

氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露诱导成年斑马鱼脑组织毒性及其代谢研究

孙晶, 李伟, 丛瑞, 胡献刚, 欧阳少虎

引用本文:

孙晶, 李伟, 丛瑞, 胡献刚, 欧阳少虎. 氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露诱导成年斑马鱼脑组织毒性及其代谢研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(7): 1417-1423.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1228>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

敌草快对斑马鱼组织损伤及慢性肝脏损害作用

沈文静, 张潇, 赵子昂, 方再光, 谢曦, 王蓉, 胡文婷

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 949-956 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0043>

不同环数多环芳烃对土壤白符跳(*Folsomia candida*)的毒性差异

张家乐, 赵龙, 郭军康, 侯红, 林祥龙, 王巍然, 刘玲玲

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2638-2646 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0307>

氧化石墨烯对玉米幼苗生长及生理特征的影响

赵琳, 宋瑞瑞, 吴琦, 吴希, 云振宇

农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1167-1173 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1104>

铜对背角无齿蚌幼蚌的组织损伤效应研究

刘凯, 陈修报, 刘洪波, 姜涛, 杨健

农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1183-1189 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1380>

灭多威对斑马鱼胚胎抗氧化防御系统的影响

陆妍, 陈曦, 裘丽萍, 胡庚东, 宋超, 范立民, 郑尧, 孟顺龙, 陈家长

农业环境科学学报. 2022, 41(3): 472-480 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0705>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

孙晶, 李伟, 丛瑞, 等. 氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露诱导成年斑马鱼脑组织毒性及其代谢研究[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(7): 1417-1423.

SUN J, LI W, CONG R, et al. Toxicity and metabolism of adult zebrafish brain tissue induced by combined exposure to graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(7): 1417-1423.



开放科学 OSID

氧化石墨烯和多环芳烃复合暴露诱导成年斑马鱼脑组织毒性及其代谢研究

孙晶^{1,2}, 李伟¹, 丛瑞¹, 胡献刚², 欧阳少虎^{2*}

(1. 生态环境部海河流域北海海域生态环境监督管理局生态环境监测与科学研究中心, 天津 300061; 2. 南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室, 天津 300071)

摘要: 为研究氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)和多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)共暴露诱发的水生生态毒性效应及相关代谢机理,使用成年斑马鱼为动物模型,研究不同浓度GO(0.01、0.1 mg·L⁻¹)、PAHs(含16种优控PAHs,每种PAHs的浓度均为5 μg·L⁻¹)单独暴露,以及相应浓度的GO-PAHs复合暴露21 d对成年斑马鱼脑组织的毒性及代谢的影响。斑马鱼脑组织酶响应结果表明,0.1 mg·L⁻¹ GO和0.1 mg·L⁻¹ GO-PAHs处理会显著($P<0.05$)降低多环芳烃受体活性,除PAHs组外,其他处理组细胞色素P4501A1(CYP1A1)酶的含量均显著降低。代谢组学分析结果表明,0.1 mg·L⁻¹ GO组和0.1 mg·L⁻¹ GO-PAHs复合暴露组均会对斑马鱼脑组织的氨基酸和脂肪酸代谢产生显著影响。此外,与GO和PAHs单独暴露组相比,GO-PAHs复合暴露组的酶响应和诱导产生的代谢物水平与GO处理组更相近,说明GO和PAHs复合暴露时,GO在成年斑马鱼脑组织中的代谢毒性效应占主导。

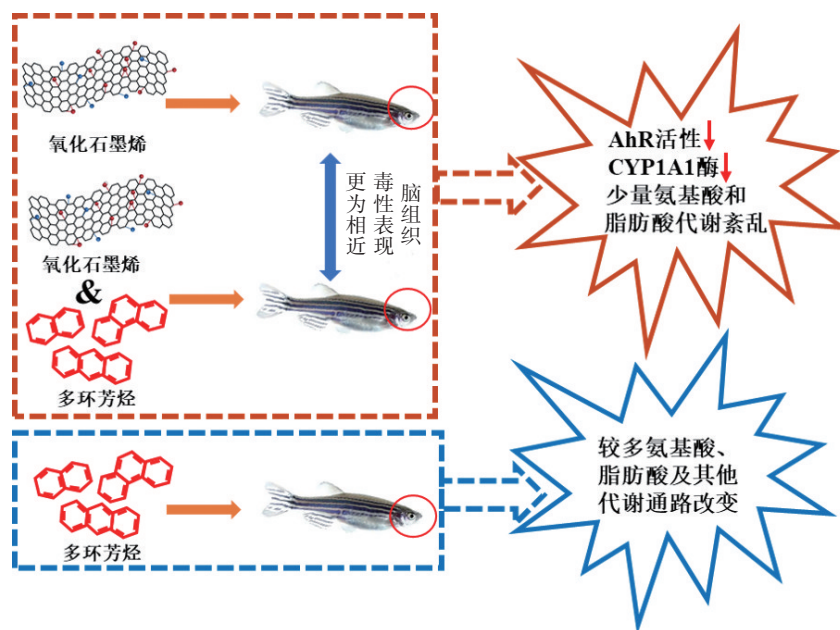
关键词: 氧化石墨烯;多环芳烃;斑马鱼;复合暴露;代谢组学

中图分类号: X171.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-2043(2022)07-1417-07

doi:10.11654/jaes.2021-1228



收稿日期: 2021-10-27 录用日期: 2022-03-07

作者简介: 孙晶(1990—),女,黑龙江伊春人,博士,工程师,从事生态环境监测与生态毒理研究。E-mail: sunjing90s@yeah.net

*通信作者: 欧阳少虎 E-mail: ouyangshaohu@nankai.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFC1804104); 博士后面项目(2020M680867); NSFC山东联合基金资助项目(U1906222); 高等学校学科创新引智计划项目(T2017002)

