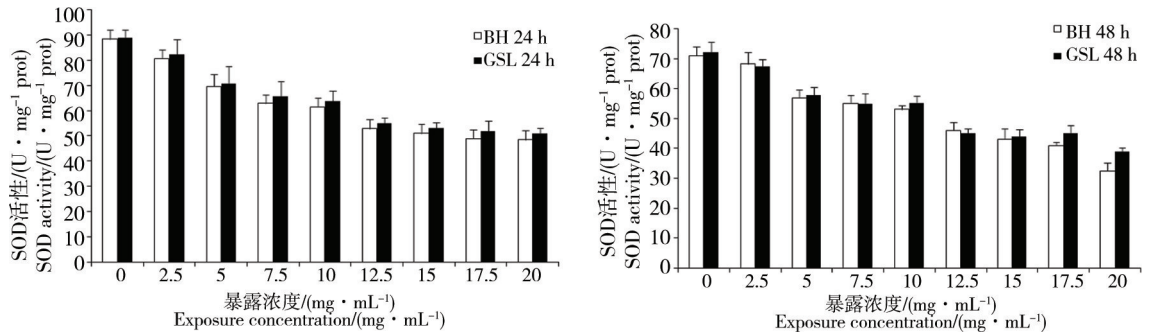


图 1 卤虫无节幼体暴露于 Nano-SiO₂ 24 h、48 h 后的 SOD 活性

Fig. 1 SOD activity of *Artemia* nauplii after exposure to Nano-SiO₂ for 24 h, 48 h

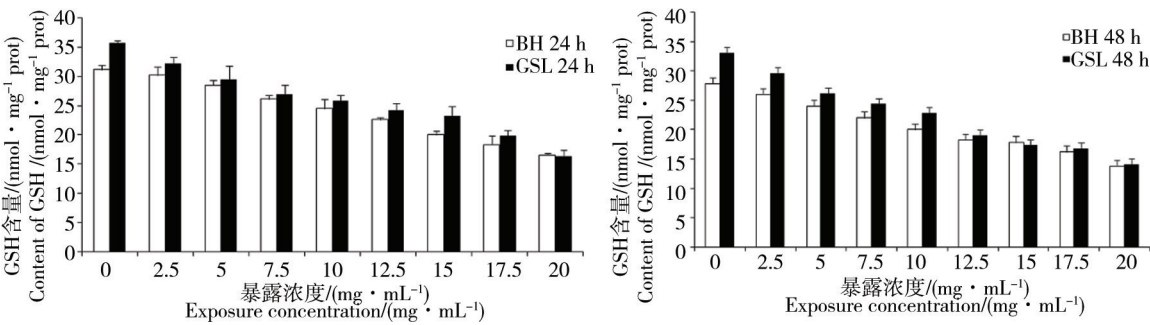


图 2 卤虫无节幼体暴露于 Nano-SiO₂ 24 h、48 h 后的 GSH 含量

Fig. 2 GSH contents of *Artemia* nauplii after exposure to Nano-SiO₂ for 24 h, 48 h

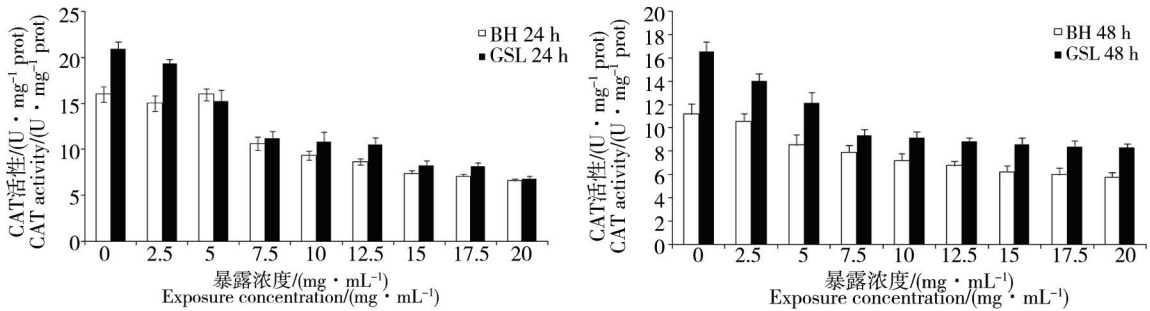


图 3 卤虫无节幼体暴露于 Nano-SiO₂ 24 h、48 h 后的 CAT 活性

Fig. 3 CAT activity of *Artemia* nauplii after exposure to Nano-SiO₂ for 24 h, 48 h

