

纳米氧化铝对斑马鱼学习记忆水平的影响： 粒径与铝离子的作用

范蓉, 陈金, 张萍, 尚楠, 贺凯宏, 葛翠翠, 牛侨, 张玲, 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] 纳米氧化铝作为一种新兴的纳米材料, 由于其特殊的理化性质, 被广泛应用于化工、生物、电子和复合材料等方面, 其潜在健康危害已引发关注。

[目的] 本研究旨在探究纳米氧化铝颗粒对成年斑马鱼学习记忆水平的损伤程度, 分析其中粒径与溶出铝离子的作用。

[方法] 将3月龄斑马鱼分为3组, 分别为对照组、13、50 nm的纳米氧化铝组, 以研究纳米氧化铝的粒径效应; 另将3月龄斑马鱼分为4组, 分别为对照组、50 nm的纳米氧化铝组、50 nm的纳米碳组、 AlCl_3 组, 以研究铝的粒径和离子的分别效应。设定13、50 nm的纳米氧化铝和50 nm的纳米碳组的染毒浓度为100 mg/L, AlCl_3 组为100 $\mu\text{g/L}$ 。染毒时间为30 d, 染毒结束后进行T迷宫实验, 用动物运动轨迹跟踪仪器记录斑马鱼的运动轨迹, 分析各组斑马鱼行为学指标, 包括第一次潜伏期[从实验开始到第一次进入营养富集区(EC区)所花费的时间]和累计停留时间(在EC区停留的总时间)。

[结果] 各染毒组与对照组相比运动轨迹都出现不同程度的杂乱, 在EC区停留的时间均有不同程度的减少。在粒径效应研究中得出, 第一次潜伏期比较, 纳米氧化铝13 nm组与50 nm组相比差异无统计学意义; 在EC区的累计停留时间比较, 纳米氧化铝13 nm组与50 nm组相比第1天和第2天在EC区的累计停留时间均明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。在对50 nm纳米氧化铝的粒径和离子的分别效应研究中得出, 与50 nm的纳米碳组相比, 50 nm的纳米氧化铝组在实验的第3天、第4天的第一次潜伏期延长($P < 0.05$)。但是, 50 nm纳米氧化铝组与 AlCl_3 组间没有发现差异($P > 0.05$)。在EC区的累计停留时间比较, 50 nm纳米氧化铝组与50 nm纳米碳组相比第1天在EC区的累计停留时间减少($P < 0.05$)。但是, 50 nm纳米氧化铝组与 AlCl_3 组间没有发现差异($P > 0.05$)。从斑马鱼运动轨迹图中可以看出对照组运动轨迹更加简洁, 在EC区停留的时间较多, 在错误端探索的时间较少, 表明学习记忆水平良好。

[结论] 纳米氧化铝可以造成成年斑马鱼的学习记忆障碍, 纳米氧化铝对斑马鱼的学习记忆的影响呈粒径越小, 毒性越大的趋势; 在50 nm纳米氧化铝对斑马鱼学习记忆水平的影响中铝离子发挥着重要的作用。

关键词： 纳米氧化铝; 铝离子; 颗粒粒径; 斑马鱼; 神经毒性

Effects of nano-alumina on learning and memory levels in zebrafish: Roles of particle size and aluminum ion FAN Rong, CHEN Jin, ZHANG Ping, SHANG Nan, HE Kai-hong, GE Cui-cui, NIU Qiao, ZHANG Ling, ZHANG Qin-li (Department of Occupational Medicine, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract:

[Background] As an emerging nanomaterial, nano-alumina is widely used in chemical, biological, and electronic industries and composite materials due to its special physical and chemical properties, attracting increasing attention to its potential health hazards.

[Objective] The purpose of this study is to investigate the damage to the learning and memory levels of adult zebrafish by nano-alumina particles, and the roles of particle size and dissolved aluminum ions.

[Methods] To evaluate the effects of particle size, zebrafishes at 3 months old were divided into three groups: control group, 13 nm nano-alumina group, and 50 nm nano-alumina group. To investigate the individual role of particle size or dissolved aluminum ion of nano-alumina,

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18848

基金项目

国家自然科学基金(81673142)

作者简介

范蓉(1993—), 女, 硕士生;
E-mail: fanrongff@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 2018-12-24

录用日期 2019-04-18

文章编号 2095-9982(2019)06-0526-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

范蓉, 陈金, 张萍, 等. 纳米氧化铝对斑马鱼学习记忆水平的影响: 粒径与铝离子的作用[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(6): 526-532.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18848

Funding

This study was funded.