Project supported: The National Key Research and Development Program of China(2019YFC1804104); The Postdoctoral Science Foundation(2020M680867); The National Natural Science Foundation of China-A Shandong Joint Program(U1906222); Ministry of Education, People's Republic of China as a 111 Program(T2017002)

Toxicity and metabolism of adult zebrafish brain tissue induced by combined exposure to graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons

SUN Jing^{1,2}, LI Wei¹, CONG Rui¹, HU Xiangang², OUYANG Shaohu^{2*}

(1. Center of Eco-environmental Monitoring and Scientific Research, Administration of Ecology and Environment of Haihe River Basin and Beihai Sea Area, Ministry of Ecology and Environment, Tianjin 300061, China; 2. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Ministry of Education), Tianjin Key Laboratory of Environmental Remediation and Pollution Control, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: With the increase of application and research on graphene oxide (GO), the risk possibility of its release into the environment has increased, where it may interact with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). However, the effects of GO and PAH co-exposure on aquatic ecotoxicity and related metabolic mechanisms are still largely unknown. In this work, adult zebrafish was chosen as a model organism to investigate the toxic effects of single exposure to different concentrations of GO ($0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and PAHs (including 16 kinds of optimal control PAHs, each with a concentration of $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), and combined exposure to GO-PAHs at the corresponding concentration for 21 days on adult zebrafish brain tissues and the metabolism in these tissues. Enzyme results showed that $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO-PAHs could significantly ($P < 0.05$) decrease aromatic hydrocarbon receptor activity, and that all the treatments (except for PAHs) decreased concentration of cytochrome P4501A1 in adult zebrafish brain tissue. Metabolomics analysis results showed that $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO, and $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GO-PAHs exposure groups significantly influenced amino acids and fatty acids levels in adult zebrafish brain tissue. Moreover, when compared with the GO and PAHs exposure groups, the enzyme response and metabolite levels induced by the GO-PAHs combined exposure were found to be close to those induced by the GO treatment, revealing that GO was dominant in inducing metabolic toxicity in brain tissue during combined exposure of GO and PAHs in adult zebrafish.

Keywords: graphene oxide; polycyclic aromatic hydrocarbons; zebrafish; compound exposure; metabolomes

近年来,碳基纳米材料(Carbon-based nanomaterials, CNs)在农业生产链条各环节上的应用越来越广泛,尤其是在纳米农业化学品^[1]方面。氧化石墨烯(Graphene oxide, GO)作为一类重要的CNs,因其优越的理化性质而得到了广泛的研究和使用,也因此其排放到环境中的风险越来越大。多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类由两个或两个以上苯环按照线性、角状或者簇状方式相连组成的中性或非极性挥发性有机化合物^[2],是重要的环境和食品污染物。我国地表水体中PAHs的含量差异很大^[3-5]。例如,长江部分区域表层水中PAHs的含量为 $1\,630 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6],部分地区水体中的PAHs含量达到了 $7\,596.56 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[7]。CNs(包括GO)进入环境后可以吸附多种有机污染物(如PAHs和农药等)^[8],二者联合毒性可能是协同的、拮抗的或是抑制的^[9]。因此,CNs与环境中有机污染物对水生生物的联合暴露毒性作用和相关机制亟待进一步探究和评估。

鱼类在人类的生产生活中占有重要地位,而斑马鱼是一种经典的环境毒理学模式生物,同时也是研究纳米材料和PAHs的水生态毒性的常用模型生物^[10]。多环芳烃受体(AhR)是斑马鱼应对PAHs影响的受体之一,可用于PAHs对斑马鱼的毒性评估^[11];细胞色素P4501A1(CYP1A1)酶的含量是衡量芳烃和类芳烃对

生物影响的重要指标^[12],其含量和表达与AhR的活性密切相关。为考察GO与PAHs对水生生物的联合毒性效应,本研究选取环境中常见的16种PAHs为代表,将环境预测浓度的GO与环境当量浓度PAHs同时暴露于成年斑马鱼21 d,对暴露后斑马鱼脑组织的AhR活性、CYP1A1酶水平结合代谢组学进行研究,从内源代谢物层面深入阐述GO和PAHs复合暴露对成年斑马鱼脑组织毒性的影响,为全面评估GO在环境中的潜在毒理效应提供技术方法和理论参考数据。

