

王黎翌,薛永来,高璐,等. 纳米氧化铜对斑马鱼甲状腺系统的干扰效应[J]. 江苏农业科学,2019,47(14):202-205.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.14.047

纳米氧化铜对斑马鱼甲状腺系统的干扰效应

王黎翌,薛永来,高璐,杜道林

(江苏大学环境与安全工程学院,江苏镇江 212013)

摘要:目前纳米技术发展和应用以指数形式快速增长,纳米氧化铜(copper oxide nanoparticles, CuO NPs)因在吸光性、磁性、化学催化和热传导等方面具有独特的优势而得到广泛应用,近期关于 CuO NPs 对细胞、动物胚胎和植物的毒性报道日益增多,但是关于 CuO NPs 对鱼类甲状腺系统的报道相对较少。因此,本试验选用斑马鱼作为研究对象,从细胞形态、激素水平和基因层面研究了纳米氧化铜对斑马鱼甲状腺系统造成的干扰效应。结果表明, CuO NPs 可损伤甲状腺滤泡结构,改变上皮细胞形态,诱导甲状腺激素 T_3 和 T_4 上升并且造成代谢酶编码基因 *ugt1ab* 的表达下调。

关键词:纳米氧化铜;斑马鱼;甲状腺滤泡;激素;基因

中图分类号: S941.91;X174 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)14-0202-04

随着纳米技术的蓬勃发展,纳米材料的毒理机制已成为一个研究热点。纳米氧化铜(copper oxide nanoparticles, CuO NPs)是一种不溶于水的黑色金属氧化物,凭借其小尺寸效应、表面效应、体积效应、量子尺寸效应等良好的物理性能在吸光性、磁性、化学催化和热传导等方面具有优势。因此, CuO NPs 广泛应用于各行各业,在光电子领域, CuO NPs 可作为超/热传导材料、电子芯片、半导体及传感器的生产原料^[1]。CuO NPs 也可用作木材的防腐剂、防毒面具和抗菌涂料,还可以有效地去除羧类和氰化物^[2-3]。在大量使用 CuO NPs 的同时,一部分 CuO NPs 会泄露到环境中,不仅对生态环境造成胁迫,还可通过皮肤黏膜接触和食物链等途径直接危害动物健康。例如, CuO NPs 可诱导人体肺部上皮细胞(A549)产生氧化应激反应和 P53 信号通路的异常^[4]。Zhao 等研究 CuO NPs 对青鱼(*Cyprinus carpio*)的毒性时发现, 100 mg/L CuO NPs 可在肠道和鳃内产生累积效应,还阻滞鲤鱼的生长发育^[5]。有报道称, CuO NPs 对植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[6]和芥菜(*Brassica juncea* L.)^[7]的根发育和木质化形成具有抑制作用。由此可见, CuO NPs 对人体细胞、植物和鱼类等具有毒性作用。近年来,斑马鱼(*Danio rerio*)作为一种新型脊椎动物模型,越来越多地被应用在体内药物毒理和功效的筛选及评估化学物质的毒性试验^[8-10]。同时,有研究发现斑马鱼的基因组、毒性特征、信号传导与人类高度相似,斑马鱼在解剖学、生理学和分子水平上也与哺乳动物相似^[11]。但以往纳米材料对斑马鱼的毒性研究集中在胚胎发育毒性和急性毒性方面。曾有人证实, CuO NPs 可引起胚胎的氧化应激反应,使乙酰胆碱酯酶和 ATP 酶失活,抑制胚胎的生长发育^[12];Sun 等研究发现 CuO NPs 还可影响斑