2.4 Nano-SiO₂对卤虫无节幼虫 GSH 含量的影响

不同浓度 Nano-SiO₂悬浮液对 2 种卤虫无节幼体染毒 24 h 和 48 h 后,无节幼体组织匀浆中 GSH 含量变化如图 2 所示。不同浓度 Nano-SiO₂处理组中 2 种卤虫无节幼体 GSH 含量显著低于对照组($P < 0.05$),随 Nano-SiO₂处理浓度升高,GSH 含量呈下降趋势,且处理相同时间后 GSL 的 GSH 含量高于 BH。BH 暴露 24 h 和 48 h 后,其 GSH 含量在 Nano-SiO₂浓度为 7.5 mg · mL⁻¹时分别显著下降了 29.82% 和 26.67%,而在 ck~7.5 mg · mL⁻¹及 7.5~10

mg · mL⁻¹ 2 个浓度段的 GSH 含量下降幅度不大。GSL 暴露 24 h 后,其 GSH 含量在 Nano-SiO₂浓度为 2.5 mg · mL⁻¹时显著下降了 11.54%;暴露 48 h 后,其 GSH 含量在 Nano-SiO₂浓度为 7.5 mg · mL⁻¹时下降了 13.75%。对 2 种卤虫无节幼体处理 48 h 后的 GSH 含量比处理 24 h 后的 GSH 含量低 8.39%~38.69%。以上结果表明 Nano-SiO₂对 2 种卤虫无节幼体 GSH 含量具有显著的抑制作用,并随处理时间增长对 GSH 含量抑制程度增强,且处理相同时间后 GSL 的 GSH 含量高于 BH 的 GSH 含量。

2.5 Nano-SiO₂对卤虫无节幼虫 CAT 活性的影响

不同浓度 Nano-SiO₂悬浮液对 2 种卤虫无节幼体染毒 24 h 和 48 h 后,无节幼体组织匀浆中 CAT 活性变化如图 3 所示。不同浓度 Nano-SiO₂处理组中 2 种卤虫无节幼体 CAT 活性显著低于对照组($P<0.05$),且随浓度升高 CAT 活性呈下降趋势,且处理相同时间后 GSL 的 CAT 活性高于 BH。BH 暴露 24 h 后,其 CAT 活性在 Nano-SiO₂浓度为 $ck\sim7.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时呈缓慢下降趋势,暴露 48 h 后,CAT 活性随 Nano-SiO₂浓度升高呈缓慢下降趋势。对 GSL 分别处理 24 h 和 48 h 后,在 Nano-SiO₂浓度为 $ck\sim7.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,CAT 活性呈下降趋势,在 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 CAT 活性有小幅回升但仍低于对照组,分别下降 74.16%(24 h)和 79.64%(48 h)。对 2 种卤虫无节幼体处理 48 h 后的 CAT 活性比处理 24 h 后的 CAT 活性低 3.37%~44.86%。以上结果表明 Nano-SiO₂对 2 种卤虫无节幼体 CAT 活性具有显著抑制作用,随处理时间增长对 CAT 活性抑制程度增强,且处理相同时间后 GSL 的 CAT 活性高于 BH。

2.6 Nano-SiO₂对卤虫无节幼虫 MDA 含量的影响

不同浓度 Nano-SiO₂悬浮液对卤虫无节幼体染毒 24 h 和 48 h 后,无节幼体组织匀浆液中 MDA 含量变化如图 4 所示。不同浓度 Nano-SiO₂处理组中 2 种卤虫无节幼体 MDA 含量显著高于对照组($P<0.05$),且随浓度升高 MDA 含量呈增加趋势。BH 暴露 24 h 和 48 h 后,在 Nano-SiO₂浓度为 $7.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 MDA 含量分别增长 1.93 倍和 1.31 倍。对 GSL 处理 24 h 和 48 h 后,在 Nano-SiO₂浓度为 $7.5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 MDA 含量分别增长 2.19 倍和 1.81 倍。处理相同时间后 BH 的 MDA 含量高于 GSL,且随处理时间延长 MDA 含量提高,处理 48 h 与处理 24 h 相比提高 15%~139.86%。以上结果表明 Nano-SiO₂

对不同卤虫无节幼体体内 MDA 含量具有显著促进作用,并随处理时间延长 MDA 含量增多,且相同浓度 Nano-SiO₂处理相同时间下 BH 产生的 MDA 比 GSL 产生的多。

3 讨论 (Discussion)