1 材料与方法

1.1 GO与PAHs的购置与配制

本研究使用的材料均与本课题组之前的相关工作^[13]相同。GO购于南京先丰纳米科技有限公司;16种优控PAHs混合标准品购自AccuStandard(ACCU, 美国),包括:苾、苾烯、蒽、苯并蒽、苯并[a]芘、苯并[b]荧蒽、苯并[g,h,i]芘、苯并[k]荧蒽、蒎、二苯并[a,h]蒽、荧蒽、芴、茚并[1,2,3-cd]芘、蔡、菲和芘,以上16种PAHs浓度相等,均为 $2\,000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

由已有研究^[14-15]可知, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的GO浓度更接近其环境浓度,故本研究中,斑马鱼成鱼暴露的GO浓度选取 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;参考近年来我国地表水体中各种不同PAHs的平均浓

度^[2,6-7],同时考虑到进行低浓度亚急性毒性效应测试(21 d),因此选择了较低的斑马鱼成鱼的暴露PAHs(16种优控PAHs混标)浓度,即每种PAHs的浓度均为 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。GO和PAHs母液的具体配制过程如下:称取50.00 mg GO加入到1 L浓度为 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的天然海盐水中,冰浴超声30 min,得到分散性较好的 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO母液;PAHs在水中溶解度低,因此使用二甲基亚砜(DMSO)作为助溶剂,且为了使各暴露组中DMSO的最终浓度小于0.01%(质量比),配制 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PAHs混标溶液母液(即16种优控PAHs中每种PAHs的浓度均为 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),用移液器准确量取0.1 mL含有16种优控PAHs的混标溶液(浓度为 $2\text{ }000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)溶于39.9 mL DMSO中。在进行21 d斑马鱼成鱼毒性暴露实验时,将上述配制得到的GO和PAHs母液用 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的天然海盐水稀释得到所需浓度。

1.2 斑马鱼饲养与毒性暴露

1.2.1 斑马鱼的饲养

本研究暴露生物为6~8月龄AB型野生斑马鱼成鱼,饲养于配备循环水泵的30 L水箱中,饲养水为 $60\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 天然海盐水,水温为 $(28\pm 1)^{\circ}\text{C}$,光照程序为10 h黑暗/14 h光照。使用商业鱼饲料(寸金,中国)进行饲养,每天投喂两次,投喂量以斑马鱼1 min内吃完为宜。

1.2.2 斑马鱼毒性暴露实验

开始暴露前,将斑马鱼置于人工气候箱(博讯,SPX-400IC,中国)进行环境适应,气候箱温度、光照程序以及喂食均与饲养环境一致。在两周的适应期结束后,36条健康且体型相近的斑马鱼被随机分成6组,分别为对照组(CK)、 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO暴露组(GO01组)、 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO暴露组(GO1组)、 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PAHs暴露组(PAHs组)、 $0.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO + $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PAHs复合暴露组(PAHs-GO01组)和 $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ GO + $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PAHs复合暴露组(PAHs-GO1组),每组6条斑马鱼。暴露组每组置于相应1 L烧杯中,烧杯中水深为 $(23\pm 2)\text{ cm}$,水温为 $(28.0\pm 0.5)^{\circ}\text{C}$,光照周期为14 h光照/10 h黑暗。在为期21 d的暴露中,斑马鱼暴露液每隔1 d更换一次。

1.2.3 斑马鱼脑组织的获取

完成21 d的暴露实验后,使用3%三卡因(Sigma, 99%,美国)对斑马鱼施行安乐死。然后,迅速使用冰冷的生理盐水清洗斑马鱼,并将其置于解剖盘上进行解剖。解剖过程中,迅速取出斑马鱼脑组织,使用冰冷

的生理盐水清洗干净后装入洁净灭菌的离心管中,置于冰上备用。若当时不使用组织,则将其置入液氮中3 min使其固定,固定后样品存储于 -80°C 冰箱备用。

1.3 GO和PAHs复合暴露对斑马鱼脑AhR活性和CYP1A1酶的影响实验

将对照组和暴露组的斑马鱼脑组织转移至1.5 mL离心管中,加入200 μL 冰冷的生理盐水,使用电动组织匀浆器将组织匀浆2 min,制成斑马鱼脑组织匀浆。将斑马鱼脑组织匀浆使用冷冻离心机在 4°C 、 $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心5 min,吸取上清液备用。斑马鱼脑组织AhR活性和CYP1A1酶的含量使用酶联免疫法(ELISA)试剂盒(上海哈灵,中国)测定。测试过程严格按照试剂盒说明书进行,样本为斑马鱼脑组织生理盐水匀浆上清液。斑马鱼脑组织匀浆上清液蛋白质含量由BCA蛋白试剂盒(南京建成,中国)测定,测定过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.4 斑马鱼脑组织代谢组学的分析