Correspondence to

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

Competing interests None declared

Received 2018-12-24

Accepted 2019-04-18

►To cite

FAN Rong, CHEN Jin, ZHANG Ping, et al. Effects of nano-alumina on learning and memory levels in zebrafish: Roles of particle size and aluminum ion[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(6): 526-532.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18848

zebrafishes at 3 months old were divided into four groups: control group, 50 nm nano-alumina group, 50 nm nano-carbon group, and AlCl_3 group. The concentrations of nano-alumina and nano-carbon group were both set at 100 mg/L, and the concentration of AlCl_3 was 100 $\mu\text{g/L}$. After 30 days of exposure, T-maze test was performed and a video tracking system were used to record the trajectory and analyze the behavioral indicators of zebrafish, including the first latency [the time from the start of the experiment to the first entry into the enriched chamber (EC)] and cumulative duration (total time spent in the EC).

[Results] Compared with the control group, the exposure groups showed different degrees of chaotic trajectories and reduced duration in the EC. In the study of particle size, the first latency was not different between the 13 nm nano-alumina group and the 50 nm nano-alumina group; the cumulative duration in the 13 nm nano-alumina group was significantly lower than that in the 50 nm nano-alumina group on the first and second days of the experiment ($P < 0.05$). In the study of particle size and ion, the first latency in the 50 nm nano-alumina group was prolonged compared with the 50 nm nano-carbon group on the third and fourth days of the experiment ($P < 0.05$), but no statistical difference was found between the 50 nm nano-alumina group and the AlCl_3 group ($P > 0.05$); the cumulative duration in the 50 nm nano-alumina group in the EC on the first day was reduced compared with the 50 nm nano-carbon group ($P < 0.05$), but no statistical difference was found between the 50 nm nano-alumina group and the AlCl_3 group ($P > 0.05$). According to the zebrafish trajectory map, the control group showed a more orderly trajectory, longer cumulative duration in the EC, and less duration in the opposite area than the other groups, indicating a good learning and memory level.

[Conclusion] Nano-alumina can cause learning and memory disorders in adult zebrafish. A smaller particle size of nano-alumina is linked to a greater toxicity to learning and memory of zebrafish. Aluminum ions play an important role in the effect of 50 nm nano-alumina on the learning and memory levels of zebrafish.

Keywords: nano-alumina; aluminum ion; particle size; zebrafish; neurotoxicity

目前, 纳米材料被广泛应用于食品包装、生物医学、航空工业、农业等方面^[1-4]。纳米颗粒可以通过呼吸系统、消化系统、皮肤、血液等多种途径进入人体, 并对肝脏、肾脏、肺组织等多种器官产生损害^[5-6]。纳米颗粒由于其特殊的粒径优势可以穿过血脑屏障, 进入到脑实质中^[7-8]。研究发现低剂量暴露的二氧化钛纳米颗粒可能导致斑马鱼出现脑损伤、神经元凋亡等现象^[9]。研究还发现纳米银颗粒可以进入大脑并诱导神经毒性^[10]。由于中枢神经系统缺少有效的防御机制, 所以对于微小的环境改变十分敏感, 因此即使是微量的物质进入都能够引起中枢神经系统的病变^[11]。

纳米颗粒的毒性与其剂量、颗粒粒径、表面电荷、化学性质等有关^[12-16]。纳米氧化铝作为一种新型的纳米材料不仅具有氧化铝硬度高、耐热、耐腐蚀的特点, 还具有纳米材料的光催化和较好延展性等特点^[17]。纳米氧化铝可以透过血脑屏障在染毒小鼠的大脑中蓄积, 并可以进入神经细胞, 引起染毒小鼠学习记忆能力下降^[18]。纳米氧化铝可以引起神经细胞溶酶体异常增生^[19], Beclin-1 介导的线粒体自噬是神经细胞损伤和学习记忆能力下降的重要机制^[20]。研究显示纳米氧化铝颗粒粒径越小毒性越大^[21-22]。在研究纳米氧化铝对斑马鱼神经行为的损伤作用中发现, 随着纳米氧化铝染毒浓度的增加, 纳米颗粒在斑马鱼幼鱼脑部的蓄积量增加, 溶解出的铝元素含量也升高^[23], 提示纳米氧化铝颗粒可能具有溶出部分铝离子的化学毒性。为了验证这一假说, 我们选用3月龄斑马鱼为研究对象, 用氯化铝 (AlCl_3) 暴露组作为离子对照组, 用粒径为