马鱼胚胎的肝脏发育和视神经分化^[13]; CuO NPs 对斑马鱼胚胎的体节生长、神经和心血管发育同样也具有一定的影响^[14]。

虽然纳米材料的急性毒性研究已取得重大的进展,但关于纳米材料对鱼类的内分泌影响的数据较少,尤其关于 CuO NPs 对处于生长发育阶段的斑马鱼甲状腺的毒性研究相对匮乏。脊椎动物的甲状腺系统是重要的内分泌系统之一,其分泌的甲状腺激素(thyroid hormones, THs)包括甲状腺素(T_4)和三碘甲状腺原氨酸(T_3),在生长发育、调节新陈代谢速率以及维持生殖功能稳定和体内自稳态等方面起着至关重要的作用^[15-16]。而环境污染物对生殖和甲状腺等内分泌干扰效应的试验中,斑马鱼也是一种常见的实验室模式动物^[17-18]。因此,本研究选取斑马鱼幼鱼(1个月)作为受试动物,在 CuO NPs 悬浮液中暴露 20 d 后,观察甲状腺滤泡的病理组织切片,检测 T_3 和 T_4 的水平,初步探究了纳米氧化铜(CuO NPs)对斑马鱼甲状腺系统的干扰效应。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼

斑马鱼种鱼(购自国家斑马鱼资源中心)在实验室驯养半个月以上方可产下胚胎,驯养条件为光照、黑暗周期为 12、10 h,水温保持 28℃左右,投喂丰年虾。试验幼鱼由胚胎孵化培养 1 个月所得,其间喂食草履虫和蛋黄营养液,注意清洁灭菌。

1.2 试验药品

纳米氧化铜(CuO NPs),购自美国 Sigma 公司,纯度≥99%,平均粒径为 50~60 nm。间氨基苯甲酸乙酯甲磺酸盐(MS-222),购自 Aladdin 阿拉丁公司。斑马鱼三碘甲状腺原氨酸(T_3)和甲状腺素(T_4)ELISA 检测试剂盒,购自上海哈灵生物科技有限公司。DEPC、Trizol 和 cDNA 反转录试剂盒,均购自 Beyotime。SYBR Green 荧光探针(BIO-RAD)。

1.3 甲状腺滤泡病理切片

称取 1 mg 的 CuO NPs 至 200 mL 去氯曝氧自来水,超声 30 min,制得母液。配制不同浓度梯度的 CuO NPs(0、10、50、

收稿日期:2018-05-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31100379、31601380);江苏大学高级人才基金(编号:10JGD056)。

作者简介:王黎翌(1991—),女,江苏盐城人,硕士研究生,主要研究方向为环境毒理学。E-mail: wanglizhao1111@163.com。

通信作者:薛永来,博士,副教授,主要研究方向为环境毒理学、环境生物学。E-mail: xueyonglai@sina.com。

100 μg/L) 悬浮液作为幼鱼的养殖水。暴露容器为 5 L 大烧杯, 每浓度设 3 个平行, 每个平行 10 条鱼, 每日定时更换全部养殖水。试验周期为 20 d, 暴露结束后, 用 200 mg/L 的 MS-222 麻醉斑马鱼, 切取下颌部位。采用苏木-伊红(HE)染色法制作甲状腺滤泡的切片, 具体过程: 甲醛固定和流水冲洗; 不同浓度乙醇脱水; 二甲苯透明; 浸蜡和包埋; 切片、铺片、烤片; 二甲苯脱蜡和苏木伊红染色; 脱水和封片。最后用正置光学显微镜(Nikon Eclipse E100)观察切片结果, 放大 400 倍, 在成像系统(NIKON DS-U3)上采集图像。