将暴露组和对照组的脑组织清洗完毕后迅速置入液氮中,3 min后将样品取出,置于液氮上的洁净研钵中将组织研磨成粉末后进行代谢物提取,每个浓度包含3个平行样品。代谢物提取过程:(1)在研磨好的样品中加入5 mL提前保存于 -20°C 中的提取混合溶液I(甲醇-氯仿-水,体积比2.5:1:1);(2)微波辅助萃取, 40°C 、30 min,萃取完成后离心,收集上清液,然后加入5 mL提前保存于 -20°C 中的提取混合溶液I(甲醇-氯仿-水,体积比2.5:1:1),微波辅助萃取, 40°C 、15 min;(3)收集第二次上清液,并与第一次收集的上清液混合于15 mL离心管中,加入500 μL 灭菌后的去离子水, $4\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min;(4)将离心管静置,上层溶液是甲醇/水相,下层为氯仿相。甲醇/水相冷冻干燥,氯仿相用氮气吹干;(5)样品干燥后,采用两步法进行衍生化:①加入50 μL 用吡啶溶解的甲氧氨基盐酸盐($20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),密封、涡旋、短暂离心, 30°C 温浴90 min;②加入80 μL 硅烷化试剂N-甲基-N-(三甲基硅烷)-三氟乙酰胺(MSTFA), 37°C 温浴30 min;(6)转移已衍生化的样品至适合气相色谱质谱仪(GC-MS)分析的内衬管中。

衍生化后的斑马鱼代谢物使用GC-MS(6890A/5977A, Agilent, 美国)分析。气相色谱进样参数:进样量1 μL ,进样口温度 230°C ,调整分流进样模式(1:50),载气为氦气,流速 $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,使用自动进样器进样。气相色谱参数:MDN-35毛细管色谱柱(30 m),温度程序为 80°C 恒温2 min,然后以 $15^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$

的速率升温到 330 ℃,持续 6 min,传输线(Transfer Line)温度设定为 250 ℃。质谱参数:离子源温度设定为 250 ℃,质量扫描范围 m/z 为 70~600,采集速率为每秒扫描 20 次,质谱电子轰击源灯丝开启时间在色谱溶剂延迟 170 s 后,检测器电压为 1 700~1 850 V,质谱亏损设置为 0,灯丝偏置电流为 70 V,仪器自动调谐。谱图解卷积参数:力可公司自带的商业软件 Chroma TOF,基线消除(Baseline Offset)设置为 1(0.5~1);谱图平滑(Smoothing)为 5 数据点(3~7),峰宽(Peak Width)3 s(3~4 s);信噪比 S/N(Signal-to-Noise Ratio)为 10(2~15)。

1.5 数据统计分析

所有的实验组均设置 3 个或 3 个以上生物重复,结果用平均值±标准偏差表示。所得实验数据使用 SPSS 20.0 统计软件进行单因素方差(ANOVA)分析,当 $P<0.05$ 时,认为在统计学上具有显著性差异。斑马鱼脑组织代谢物数据采用均一化处理(其中未检出的代谢物使用 0 代替),以减小因数量级差距带来的系统误差。使用软件 MeV 4.9 绘制代谢物热图,同时将筛选出的代谢物数据导入 SIMCA-P11.5 软件包进行多元统计分析,数据先用无监督统计模型主成分分析(Principal components analysis, PCA),得出对照组和暴露组之间代谢物的离散趋势。斑马鱼脑组织的差异代谢物:当某暴露组(GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 组)的一种代谢物峰面积平均值与同一对照组代谢物峰面积平均值比值 >1.50 时,则该代谢物为显著上调代谢物;当比值 <0.67 时,则该代谢物为显著下调代谢物。将上述筛选出来的差异性代谢产物输入至代谢分析网站(<http://www.metaboanalyst.ca/>),点击 Path-

way Analysis 中 *Danio rerio* (zebrafish) (KEGG) 进行斑马鱼脑组织代谢通路变化分析。数据条形图和线图均使用 Origin 8.5 绘制。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼脑组织 AhR 活性和 CYP1A1 酶含量的变化

如图 1a 所示,与 CK 组相比,GO01、PAHs 和 PAHs-GO01 组均未引起斑马鱼脑组织 AhR 活性的显著变化($P>0.05$)。GO1 组和 PAHs-GO1 组的 AhR 受体活性与 CK 相比显著下降($P<0.05$),但两暴露组之间差异并不显著。如图 1b 所示,斑马鱼脑组织 CYP1A1 酶的含量表明,除 PAHs 处理组,GO01、GO1、PAHs-GO01 和 PAHs-GO1 组暴露的斑马鱼脑组织中 CYP1A1 含量都出现了显著性($P<0.05$)的下降。其中,GO1 组斑马鱼脑组织中 CYP1A1 酶含量的下降最为显著,该结果与斑马鱼脑组织 AhR 活性结果趋势类似。

2.2 斑马鱼脑组织代谢组学的变化

本研究共检测出 32 种代谢物,包含 10 种氨基酸(如色氨酸、脯氨酸和缬氨酸等)、16 种小分子酸和脂肪酸(如苹果酸、硬脂酸和花生四烯酸等),以及 6 种其他小分子代谢物(如蔗糖、肌醇和胆固醇等),其相对含量可用代谢物热图(图 2a)表示。代谢物热图分析结果表明,经 GO1、PAHs 和 PAHs-GO1 暴露后,斑马鱼成鱼脑组织中的代谢物含量与 CK 组相比有所差异。为进一步研究 GO1 组、PAHs 组和 PAHs-GO1 处理对斑马鱼脑组织代谢组学的影响区别,将检测出的斑马鱼代谢物水平进行了 PCA 聚类分析,结果如图 2b 所示,图中红色箭头的长度指示暴露组与 CK 组之间的差异程度,与 CK 组之间差异的大小与箭头长度