本研究发现,Nano-SiO₂可导致美国大盐湖两性生殖型卤虫(GSL)和渤海湾孤雌生殖型卤虫(BH)无节幼体死亡,BH 比 GSL 对 Nano-SiO₂敏感程度更高。由于孤雌生殖卤虫的遗传特性相对单一,而两性生殖的遗传基因具有多样性,故两性生殖的卤虫在适应各种恶劣生存环境方面更具优势,因此孤雌生殖的 BH 对 Nano-SiO₂敏感程度更高。

CAT 是主要的过氧化物酶,约占过氧化物酶体总量的 40%,可将有机体内的 H₂O₂分解为 H₂O 和 O₂,从而降低活性氧含量,是生物防御体系的关键酶之一。田文静等^[12]研究发现纳米 ZnO 处理 24 h 和 48 h 能够抑制斑马鱼胚胎 CAT 和 SOD 活性,并降低 GSH 含量,进而增大胚胎脂质过氧化水平,这表明氧化应激是 Nano-ZnO 抑制斑马鱼胚胎孵化的作用机制之一。本研究中纳米 SiO₂处理 24 h、48 h,均导致卤虫无节幼虫 CAT 活性降低,且 BH 的降低程度大于 GSL,表明 Nano-SiO₂处理导致卤虫体内氧化损伤,且相同浓度处理下 BH 的氧化损伤程度大于 GSL。

SOD 是生物体内清除超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)的特异性酶,在生物体内最先与($\cdot\text{O}_2^-$)发生歧化作用,将其分解为 H₂O₂和 O₂,对机体的氧化与抗氧化系统平衡起着非常重要的作用。Sharma 等^[13]研究了 Nano-ZnO 对人体上皮细胞系(A431)的影响,发现 Nano-ZnO 能够消耗 GSH,降低 SOD 和 CAT 活性,引起氧化损伤,并且进一步引起了 A431 细胞的基因毒性。本研究中 Nano-SiO₂处理 24 h、48 h,导致卤虫无节

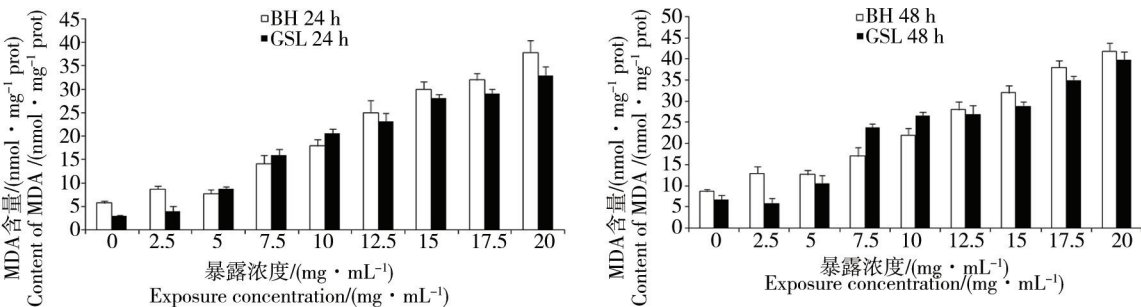


图 4 卤虫无节幼体暴露于 Nano-SiO₂ 24 h、48 h 后的 MDA 含量

Fig. 4 MDA contents of *Artemia* nauplii after exposure to Nano-SiO₂ for 24 h, 48 h

幼虫 SOD 活性降低,且 SOD 活性随处理浓度增加呈现出降低趋势,表明卤虫体内 $\cdot\text{O}_2^-$ 增多,超出了 SOD 酶的清除能力,反过来抑制了 SOD 活性,进而造成了氧化损伤。同时发现 BH 的 SOD 活性的降低程度大于 GSL 的降低程度,说明相同浓度处理下孤雌生殖 BH 的氧化损伤程度大于两性生殖的 GSL。

GSH 是一种具有抗氧化功能的氨基酸衍生物,在清除活性氧(如 H_2O_2)过程中发挥重要作用^[14]。有研究发现直接加入 GSH 能减轻 C_{60} 处理引起的斑马鱼胚胎发育毒性。因此,认为 C_{60} 对机体造成的损伤主要是氧化损伤^[15]。本研究中 Nano- SiO_2 处理 24 h、48 h,导致卤虫无节幼虫 GSH 含量降低,且 BH 的降低程度大于 GSL,表明 Nano- SiO_2 处理导致卤虫体内氧化损伤,且相同浓度处理下氧化损伤程度孤雌生殖的 BH 大于两性生殖的 GSL。