1.4 甲状腺激素含量的测定

试验周期结束后, 取整鱼匀浆, 取上清。采用双抗一步夹心酶联免疫吸附(ELASA)法测定匀浆中 T₃ 和 T₄ 的含量。具体步骤: 在 96 孔板中设置标准品孔和样本孔, 在标准品孔和样本孔中均加入 100 μL 相同浓度 T₃ 或 T₄ 抗体, 封板膜密封反应孔, 37 ℃ 恒温箱温育; 2 h 后洗板, 即甩去反应液, 在吸水纸上拍干, 每孔再加满洗涤液, 甩干拍板, 重复 3~5 次; 标准品孔各加不同浓度的标准品 50 μL, 待测样本孔先加样本(不同浓度组的斑马鱼匀浆上清) 10 μL, 再加样本稀释液 40 μL(即样本被稀释 5 倍), 空白孔则不加。温育, 重复上述洗涤过程。之后, 标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μL, 温育 0.5 h; 每孔加入 50 μL 显色液, 37 ℃ 避光孵育 15~20 min; 最后每孔加入 50 μL 硫酸, 在 450 nm 波长处测定每孔的吸光度 D 值。绘制标准曲线, 横坐标是标准品的浓度, 纵坐标是对应 D 值, 绘制出标准品线性回归曲线, 按曲线方程计算各样本浓度值, 再乘以稀释倍数, 即得到实际样本浓度。

1.5 代谢基因 *ugt1ab* 表达的定量分析

Trizol 法提取整鱼的总 RNA, 参照邓莉等的方法^[19], cDNA 反转录参照试剂盒说明书。本试验选用 SYBR Green I 作为 DNA 结合染料, *β-actin* 作为内参基因, 引物设计主要参考 Yu 等的方法^[20], 由 Invitrogen 公司合成。具体引物序列

详见表 1, 反应体系详见表 2。扩增程序设置: 预变性 95 ℃ 30 s; 变性 95 ℃ 5 s, 退火 58 ℃ 10 s, 延伸 72 ℃ 30 s, 40 个循环。每个处理组设置 3 个平行, 每个样本设置 2 个技术重复。本试验中采用 Livak(2^{-ΔΔC_t}) 法^[21] 确定不同样本中目标基因表达水平的相对差异。

表 1 本研究所使用的扩增引物序列

基因名称	基因序列号	引物序列(5'→3')
<i>β-Actin</i>	NM 131031	Forward: ATGGATGAGGAAATCGCTGCC
		Reverse: CTCCTCATGCTCTGGGTCGTC
<i>ugt1ab</i>	NM 213422	Forward: CCACCAAGTCTTTCCGTGTT
		Reverse: GCAGTCCTTCACAGGCTTTC