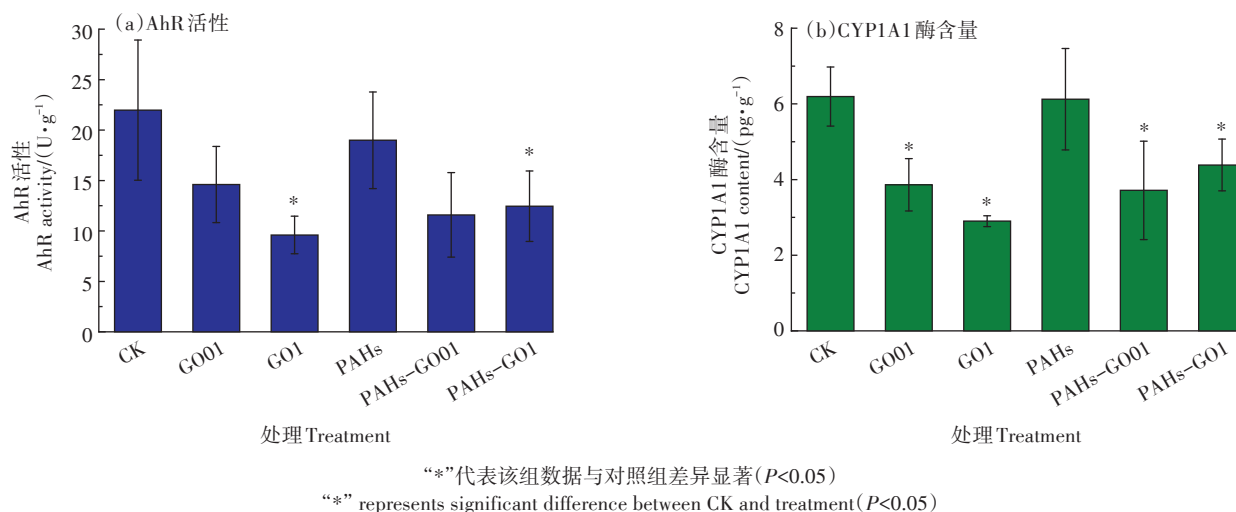
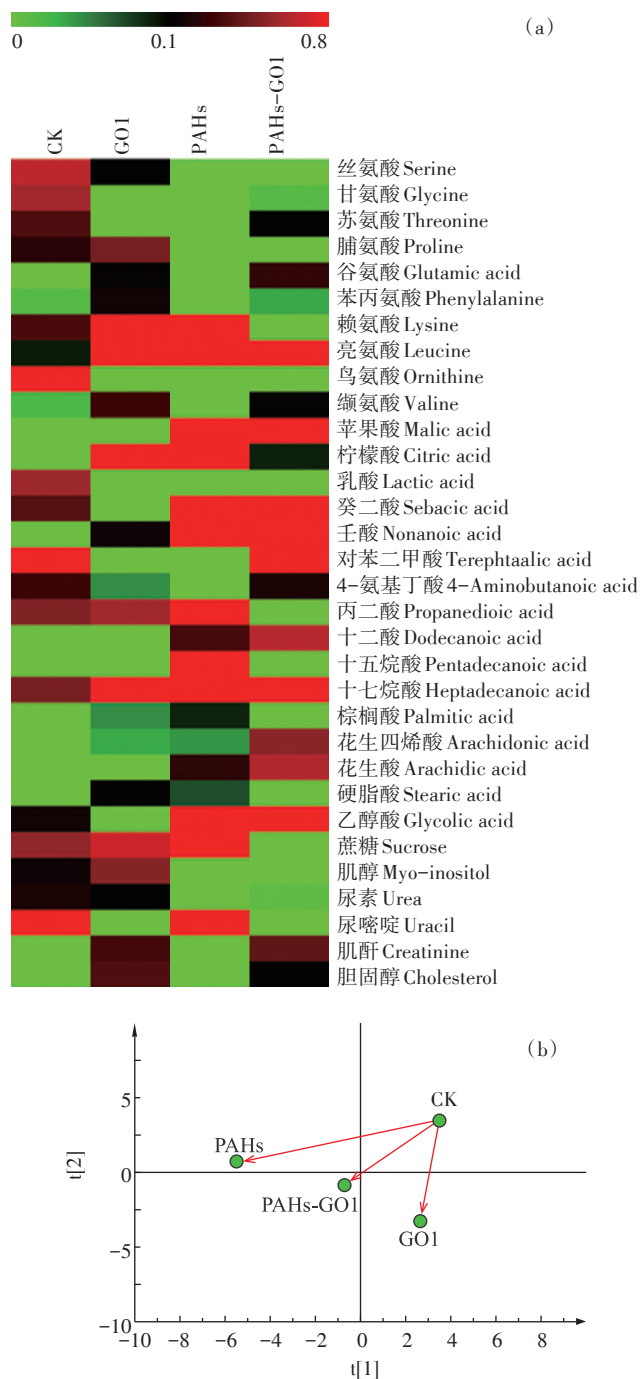