MDA 是机体氧化损伤的重要检测指标,当氧化物质进入机体后,表面活性位点与氧分子发生反应,形成超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$),并通过歧化反应产生大量的活性氧(ROS),活性氧自由基能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,从而引起脂质过氧化作用(LPO),并产生 MDA 等过氧化产物,从而使 MDA 含量升高,因此其含量的高低直接指示了氧化损伤的程度。在正常的线粒体中,一些 ROS 能够被抗氧化机制消耗掉,从而使 ROS 保持在很低的水平,但如果 ROS 产生过量,那么机体的天然抗氧化机制将被破坏,并随即发生氧化应激反应^[16]。有研究发现 Nano- SiO_2 粒子(20 和 50 nm)能够诱导人胚胎肾细胞产生 ROS,降低细胞内 GSH 含量,引起 MDA 含量增加,产生细胞毒性^[17]。本研究中 Nano- SiO_2 处理 24 h、48 h,均导致卤虫无节幼虫 MDA 含量增多,且 BH 体内 MDA 的增加量大于 GSL 的增加量,表明 Nano- SiO_2 处理导致卤虫体内氧化损伤,且相同浓度处理下 BH 氧化损伤的程度大于 GSL。

综上所述:1)由于 Nano- SiO_2 对 2 种卤虫的急性毒性很低,因此以急性毒性结果作为 Nano- SiO_2 毒性的指示指标可能会低估 Nano- SiO_2 的危害。

2)Nano- SiO_2 对 GSL 和 BH 无节幼虫的抗氧化指标均产生了不同程度的影响,表明 Nano- SiO_2 对卤虫产生了氧化损伤,进而引起卤虫无节幼虫生理机能改变,甚至导致死亡。因此 Nano- SiO_2 的毒性更适合用抗氧化指标来指示。

3)对比实验证明两性生殖的 GSL 比孤雌生殖

BH 对逆境的抵抗能力更强。

通讯作者简介:周可新,博士,研究员,主要研究方向为生态保护,生物多样性保护,水环境保护。

参考文献 (References):

- [1] Lin W, Huang Y W, Zhou X D, et al. *In vitro* toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2006, 217(3): 252-259
- [2] Baun A, Hartmann N B, Grieger K, et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: A brief review and recommendations for future toxicity testing [J]. *Ecotoxicology*, 2008, 17(5): 387-395
- [3] Li Y, Sun L, Jin M, et al. Size-dependent cytotoxicity of amorphous silica nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2011, 25(7): 1343-1352
- [4] Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113(7): 823 - 839
- [5] Honnons S, Porcher J M. *In vivo* experimental model for silicosis [J]. *Journal of Environmental Pathology Toxicology & Oncology Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology & Cancer*, 2000, 19(4): 391-400
- [6] 应杏秋, 曾群力, 祝慧娟, 等. 纳米 SiO_2 与标准 SiO_2 致大鼠急性肺损伤的作用[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2006, 24(2): 116-117
- [7] Han B, Wei C X, Yang D, et al. Acute toxicity of suspension of nanosized silicon dioxide particles to *Daphnia magna* [C]. *International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering*, 2009
- [8] Nunes B S, Carvalho F D, Guilhermino L M, et al. Use of the genus *Artemia*, in ecotoxicity testing [J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144(2): 453-462
- [9] Bergami E, Bocci E, Vannuccini M L, et al. Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2016, 123: 18-25
- [10] Cornejo-Garrido H, Kibanova D, Nieto-Camacho A, et al. Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions [J]. *Chemosphere*, 2011, 84(10): 1329-1335
- [11] 陈婕. 卤虫无节幼体急性毒性实验方法的标准化研究 [D]. 天津: 天津科技大学, 2009
Chen J. Study of standard methods of acute toxicity tests

of *Artemia nauplii* [D]. Tianjin: Tianjin University of Science & Technology, 2009 (in Chinese)

[12] 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 (in Chinese)

[13] Sharma V, Shukla R K, Saxena N, et al. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells [J]. Toxicology Letters, 2009, 185(3): 211-218

[14] Yamakoshi Y, Umezawa N, Ryu A, et al. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: $O_2^{\cdot -}$ versus 1O_2 [J]. Journal of the American Chemical Society, 2003, 125(42): 12803-12809

[15] Zhu X, Lin Z, Yan L, et al. Developmental toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to manufactured nanomaterials: Buckminsterfullerene aggregates (nC 60) and fullerol [J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2007, 26(5): 976 - 979

[16] Barlow P G, Clouter-Baker A, Donaldson K, et al. Carbon black nanoparticles induce type II epithelial cells to release chemotaxins for alveolar macrophages [J]. Particle & Fibre Toxicology, 2005, 2(1): 1-14

[17] Wang F, Gao F, Lan M, et al. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells [J]. Toxicology in Vitro, 2009, 23(5): 808-815 ◆