50 nm 的纳米碳暴露组作为颗粒对照组, 染毒时间为30 d, 染毒结束后通过T迷宫实验进行学习记忆水平及行为学指标的检测, 了解纳米氧化铝对斑马鱼学习记忆水平的损伤, 为后续对纳米氧化铝毒作用机制和安全性研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与试剂 实验TU系野生型斑马鱼(中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心), 结晶 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 分析纯 (Sigma, 美国), 盐酸分析纯 (天津科密欧化学试剂, 中国), 13、50 nm 粒径的纳米氧化铝, 50 nm 粒径的纳米碳 (Sigma, 美国), 其余化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.2 主要仪器 斑马鱼养殖系统 (爱生科技发展有限公司, 中国), 循环净水机 (Heal Force, 中国香港), ZXSR-1090 真彩触摸屏生化培养箱 (上海智城, 中国), 动物运动跟踪软件 EthoVision XT (Noldus Information Technology, 荷兰), 倒置荧光屏数码显微镜 (OLYMPUS, 日本), 便携式 pH 计 (Alalis, 中国), 低温高速离心机 (Eppendorf, 德国), 超声波清洗机 (宁波新芝生物, 中国), 透射电子显微镜 (JEM-100CX, 日本), nano-ZS90 纳米粒度仪 (Malvern Panalytical, 英国)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物饲养环境及分组 实验TU系斑马鱼饲养环境为: 水温 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 导电率 500~550 $\mu\text{S/cm}$, pH 值 7.0~7.5。为了探讨纳米铝的粒径间作用, 将3月

龄斑马鱼分为3组,分别为对照组,粒径为13 nm和50 nm的纳米氧化铝组;为了探讨纳米粒径及溶出铝离子的作用,将3月龄斑马鱼分为4组,分别为对照组,粒径为50 nm的纳米氧化铝组,粒径为50 nm的纳米碳组(颗粒对照组), AlCl_3 组(离子对照组)。50、13 nm的纳米氧化铝和50 nm的纳米碳组的染毒浓度为100 mg/L, AlCl_3 组为100 $\mu\text{g/L}$ 。

1.2.2 染毒液的配制 纳米氧化铝理化性质:常温下为白色晶状体,不易溶于水,但易溶于酸碱,熔点为2050°C,初沸点为2980°C, pH为4.5~5.5,纯度为99.9%。纳米碳理化性质:常温下为黑色粉末,不溶于水,粒径 $\leq 50\text{nm}$,纯度 $>99\%$ 。配制染毒液时,将粒径为13、50 nm的纳米氧化铝和粒径为50 nm的纳米碳颗粒溶于养殖系统水(养殖系统水主要成分为反渗透水,由循环净水机制备,并用NaCl、 NaHCO_3 经过养殖系统自动调节pH值至7.0~7.5,导电率为500~550 $\mu\text{S/cm}$)中,配制为1 g/L的母液,并在染毒前超声处理30 min后,用养殖系统水稀释成100 mg/L的染毒液。将 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 配制成1 g/L的母液,用养殖系统水将母液稀释成100 $\mu\text{g/L}$,用 NaHCO_3 调节pH至6.4。

1.2.3 纳米颗粒的表征 将纳米氧化铝和纳米碳颗粒配制成100 mg/L的悬液,经超声处理30 min后,吸取10 μL 的一滴悬液滴到铜网上,待铜网干燥后,用透射电镜观察纳米颗粒的形状,用nano-ZS90纳米粒度仪测定纳米颗粒的平均粒径和电位。

1.2.4 急性染毒方法 将2 L不同的染毒液注入容积为3 L的鱼缸中,每个鱼缸放置20条成年斑马鱼,每2 d定时更换二分之一染毒液,染毒周期为30 d。每天按时喂食丰年虾2次,清洁鱼缸1次,除去鱼缸中的杂物。

1.2.5 斑马鱼T迷宫实验 按照文献[24-26]提供的方法进行斑马鱼T迷宫实验。T迷宫分为长臂和短臂两部分,由透明的丙烯酸玻璃板拼接而成。长臂长:宽:高=40 cm:10 cm:10 cm;短臂长:宽:高=20 cm:10 cm:10 cm。在长臂最前端设计一个长:宽:高=10 cm:10 cm:10 cm的起点,有一个可控的挡板隔开,在短臂两端分别放置红色和绿色套筒。有研究表明斑马鱼对红色和绿色都表现出相同的偏好^[24],因此可以避免对颜色的偏好所带来的误差。实验开始时,将一滴丰年虾放入两短臂中的任意一侧(绿色端)中,来营造营养富集区(EC区)。并应用动物运动轨迹跟踪仪器记录斑马鱼运动轨迹4 min,同时记录斑马鱼的第一次潜伏期(从实验开始到第一次

进入EC区所花费的时间)和累计停留时间(在EC区停留的总时间)。

1.3 统计学方法

采用SPSS 17.0分析软件进行统计学分析,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用重复测量方差分析对各组斑马鱼4 d内的第一次潜伏期和累计停留时间进行比较,若不满足球形对称检验,则采用Greenhouse-Geisser校正自由度。采用交互作用分析实验分组与时间之间的作用。方差分析采用单因素方差分析,多重比较采用最小显著差法(LSD-t)检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 纳米氧化铝的表征