图1 斑马鱼脑组织 AhR 活性和 CYP1A1 酶含量分析

Figure 1 Zebrafish brain AhR activity and CYP1A1 enzyme content analysis



(a)为代谢物热图;(b)为PCA分析,暴露组与CK组之间的代谢物差异与其相应的箭头长度成正比

(a) represents the heatmap in metabolites; (b) represents the PCA analysis. Red arrows in (b) represent the distance between treatment groups and control. The alteration is proportion to the distance of the arrow

图2 CK组、GO1组、PAHs组和PAHs-GO1组斑马鱼脑组织代谢物以及代谢物PCA分析

Figure 2 Metabolites and their PCA analysis of zebrafish's brain tissues in CK, GO1, PAHs, and PAHs-GO1 groups

成正比。对比GO1、PAHs和PAHs-GO1暴露组PCA分析结果,可知对斑马鱼代谢物影响最大的组为

PAHs组,其次为PAHs-GO1组,而GO1组对斑马鱼脑组织代谢物的影响最小。

本研究将暴露组与CK组代谢物含量比值>1.50或<0.67分别视为显著性上调或者下调代谢产物,以此为标准,可以获得GO1组、PAHs组和PAHs-GO1组的显著差异代谢物的类别、数量以及上下调情况,结果如表1所示。由表可知,在所有处理组中具有最多显著差异代谢物的是PAHs组,共有26种,其主要组成为:9种下调氨基酸(如丝氨酸、脯氨酸、谷氨酸和缬氨酸等)、13种脂肪酸和小分子酸(如柠檬酸、苹果酸、壬酸和花生四烯酸等)和4种其他下调小分子代谢物(蔗糖、肌醇、尿素和尿嘧啶)。PAHs-GO1组中的显著差异代谢物有21种,略少于PAHs组,其中包括6种显著下调氨基酸,包括丝氨酸、脯氨酸、赖氨酸和DL-鸟氨酸等;12种脂肪酸和小分子酸,包括柠檬酸、苹果酸、丙二酸和花生酸等;3种其他下调小分子代谢物,包括蔗糖、肌酐和尿嘧啶。显著差异代谢物最少的是GO1组,主要包括4种氨基酸(丝氨酸、亮氨酸、甘氨酸和DL-鸟氨酸)、9种脂肪酸和小分子酸(如柠檬酸、苹果酸、癸二酸和十七烷酸等),以及2种其他小分子代谢物(肌醇和尿嘧啶),共15种。由以上结果可知,所有暴露组的显著差异代谢物水平排序为GO1组<PAHs-GO1组<PAHs组。3个暴露组中的显著差异代谢物既有相同也有不同,具体表现为:丝氨酸、甘氨酸、DL-鸟氨酸、乳酸、对苯二甲酸和尿嘧啶在3个暴露组中均显著下调,而花生四烯酸在3个暴露组中均显著下调;苏氨酸、L-谷氨酸、缬氨酸、4-氨基丁酸、十五烷酸、肌醇和尿素仅在PAHs组中出现了显著差异;脯氨酸、赖氨酸、丙二酸、蔗糖、壬酸和花生酸6种代谢物在GO1组中不是显著差异物,而在PAHs

表1 GO1组、PAHs组和PAHs-GO1组显著差异代谢物数量统计

Table 1 Statistical number table of metabolites with significant differences in GO1, PAHs and PAHs-GO1 groups

代谢物种类 Metabolite type	GO1	PAHs	PAHs-GO1
上调氨基酸	1	0	0
下调氨基酸	3	9	6
上调脂肪酸	1	8	6
下调脂肪酸	8	5	6
上调其他	1	0	1
下调其他	1	4	2
总计	15	26	21

组和PAHs-GO1组中均相比于CK有显著变化;显著下调代谢物脯氨酸、赖氨酸、丙二酸和蔗糖在PAHs组中的差异倍数均大于这5种代谢物在PAHs-GO1组的差异倍数。

2.3 斑马鱼脑组织代谢通路的变化

根据本研究中的显著差异代谢物得到的GO1组、PAHs组和PAHs-GO1组的脑组织显著变化($P < 0.05$)的代谢通路见表2。结果表明,PAHs组拥有最多的显著差异变化的代谢通路,共8个;GO1组造成了斑马鱼脑组织3个代谢通路的显著变化,PAHs-GO1组仅引起了2个代谢通路的显著变化。以上代谢通路结果与代谢物差异分析结果(表1)一致。

表2 暴露组显著变化代谢通路

Table 2 The significantly changed metabolic pathways table in the exposure group

代谢通路名称 Metabolic pathway	GO1	PAHs	GO1-PAHs
氨酰基-tRNA的生物合成	√	√	√
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸代谢	-	√	-
乙醛酸和二羧酸代谢	√	√	√
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	-	√	-
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	√	√	-
精氨酸和脯氨酸代谢	-	√	-
丁酸酯代谢与泛酸	-	√	-
CoA生物合成	-	√	-

注:“√”代表该代谢通路在暴露组有显著变化,“-”代表该代谢通路在暴露组没有显著变化。

Note: “√” represents that the metabolic pathway changed significantly in treatment group, “-” represents that the metabolic pathway didn't change significantly in treatment group.