表 2 实时荧光定量 PCR 反应体系

名称	用量(μL)
cDNA 模板	1
前引物	0.4
后引物	0.4
荧光探针	5
灭菌水	3.2
总计	10

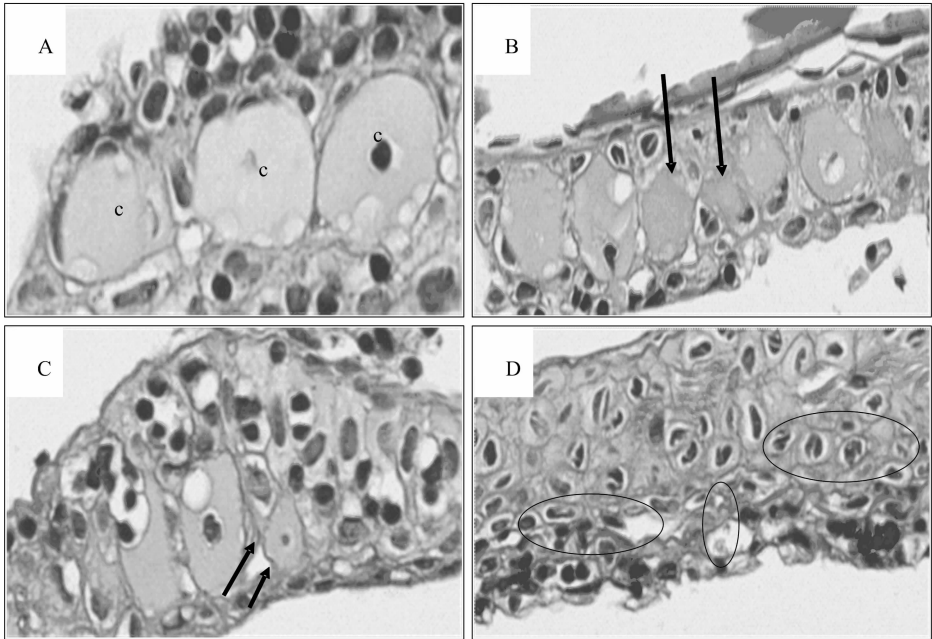
1.6 数据处理

用 SPSS statistics 17.0 统计分析软件进行统计分析和处理数据, 以“平均值 ± 标准差”表示结果, “*”表示在统计学上具有显著性差异(P<0.05)。采用软件 Origin 9.1 作图。

2 结果与分析

2.1 CuO NPs 对斑马鱼甲状腺滤泡的影响

斑马鱼暴露在不同浓度的 CuO NPs 悬浮液中 20 d 后, 由图 1 可知, 对照组(A)的甲状腺滤泡由上皮细胞围绕着充满均匀胶质的滤泡腔组成, 并且上皮细胞的细胞核形状规则单一; 10 μg/L 组(B)的甲状腺滤泡开始出现腔内胶质液体流失; 50 μg/L 组(C)的胶体流失更加明显, 同时还伴有上皮细



c—胶体区域; ↓—胶体流失; ○—变形的细胞和细胞核; A~D—0、10、50、100 μg/L 组

图1 CuO NPs 对甲状腺滤泡的影响

胞增生现象;在高浓度 100 $\mu\text{g/L}$ 组(D),除了胶质液体减少、细胞增生,还出现细胞形状变柱高状和细胞核变肥大不规则。由此可见,CuO NPs 对斑马鱼的甲状腺滤泡造成胶体流失、上皮细胞增生、细胞形态改变和细胞核异常等损伤作用。

2.2 CuO NPs 对斑马鱼 T_3 水平的影响

斑马鱼暴露在不同浓度的 CuO NPs 悬浮液中 20 d 后,体内的 T_3 水平见图 2。随着 CuO NPs 浓度的上升, T_3 含量也上升,呈现剂量的依赖性。对照组的 T_3 含量为 3.2 ng/mL,各浓度组的 T_3 含量均显著高于对照组($P < 0.05$),分别上升了 60.63%、81.88% 和 95.94%。

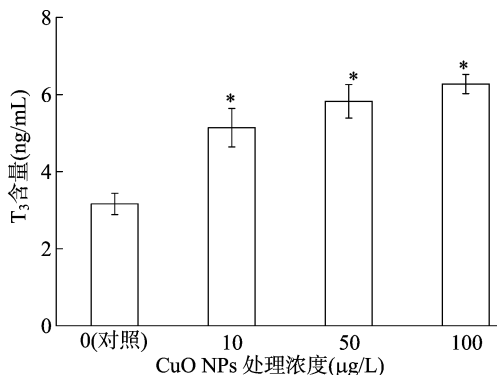


图2 CuO NPs 对斑马鱼体内 T_3 水平的影响
n=3, “*”表示与对照组比较差异显著($P < 0.05$)。下同

2.3 CuO NPs 对斑马鱼 T_4 水平的影响

由图 3 可知, T_4 表达趋势和 T_3 相似。对照组的 T_4 含量为 12.87 ng/mL,根据差异显著性分析,当 CuO NPs 为 50、100 $\mu\text{g/L}$ 时,其 T_4 含量显著高于对照组($P < 0.05$),分别上升了 53.85% 和 77.86%,而 10 $\mu\text{g/L}$ 处理与对照组差异不显著。