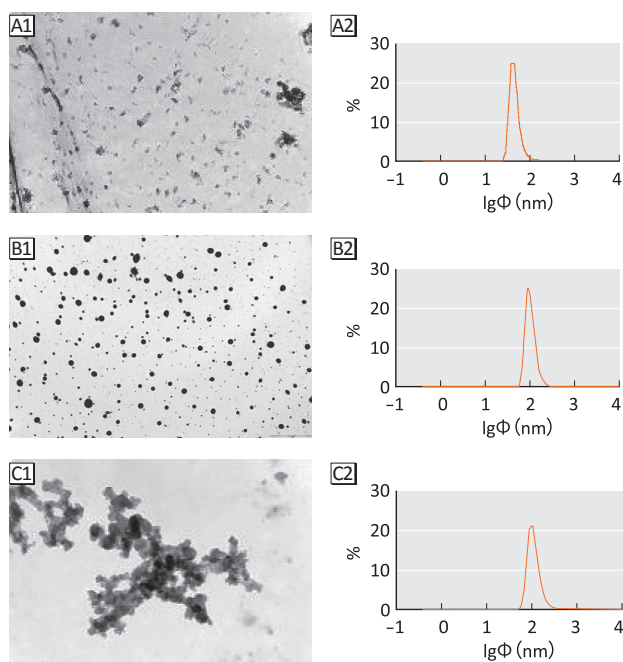
如图1A1所示,在透射电镜下观察到13 nm的纳米氧化铝呈现出多边形形态且均匀分布在溶液中,用图像分析软件(Image-proplus)对透射电镜结果分析得到其平均粒径为(20.9 $\pm$ 9.5) nm(图1A2),用纳米粒度仪检测纳米氧化铝悬液的Zeta电位,测得其平均电位为(49.4 $\pm$ 2.2) mV。如图1B1所示,50 nm的纳米氧化铝呈现规则的球形且均匀分布,其平均粒径为(112.4 $\pm$ 24.5) nm(图1B2),平均电位为(44.3 $\pm$ 9.1) mV。如图1C1所示50 nm的纳米碳呈现片状颗粒且均匀分布,其平均粒径为(116.1 $\pm$ 14.5) nm(图1C2),平均电位为(-20.4 $\pm$ 1.6) mV。

2.2 各组斑马鱼的行为轨迹图

图2为各组斑马鱼T迷宫的运动轨迹图,图中长臂前端为起点,左下的短臂端为EC区。A图为对照组,从图中可以看出对照组运动轨迹简洁,在EC区停留的时间较多,在错误端探索的时间较少。B图为13 nm纳米氧化铝组,C图为50 nm纳米氧化铝组,D图为 AlCl_3 组,E图为50 nm纳米碳组,与对照组相比运动轨迹都出现不同程度的杂乱,在EC区停留的时间均有不同程度的减少。

2.3 第一次潜伏期

2.3.1 粒径之间的比较 13、50 nm纳米氧化铝粒径之间比较结果如图3所示。组间两两比较发现,第1天、第2天、第3天、第4天,13、50 nm纳米氧化铝组第一次潜伏期均较对照组延长($P<0.05$);纳米氧化铝13 nm组与50 nm组相比差异无统计学意义。不同实验天数间第一次潜伏期的差异具有统计学意义($F=27.775$, $P<0.05$),分组与实验时间不存在交互作用($F=1.780$, $P>0.05$)。

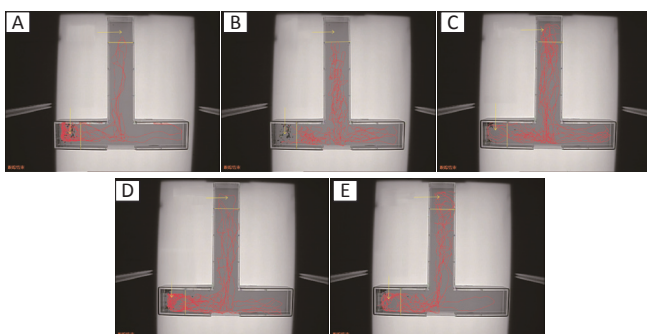


[注] A1: 13 nm 纳米氧化铝 ($\times 120\,000$) 电镜图; A2: 13 nm 纳米氧化铝粒度分布图; B1: 50 nm 纳米氧化铝 ($\times 60\,000$) 电镜图; B2: 50 nm 纳米氧化铝粒度分布图; C1: 50 nm 纳米碳 ($\times 100\,000$) 电镜图; C2: 50 nm 纳米碳粒度分布图。

[Note] A1: 13 nm nano-alumina by transmission electron microscope ($\times 120\,000$); A2: Particle size distribution of 13 nm nano-alumina; B1: 50 nm nano-alumina by transmission electron microscope ($\times 60\,000$); B2: Particle size distribution of 50 nm nano-alumina; C1: 50 nm nano-carbon by transmission electron microscope ($\times 100\,000$); C2: Particle size distribution of 50 nm nano-carbon.