3 讨论

有报道指出,在高浓度的两种PAHs作用下斑马鱼幼鱼的急性毒性反应可通过AhR活性的变化来表现,同时P450抗氧化酶相关基因CYP1和ahr2也会受到影响^[12]。有研究表明,生物线粒体活性氧的产生与AhR相关^[16],而活性氧又与生物的氧化损伤密切相关^[12-13]。本研究中,各处理组AhR活性变化趋势(图1a)与CYP1A1酶含量(图1b)一致,说明两者之间可能存在正向相关性。LI等^[13]的研究认为GO对PAHs引起的水稻根部AhR活性变化有促进作用,而本研究中GO1组与PAHs-GO1组的AhR活性与CYP1A1酶含量没有显著差异($P > 0.05$),其原因可能为:与植物根部直接与PAHs和GO接触不同,成年斑马鱼血脑屏障会降低PAHs和GO对脑组织的影响;PAHs和GO在同一浓度下对不同物种的影响,尤其对动物和

植物的影响程度可能不同^[17-18]。

有报道指出,PAHs可以扰乱生物的代谢通路^[19]。尽管在本研究中PAHs的暴露浓度明显小于以往研究^[12],但依然诱发了大量的脂质和氨基酸变化,且代谢组学对PAHs的响应相较于GO更明显(PAHs组>PAHs-GO1组>GO1组,表1和表2)。尽管GO组诱发的差异变化脂肪酸数量小于PAHs组,但GO组差异代谢脂肪酸在总差异代谢物中的占比(60%)大于PAHs组(50%),说明在代谢物变化中GO对脂肪酸的影响更大。氧化酶的损伤是GO对生物的重要效应之一,其变化也与脂质的变化密切相关^[20]。GO1组中CYP1A1酶含量低于PAHs组(图1b),这与上述暴露组代谢物中脂肪酸的变化趋势一致。PAHs与石墨烯类纳米材料的相互作用可能会改变纳米材料表面的性质,如SUN等^[21]认为,PAHs与石墨烯类材料进行相互作用时,PAHs会填充还原GO之间的孔隙,而纳米材料的结构和表面官能团也是影响其毒性的重要指标^[22-24]。而在本研究中,PAHs-GO1组的显著差异代谢物的组成与GO组高度相似,说明在本研究浓度下,GO与PAHs对成年斑马鱼的复合暴露中,GO可能占据主导地位。但PAHs-GO1组诱发的显著差异代谢物数量已经超过了GO组,这可能是由于PAHs并没有完全被GO吸附,当PAHs浓度增大时其可能诱发的环境和生态风险仍不能忽视。

以上结果说明,在0.1 mg·L⁻¹的GO与5 μg·L⁻¹的PAHs复合暴露时,对斑马鱼脑组织AhR活性和CYP1A1酶含量产生毒性效应的物质主要是GO。相比于单独暴露的GO组和PAHs组,GO-PAHs复合暴露中AhR活性(图1a)和CYP1A1酶含量都要高于GO组(图1b),且GO-PAHs诱发的差异代谢通路数量少于GO和PAHs组(表2),说明PAHs与GO的复合暴露效应为轻微的拮抗效应。另外,PAHs诱发的显著变化代谢物和代谢通路的数量和种类都超过了单独GO暴露组和GO-PAHs复合组,说明低浓度PAHs水平暴露依然可以诱发斑马鱼脑组织的代谢毒性。以上结果提示,不应仅根据常规指标来对联合毒性进行研究,还应结合更加灵敏的分子手段,对新型污染物与环境污染物的联合毒性进行更为全面的评估和研究。本文研究的是GO与16种优控PAHs混标对斑马鱼成鱼的毒理效应的影响,而不同种类PAHs性质差别很大,在未来研究中应该加强GO与不同单一PAHs的复合毒性效应研究,以加深对GO与不同性质PAHs联合暴露时的复合毒理差异的理解。

4 结论

(1)氧化石墨烯(GO)暴露对斑马鱼脑组织的影响重点在于氧化酶及相应过程,而与多环芳烃(PAHs)的复合暴露对斑马鱼脑组织的影响侧重于代谢物的变化。

(2)0.1 mg·L⁻¹ GO与5 μg·L⁻¹ PAHs组对斑马鱼脑组织的效应与GO组对脑组织的效应较为相似,说明该浓度的复合暴露中GO的作用占主导,但PAHs诱发的效应也不容忽视。

(3)在0.1 mg·L⁻¹ GO与5 μg·L⁻¹ PAHs对斑马鱼脑组织复合暴露时,PAHs与GO的复合暴露效应为轻微的拮抗效应。

参考文献:

- [1] 李小龙, 孙占伟, 过伟民, 等. 纳米碳增效肥料对烟草农艺性状和经济指标的影响[J]. 土壤, 2016, 48(4): 831-834. LI X L, SUN Z W, GUO W M, et al. Effects of nano-carbon synergistic fertilizer on agronomical characters and economic indices of flue-cured tobacco[J]. *Soils*, 2016, 48(4): 831-834.
- [2] 范博, 王晓南, 黄云, 等. 我国七大流域水体多环芳烃的分布特征及风险评价[J]. 环境科学, 2019, 40(5): 2101-2114. FAN B, WANG X N, HUANG Y, et al. Distribution and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in water bodies in seven basins of China[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(5): 2101-2114.
- [3] WANG Y L, XIA Z H, LIU D, et al. Multimedia fate and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in a coking industry city in northern China[J]. *Environmental Pollution*, 2013, 181: 115-121.
- [4] XU S S, LIU W X, TAO S. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons in China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(3): 702-708.
- [5] LI Y, LIU J, CAO Z, et al. Spatial distribution and health risk of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the water of the Luanhe River Basin, China[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 163(1/2/3/4): 1-13.
- [6] TANG Y M, JUNAID M, NIU A, et al. Diverse toxicological risks of PAHs in surface water with an impounding level of 175 m in the Three Gorges Reservoir area, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 580(15): 1085-1096.
- [7] YAN J X, LIU J L, SHI X, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water from three estuaries of China: Distribution, seasonal variations and ecological risk assessment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2016, 109(1): 471-479.
- [8] WANG J, CHEN Z, CHEN B. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by graphene and graphene oxide nanosheets[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(9): 4817-4825.
- [9] SCHIRINZI G F, PEREZ-POMEDA I, SANCHIS J, et al. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells[J]. *Environmental Research*, 2017, 159: 579-587.
- [10] GARCIA G R, NOYES P D, TANGUAY R L. Advancements in zebrafish applications for 21st century toxicology[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016, 161: 11-21.
- [11] ZHANG Y, WANG C, HUANG L, et al. Low-level pyrene exposure causes cardiac toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 114/115: 119-124.
- [12] GEIER M C, CHLEBOWSKI A C, TRUONG L, et al. Comparative developmental toxicity of a comprehensive suite of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Archives of Toxicology*, 2018, 92(2): 571-586.
- [13] LI X K, MU L, HU X G. Integrating proteomics, metabolomics and typical analysis to investigate the uptake and oxidative stress of graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environmental Science-Nano*, 2018, 5(1): 115-129.
- [14] NOUARA A, WU Q, LI Y, et al. Carboxylic acid functionalization prevents the translocation of multi-walled carbon nanotubes at predicted environmentally relevant concentrations into targeted organs of nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Nanoscale*, 2013, 5(13): 6088-6096.
- [15] SUN J, ZHOU Q X, HU X G. Integrating multi-omics and regular analyses identifies the molecular responses of zebrafish brains to graphene oxide: Perspectives in environmental criteria[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 180: 269-279.
- [16] SENFT A P, DALTON T P, NEBERT D W, et al. Mitochondrial reactive oxygen production is dependent on the aromatic hydrocarbon receptor[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, 33(9): 1268-1278.
- [17] SU Y H, ZHU Y G. Uptake of selected PAHs from contaminated soils by rice seedlings (*Oryza sativa*) and influence of rhizosphere on PAH distribution[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 155(2): 359-365.
- [18] LUCAS J, BONNIEUX A, LYPHOUT L, et al. Trophic contamination by pyrolytic polycyclic aromatic hydrocarbons does not affect aerobic metabolic scope in zebrafish *Danio rerio*[J]. *Journal of Fish Biology*, 2016, 88(1): 433-442.
- [19] COCCI P, MOSCONI G, PALERMO F A. Pregnane X receptor (PXR) signaling in seabream primary hepatocytes exposed to extracts of seawater samples collected from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated coastal areas[J]. *Marine Environmental Research*, 2017, 130: 181-186.
- [20] LUCAS D, GOULITQUER S, MARIENHAGEN J, et al. Stereoselective epoxidation of the last double bond of polyunsaturated fatty acids by human cytochromes P450[J]. *Journal of Lipid Research*, 2010, 51(5): 1125-1133.
- [21] SUN Y B, YANG S B, ZHAO G X, et al. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on graphene oxides and reduced graphene oxides[J]. *Chemistry-An Asian Journal*, 2013, 8(11): 2755-2761.
- [22] PATCHIN E S, ANDERSON D S, SILVA R M, et al. Size-dependent deposition, translocation, and microglial activation of inhaled silver nanoparticles in the rodent nose and brain[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2016, 124(12): 1870-1875.
- [23] XU Q H, GUAN P P, ZHANG T, et al. Silver nanoparticles impair zebrafish skeletal and cardiac myofibrillogenesis and sarcomere formation[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 200: 102-113.
- [24] BRUN N R, KOCH B E V, VARELA M, et al. Nanoparticles induce dermal and intestinal innate immune system responses in zebrafish embryos[J]. *Environmental Science-Nano*, 2018, 5(4): 904-916.

(责任编辑:宋潇)