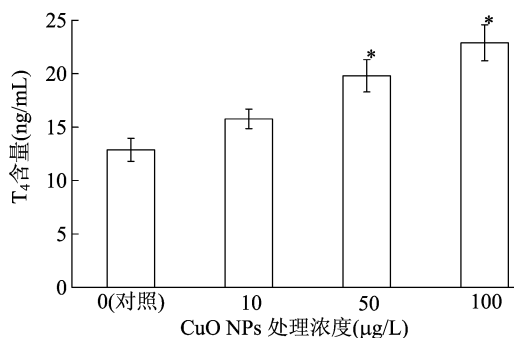


图3 CuO NPs 对斑马鱼体内 T_4 水平的影响

2.4 CuO NPs 对代谢基因水平的影响

斑马鱼暴露在不同浓度的 CuO NPs 悬浮液中 20 d 后,参与激素代谢过程的基因 *ugt1ab* 表达趋势见图 4。当 CuO NPs 为 50、100 $\mu\text{g/L}$ 时,其 *ugt1ab* 表达倍数显著低于对照组($P < 0.05$),分别下调了 0.29 倍和 0.83 倍。

3 讨论与结论

3.1 CuO NPs 对斑马鱼甲状腺滤泡的影响

一般而言,组织的病理变化可以直观反应外源物质对机体的损伤状况。鱼类在接触水体中一些污染物后,甲状腺组织结构会发生结构性变化,主要包括滤泡上皮厚度增厚或变薄、上皮细胞肥大和增生、胶质减少等。与其他硬骨鱼类一

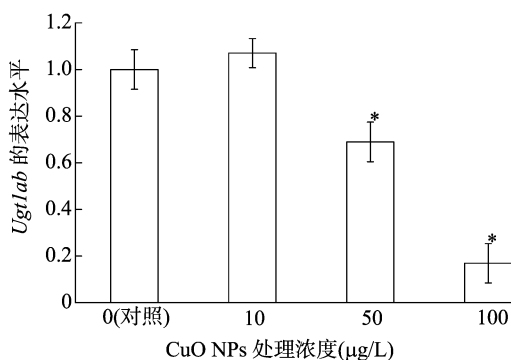


图4 CuO NPs 对基因 *ugt1ab* 的影响

样,斑马鱼的甲状腺是一个弥散在体内的腺体,在咽喉部的鳃小动脉处可发现大量的甲状腺滤泡^[22],所以本研究切取斑马鱼的下颌制作组织切片以观察 CuO NPs 对甲状腺滤泡机构的影响。鱼类的 T_4 合成过程发生在甲状腺滤泡的上皮细胞中,体内 T_4 水平与甲状腺滤泡的结构变化有直接的关联。有研究表明,暴露在 1 000 ng/L 多氯联苯 (Aroclor 1254) 下的褐牙鲈 (*Paralichthys olivaceus*) 幼鱼,各处理组中均出现甲状腺滤泡个体变小、胶质流失、上皮细胞增生等现象,由此推测, T_4 水平下降,可能与甲状腺滤泡合成受到 Aroclor 1254 抑制有关^[23]。在微囊藻毒素 (MC-LR) 对青年期的斑马鱼毒性试验中,暴露 28 d 后甲状腺滤泡上皮细胞出现肥大和增生。在暴露 14 d 时,25 g/L 组的 T_4 含量显著上升,暴露 21 d 时,所有处理组的 T_4 含量均显著上升,由此可见,MC-LR 刺激甲状腺滤泡细胞增生,可能是诱导 T_4 急剧合成的重要原因之一^[24]。有人曾推测,甲状腺滤泡上皮细胞变柱高状,呈“细胞分裂”象,滤泡内的胶体减少,可能是甲状腺功能亢进的体现^[25]。

本研究切片结果显示,甲状腺滤泡中胶质液体减少、上皮细胞增生和细胞形状变柱高状,这些现象又与 T_4 水平的上升密切相关,由此推测,CuO NPs 对斑马鱼甲状腺的组织结构造成病理损伤,可能进一步加快了 T_4 的合成速率。