图1 透射电镜下不同粒径纳米氧化铝和50 nm 纳米碳经超声处理后的分布情况及粒度分布图

Figure 1 Transmission electron microscope images and particle size distribution of nano-alumina at selected particle sizes and 50 nm nano-carbon under ultrasonic conditions

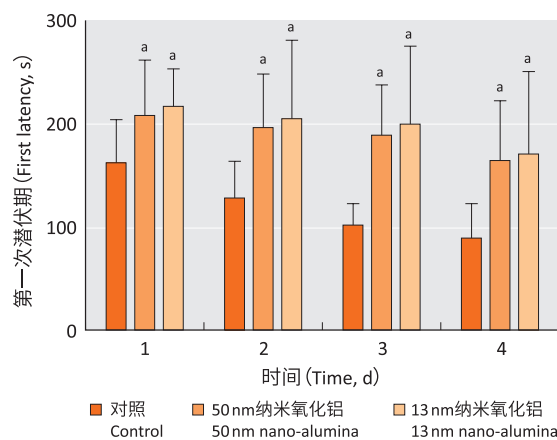


[注] 图中长臂前端为起点, 左下的短臂端为营养富集区。A: 对照组; B: 13 nm 纳米氧化铝组; C: 50 nm 纳米氧化铝组; D: AlCl_3 组; E: 50 nm 纳米碳组。

[Note] The long arm front end is the starting point, and the short arm end at lower left is the enriched chamber. A: Control group; B: 13 nm nano-alumina group; C: 50 nm nano-alumina group; D: AlCl_3 group; E: 50 nm nano-carbon group.

图2 各组斑马鱼T迷宫行为轨迹图

Figure 2 Zebrafish trajectories by T-maze test

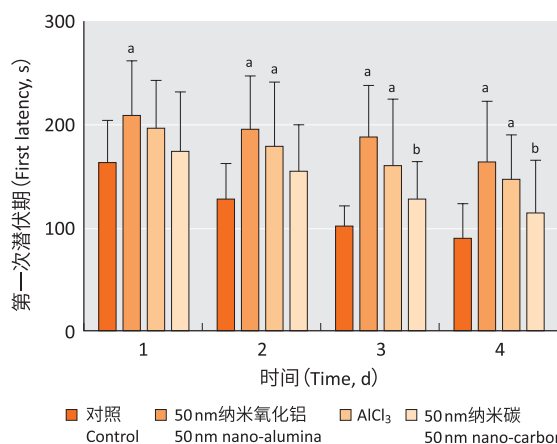


[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

[Note] a: Compared with the control group, $P < 0.05$. All data are expressed as $\bar{x} \pm s$.

图3 暴露于不同粒径纳米氧化铝悬液斑马鱼的第一次潜伏期
Figure 3 The first latencies of zebrafish exposed to nano-alumina suspension at selected particle sizes

2.3.2 粒径与溶出铝离子的分别作用比较 50 nm 纳米氧化铝粒径及溶出铝离子分别作用的比较结果如图4所示。组间两两比较发现, 从实验的第1天开始纳米氧化铝 50 nm 组斑马鱼与对照组相比第一次潜伏期即有所延长 ($P < 0.05$)。 AlCl_3 组斑马鱼从实验的第2天开始与对照组相比第一次潜伏期均有所延长 ($P < 0.05$)。在实验的第3天、第4天, 50 nm 的纳米氧化铝组与 50 nm 的纳米碳组相比第一次潜伏期延长 ($P < 0.05$)。但是, 50 nm 纳米氧化铝组与 AlCl_3 组间没有发现统计学差异 ($P > 0.05$)。不同实验天数间的第一次潜伏期的差异具有统计学意义 ($F = 88.304$, $P < 0.05$), 分组与实验时间不存在交互作用 ($F = 2.019$, $P > 0.05$)。



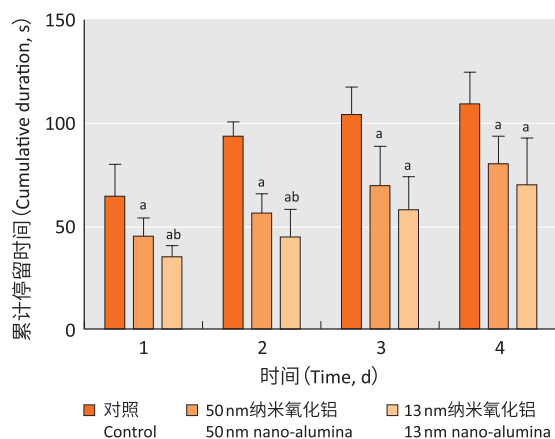
[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 50 nm 纳米氧化铝组相比, $P < 0.05$ 。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

[Note] a: Compared with the control group, $P < 0.05$; b: Compared with the 50 nm nano-alumina group, $P < 0.05$. All data are expressed as $\bar{x} \pm s$.