3.2 CuO NPs 对斑马鱼 T_3 和 T_4 的影响

由于 T_4 不能直接发挥甲状腺激素效应,因此存在于靶器官中的脱碘酶能把 T_4 脱碘转化为生物活性更高、能够参与正常生理活动的 T_3 ,维持 T_3 和 T_4 的平衡是动物进行各种正常生理活动的基础^[26]。外源物质对甲状腺系统的干扰效应,除了损伤腺体之外,最常见的是引起 THs 水平的变化。杜佳等研究表明,全氟辛烷磺酸钾 (PFOS) 和纳米氧化锌 (Nano-ZnO) 的联合暴露可增加斑马鱼幼鱼体内的 T_3 含量,同时抑制体内 T_4 的含量^[27]。Chang 等将成年斑马鱼暴露于不同浓度的丁草胺中,结果显示在暴露 30 d 后,100 $\mu\text{g/L}$ 组的 T_3 和 T_4 水平均出现显著上升的趋势^[28]。

在本研究中,暴露在 CuO NPs 中的斑马鱼各处理组的 T_3 、 T_4 水平均呈现显著性上升,并伴有剂量的依赖性,THs 水平的变化可直接影响斑马鱼甲状腺的正常生理活动。

3.3 CuO NPs 对代谢基因的影响

尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDPGT) 主要分布在肝、肠道和肾等器官中,它能将机体内的外来异物和内源物质及时代谢排出体外^[29]。当斑马鱼体内产生过量的 THs 时,内质网上的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDPGT) 为糖基供体与底物 THs 结合进行葡萄糖苷化反应,增强 THs 的水溶性,

使其快速从胆汁、鳃和皮肤排出^[26]。当 UDPGT 活力降低时,会造成体内的 THs 大量滞留。检测斑马鱼 UDPGT 编码基因 *ugt1ab* 表达水平,可以间接反应出 UDPGT 的活力。在本研究结果中,10 $\mu\text{g/L}$ 组的 *ugt1ab* 表达轻微上调,50、100 $\mu\text{g/L}$ 组的表达均呈现下调趋势,由此可见,CuO NPs 影响激素代谢基因的表达,从而影响代谢酶的活力,所以斑马鱼体内的甲状腺激素不能及时代谢排出,导致幼鱼体内的 T_3 和 T_4 含量偏高。

以上试验结果表明,CuO NPs 对斑马鱼甲状腺系统的干扰效应主要表现为甲状腺滤泡的结构和细胞形态发生变化,这可能与体内甲状腺激素偏高有关,而激素水平偏高与激素的代谢受到抑制有关。关于 CuO NPs 对鱼类甲状腺系统的具体干扰途径可作进一步的研究。

参考文献:

- [1] Bochenkov V E, Sergeev G B. Adsorption, catalysis, and reactions on the surfaces of metal nano-oxides[J]. Catalysis in Industry, 2010, 2 (1): 1-10.
- [2] Batley G E, Kirby J K, McLaughlin M J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments[J]. Accounts of Chemical Research, 2013, 46(3): 854-862.
- [3] Borkow G, Zatcoff R C, Gabbay J. Reducing the risk of skin pathologies in diabetics by using copper impregnated socks[J]. Medical Hypotheses, 2009, 73(6): 883-886.
- [4] Ahamed M, Siddiqui M A, Akhtar M J, et al. Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2010, 396(2): 578-583.
- [5] Zhao J, Wang Z, Liu X, et al. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 197(24): 304-310.
- [6] Nair P M, Chung I M. Impact of copper oxide nanoparticles exposure on arabidopsis thaliana growth, root system development, root lignification, and molecular level changes[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(22): 12709-12722.
- [7] Nair P M, Chung I M. Study on the correlation between copper oxide nanoparticles induced growth suppression and enhanced lignification in Indian mustard (*Brassica juncea* L.)[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 113: 302-313.
- [8] Ali S, Champagne D L, Spaink H P, et al. Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens[J]. Birth Defects Research Part C - Embryo Today - Reviews, 2011, 93(2): 115-133.
- [9] He J H, Guo S Y, Zhu F, et al. A zebrafish phenotypic assay for assessing drug-induced hepatotoxicity[J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2013, 67(1): 25-32.
- [10] Zhu J J, Xu Y Q, He J H, et al. Human cardiotoxic drugs delivered by soaking and microinjection induce cardiovascular toxicity in zebrafish[J]. Journal of Applied Toxicology, 2014, 34(2): 139-148.
- [11] 陈汝家, 朱俊靖, 周盛梅, 等. 斑马鱼模型在药物毒性与安全性评价中的应用[J]. 毒理学杂志, 2012, 26(3): 224-228.
- [12] Ganesan S, Raghunath A, Vijayakumar S, et al. Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos[J]. Journal of Applied Toxicology, 2015, 36(4): 554-567.
- [13] Sun Y, Zhang G, He Z Z, et al. Effects of copper oxide nanoparticles on developing zebrafish embryos and larvae[J]. International Journal of Nanomedicine, 2016, 11: 905-918.
- [14] Xu J, Zhang Q P, Li X, et al. The effects of copper oxide nanoparticles on dorsoventral patterning, convergent extension, and neural and cardiac development of zebrafish[J]. Aquatic Toxicology, 2017, 188: 130-137.
- [15] Krassas G E, Poppe K, Glinioer D. Thyroid function and human reproductive health[J]. Endocrine Reviews, 2010, 31(5): 702-755.
- [16] Power D M, Llewellyn L, Faustino M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish[J]. Comparative Biochemistry and Physiology (Toxicology & Pharmacology), 2001, 130(4): 447-459.
- [17] Slanchev K, Stebler J, Cueva - Méndez G, et al. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(11): 4074-4079.
- [18] Siegfried K R, Nuesslein - Volhard C. Germ line control of female sex determination in zebrafish[J]. Developmental Biology, 2008, 324(2): 277-287.
- [19] 邓莉, 马春明, 袁琼兰, 等. 用 TRIzol 试剂抽提新生鼠脑组织总 RNA[J]. 泸州医学院学报, 2005, 28(6): 505-506.
- [20] Yu L Q, Deng J, Shi X J, et al. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae[J]. Aquatic Toxicology, 2010, 97(3, SI): 226-233.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [22] Patino R, Wainscott M R, Cruz - Li E I, et al. Effects of ammonium perchlorate on the reproductive performance and thyroid follicle histology of zebrafish[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2003, 22(5): 1115-1121.
- [23] Dong Y F, Zhang X N, Tian H, et al. Effects of polychlorinated biphenyls on metamorphosis of a Marine fish Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in relation to thyroid disruption[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 119(1): 325-331.
- [24] Liu Z D, Tang R, Li D P, et al. Subacute microcystin-LR exposure alters the metabolism of thyroid hormones in juvenile zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Toxins, 2015, 7(2): 337-352.
- [25] Fournie J W, Wolfe M J, Wolf J C, et al. Diagnostic criteria for proliferative thyroid lesions in bony fishes[J]. Toxicologic Pathology, 2005, 33(5): 540-541.
- [26] Jugan M L, Levi Y, Blondeau J P. Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology[J]. Biochemical Pharmacology, 2010, 79(7): 939-947.
- [27] 杜佳, 王树涛, 尤宏. 全氟辛烷基磺酸钾 (PFOS) 和纳米氧化锌 (Nano-ZnO) 复合暴露对斑马鱼下丘脑-垂体-甲状腺轴功能的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(6): 144-153.
- [28] Chang J H, Liu S Y, Zhou S L, et al. Effects of butachlor on reproduction and hormone levels in adult zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Experimental and Toxicologic Pathology, 2013, 65(1/2): 205-209.
- [29] 郭栋, 庞良芳, 周宏源. 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶基因多态性的研究进展[J]. 生理科学进展, 2010, 41(2): 107-111.