图4 暴露于纳米颗粒悬液和 AlCl_3 溶液斑马鱼的第一次潜伏期
Figure 4 The first latencies of zebrafish exposed to nanoparticle suspension and AlCl_3 solution

2.4 T 迷宫累计时间

2.4.1 粒径之间比较 13、50 nm 纳米氧化铝粒径之间比较如图 5 所示。组间两两比较发现，纳米氧化铝组 50、13 nm 组与对照组相比第 1 天即出现在 EC 区的累计停留时间减少 ($P < 0.05$)；纳米氧化铝组 13 nm 组第 1 天、第 2 天在 EC 区的累计停留时间较 50 nm 组减少 ($P < 0.05$)。不同实验天数累计停留时间的差异也具有统计学意义 ($F = 101.658$, $P < 0.001$)，实验分组与实验时间存在交互作用 ($F = 2.736$, $P < 0.05$)。

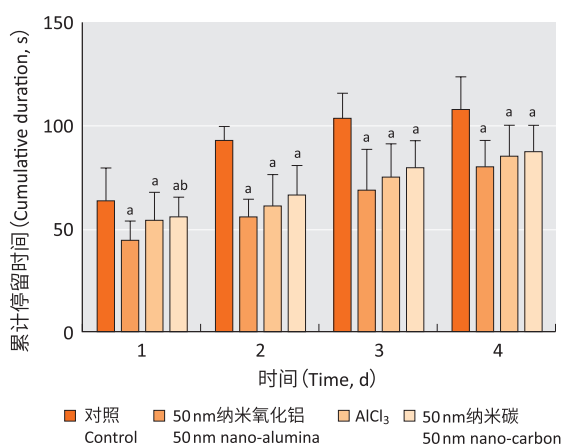


[注] a：与对照组相比， $P < 0.05$ ；b：与 50 nm 纳米氧化铝组相比， $P < 0.05$ 。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

[Note] a: Compared with the control group, $P < 0.05$; b: Compared with the 50 nm nano-alumina group, $P < 0.05$. All data are expressed as $\bar{x} \pm s$.

图 5 暴露于不同粒径纳米氧化铝悬液斑马鱼的累计停留时间
Figure 5 Cumulative duration of zebrafish exposed to nano-alumina suspension at selected particle sizes

2.4.2 粒径与溶出铝离子的分别作用比较 50 nm 纳米氧化铝粒径及溶出铝离子的分别作用比较如图 6 所示。



[注] a：与对照组相比， $P < 0.05$ ；b：与 50 nm 纳米氧化铝组相比， $P < 0.05$ 。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

[Note] a: Compared with the control group, $P < 0.05$; b: Compared with the 50 nm nano-alumina group, $P < 0.05$. All data are expressed as $\bar{x} \pm s$.

图 6 暴露于纳米颗粒悬液和 AlCl_3 溶液斑马鱼的累计停留时间
Figure 6 Cumulative duration of zebrafish exposed to nanoparticle suspension and AlCl_3 solution

组间两两比较发现，纳米氧化铝 50 nm 组、 AlCl_3 组、纳米碳 50 nm 组与对照组相比在第 1 天、第 2 天、第 3 天、第 4 天在 EC 区的累计停留时间减少 ($P < 0.05$)；50 nm 纳米氧化铝组与 50 nm 纳米碳组相比，第 1 天在 EC 区的累计停留时间减少 ($P < 0.05$)。但是，50 nm 纳米氧化铝组与 AlCl_3 组间没有发现统计学差异 ($P > 0.05$)。不同实验天数累计停留时间的差异也具有统计学意义 ($F = 218.826$, $P < 0.001$)，实验分组与实验时间存在交互作用 ($F = 4.453$, $P < 0.05$)。

3 讨论

随着纳米材料的应用范围越来越广泛，其对环境和人类健康的影响也备受关注。目前纳米材料的毒作用机制尚未完全明确，其可能的机理包括粒径的效应、金属离子的释放、氧化应激反应的产生和纳米材料的遮光效应等。纳米材料的毒作用很有可能是一种或多种效应共同作用的结果^[27]。经研究发现，纳米颗粒粒径越小，毒性越大^[28-29]。研究还发现一旦条件合适，大多数纳米金属颗粒将会有部分溶解并转移至离子状态^[30]。纳米氧化铝溶出的铝离子，对纳米氧化铝颗粒毒性的贡献在很大程度上仍未被探索。我们在研究纳米氧化铝细胞毒性中溶酶体作用的实验中发现，纳米氧化铝由于其特殊的性质，可能既具有纳米颗粒粒径的毒性，又具有溶出金属离子的毒性^[19]。为了验证这一假说，我们选用斑马鱼为研究模型，来探讨纳米氧化铝粒径及其溶铝离子的毒性作用。

在本次 T 迷宫实验，比较纳米氧化铝粒径效应的研究中我们得出以下结果：纳米氧化铝 13 nm 和 50 nm 组的第一次潜伏期相比，差异尚未呈现。纳米氧化铝 13 nm 和 50 nm 组在 EC 区的累计停留时间相比，第 1 天、第 2 天 13 nm 组的累计停留时间均小于 50 nm 组。有研究报道，不同粒径纳米氧化锌对结肠癌细胞的毒作用是粒径越小，毒性越大^[31]。在纳米氧化铝对线粒体氧化损伤的实验中发现，纳米氧化铝颗粒比微米氧化铝颗粒的毒性更强^[32]。在本课题组前期研究不同粒径纳米氧化铝对体外培养神经细胞凋亡的影响实验中发现，纳米氧化铝颗粒粒径越小，毒性越大。与本次研究结果得出的结论基本一致。

研究发现，1 mg/L 的纳米金属溶液中大约能溶解出 1 μg 的金属离子^[33]，因此溶解出的金属离子在纳米金属材料的毒作用中也发挥着重要的作用。在研究氧

化铝纳米颗粒对淡水藻类分离物的细胞毒性实验中发现, 纳米氧化铝溶出的铝离子在细胞毒性实验中发挥着重要的作用^[34]。我们在研究 50 nm 纳米氧化铝的粒径和溶出铝离子的分别效应实验中得出以下结果: 在第一次潜伏期比较中, 50 nm 纳米氧化铝组在实验的第 3 天、第 4 天与 50 nm 的纳米碳组相比第一次潜伏期延长; 但是, 50 nm 纳米氧化铝组与 AlCl_3 组间没有发现差异。在 EC 区的累计停留时间比较实验中, 50 nm 纳米氧化铝组与 50 nm 纳米碳组相比, 第 1 天在 EC 区的累计停留时间减少; 但是, 50 nm 纳米氧化铝组与 AlCl_3 组间相比没有发现差异。提示 50 nm 纳米氧化铝对斑马鱼学习记忆的影响主要来自铝离子的毒性作用。可见, 50 nm 纳米氧化铝较 50 nm 的纳米碳对学习记忆有更明显影响的原因可能是 50 nm 的纳米氧化铝除了具有 50 nm 的纳米粒径 (50 nm 的纳米碳同样具有) 的作用外, 还有铝离子的毒性作用。而 50 nm 的纳米氧化铝与 AlCl_3 组间对学习记忆的影响没有发现差异, 也同时说明了在 50 nm 纳米氧化铝对斑马鱼学习记忆水平的影响中铝离子发挥着重要的作用。

本次研究的亮点是利用斑马鱼整体实验来探讨纳米氧化铝粒径及其溶出铝离子的毒性作用, 不足之处是研究的指标还相对局限。如果能够进一步从氧化应激、炎症因子、与学习记忆有关的基因、蛋白表达等多方面进行研究, 将可以更加深入地探讨其发生发展机制。

综上, 通过本次实验可以得出以下的科学结论: 纳米氧化铝可以造成成年斑马鱼的学习记忆障碍, 且有粒径越小, 毒性越大的趋势; 在 50 nm 纳米氧化铝对斑马鱼学习记忆水平的影响中铝离子发挥着重要的作用。

参考文献

- [1] HUANG Y, MEI L, CHEN X, et al. Recent developments in food packaging based on nanomaterials [J]. *Nanomaterials* (Basel), 2018, 8 (10): 830.
- [2] SHARAN J, SINGH S, LALE S V, et al. Applications of nanomaterials in dental science: a review [J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2017, 17 (4): 2235-2255.
- [3] BARAKO M T, GAMBIN V, TICE J. Integrated nanomaterials for extreme thermal management: a perspective for aerospace applications [J]. *Nanotechnology*, 2018, 29 (15): 154003.
- [4] CHAUDHRY N, DWIVEDI S, CHAUDHRY V, et al. Bio-inspired nanomaterials in agriculture and food: current status, foreseen applications and challenges [J]. *Microb Pathog*, 2018, 123: 196-200.
- [5] ITO Y, RAMDHAN D H, YANAGIBA Y, et al. Exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust may cause liver damage [J]. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 2011, 66 (4): 638-642.
- [6] TANG H, XU M, ZHOU X, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized copper nano-particles in rats after oral administration [J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2018, 93: 649-663.
- [7] SHILO M, SHARON A, BARANES K, et al. The effect of nanoparticle size on the probability to cross the blood-brain barrier: an *in-vitro* endothelial cell model [J]. *J Nanobiotechnology*, 2015, 13: 19.
- [8] CEÑA V, JÁTIVA P. Nanoparticle crossing of blood-brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases [J]. *Nanomedicine (Lond)*, 2018, 13 (13): 1513-1516.
- [9] SHENG L, WANG L, SU M, et al. Mechanism of TiO_2 nanoparticle-induced neurotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31 (2): 163-175.
- [10] DAN M, WEN H, SHAO A, et al. Silver nanoparticle exposure induces neurotoxicity in the rat hippocampus without increasing the blood-brain barrier permeability [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14 (7): 1330-1338.
- [11] 李晓波. 金属氧化物纳米颗粒的神经毒性研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2008.
- [12] CARVALHO P M, FELÍCIO M R, SANTOS N C, et al. Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development [J]. *Front Chem*, 2018, 6: 237.
- [13] ROTINI A, GALLO A, PARLAPIANO I, et al. Insights into the CuO nanoparticle ecotoxicity with suitable marine model species [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 147: 852-860.
- [14] 席晨, 王周华, 付新录, 等. 不同粒径的介孔纳米硅材料皮下给予小鼠的急性毒性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28 (1): 68-73.
- [15] WINGETT D, LOUKA P, ANDERS C B, et al. A role of ZnO nanoparticle electrostatic properties in cancer cell cytotoxicity [J]. *Nanotechnol Sci Appl*, 2016, 9: 29-45.
- [16] HUA J, VIJVER M G, AHMAD F, et al. Toxicity of different-

- sized copper nano- and submicron particles and their shed copper ions to zebrafish embryos [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2014, 33 (8) : 1774-1782.
- [17] 孙跃军, 荀冬雪, 刘民. 纳米氧化铝粉体制备方法与工艺的研究进展 [J]. *中国材料进展*, 2017, 36 (6) : 455-460.
- [18] ZHANG QL, LI M Q, JI J W, et al. *In vivo* toxicity of nano-alumina on mice neurobehavioral profiles and the potential mechanisms [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2011, 24 (1 Suppl) : 23S-29S.
- [19] ZHANG Q, XU L, WANG J, et al. Lysosomes involved in the cellular toxicity of nano-alumina : combined effects of particle size and chemical composition [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2013, 27 (2) : 365-375.
- [20] 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.
- [21] 葛翠翠, 李伟庆, 张勤丽, 等. 不同粒径纳米氧化铝对体外培养神经细胞凋亡的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2012, 29 (2) : 72-76.
- [22] 贾利娜, 王志武, 郭卫伟, 等. 纳米氧化铝急性染毒对小鼠学习记忆能力的影响 [J]. *职业与健康*, 2013, 29 (6) : 644-647.
- [23] 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.
- [24] AVDESH A, MARTIN-IVERSON M T, MONDAL A, et al. Evaluation of color preference in zebrafish for learning and memory [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 28 (2) : 459-469.
- [25] 陈建平. 程序性坏死在铝致斑马鱼阿尔茨海默病模型中的作用研究 [D]. 太原 : 山西医科大学, 2017.
- [26] VEMULA PRANAY KUMAR B V. Design and development of a novel color bias avoided and appetite conditioning t-maze model for evaluating the memory enhancing drugs in zebrafish [J]. *Int Res J Pharm*, 2014, 5 (5) : 434-437.
- [27] 范功端, 陈薇, 郑小梅, 等. 纳米材料对藻细胞毒性效应及致毒机理 [J]. *生态毒理学报*, 2018, 13 (2) : 23-33.
- [28] PAKRASHI S, DALAI S, T C P, et al. Cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles towards fresh water algal isolate at low exposure concentrations [J]. *Aquat Toxicol*, 2013, 132-133 : 34-45.
- [29] 熊雾, 梁春来, 于洲, 等. 3种纳米氧化锌对不同分化状态 Caco-2 细胞的毒性作用研究 [J]. *毒理学杂志*, 2018, 32 (2) : 87-92.
- [30] 李婷竹. 不同特性纳米银制备及遗传毒性定量研究 [D]. 南京 : 东南大学, 2017.
- [31] 熊雾, 梁春来, 于洲, 等. 3种纳米氧化锌对不同分化状态 Caco-2 细胞的毒性作用研究 [J]. *毒理学杂志*, 2018, 32 (2) : 87-92.
- [32] 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.
- [33] WOLFRAM V, JOCHEN S, FRANK R. Dissolution kinetics of oxidic nanoparticles : The observation of an unusual behaviour [J]. *Colloid Surface Physicochem Eng Aspec*, 2008, 324 (1/2/3) : 51-57.
- [34] PAKRASHI S, DALAI S, T C P, et al. Cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles towards fresh water algal isolate at low exposure concentrations [J]. *Aquat Toxicol*, 2013 (132/133) : 34-45.

(英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 王晓宇 ; 校对 : 丁瑾瑜)