

# 锐钛型纳米二氧化钛对河蚬氧化应激的影响

王路平, 胡 涛, 张桂蓉, 马徐发, 魏开建

(华中农业大学水产学院, 淡水水产健康养殖湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**为评价纳米二氧化钛( $\text{TiO}_2$ -NPs)对河蚬(*Corbicula fluminea*)的毒性效应,采用5、50、100 mg/L浓度锐钛型 $\text{TiO}_2$ -NPs对河蚬暴露处理24、48、96、192 h,测定其鳃、消化腺和斧足肌肉组织中钛含量以及谷胱甘肽S转移酶(GST)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性。结果表明:(1)在相同暴露时间下,河蚬3种组织的平均钛含量均显著上升并高于空白对照组( $P < 0.05$ );随暴露时间延长,消化腺和斧足肌肉中平均钛含量总体上呈上升趋势,且消化腺中钛含量高于斧足组织,而中、低浓度组鳃组织平均钛含量处于较稳定水平;暴露24~192 h,鳃、消化腺和斧足肌肉中平均钛含量分别为0.73~3.50、2.88~32.37、1.15~3.11  $\mu\text{g/g}$ ;(2)在暴露初期,河蚬3种组织的GST活性不同程度上升;随暴露时间延长,鳃和消化腺中GST活性先显著下降、后上升,斧足肌肉中GST活性呈现逐步下降趋势;暴露24~192 h,鳃、消化腺和斧足肌肉中GST活性分别为97.39~371.44、164.92~837.22、63.39~247.75 U/mg;(3)暴露24 h后,3个浓度组河蚬鳃和斧足肌肉中SOD活性均明显上升,低浓度组消化腺SOD活性也显著上升;随暴露时间延长,3种组织中SOD活性均呈现逐渐下降趋势,其活性下降幅度与处理浓度呈正相关;暴露24~192 h,鳃、消化腺和斧足肌肉中SOD活性分别为7.68~27.05、3.63~16.92、4.25~43.08 U/mg。研究表明,3种浓度 $\text{TiO}_2$ -NPs暴露导致钛在河蚬体内显著富集并引起氧化应激反应,其对河蚬具有明显的毒性效应。

**关键词:**河蚬;锐钛型;纳米二氧化钛;抗氧化酶;氧化应激

**中图分类号:**Q355 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2015)05-0036-08

近年来,随着纳米材料在纺织、电子、建筑、轻工、医药等领域的应用日益广泛,其不可避免地会在科研、生产、运输、应用及废物处理过程中间接或直接进入水体和土壤中,对环境和生态健康构成潜在风险(Nel et al, 2006; Nowack & Bucheli, 2007; Hao et al, 2009; Zhu et al, 2010)。纳米材料的生物效应及其对环境和生态健康的影响已引起国内外学者的广泛关注(Service, 2003; 王娜等, 2007)。

纳米二氧化钛( $\text{TiO}_2$ -NPs)分为板钛矿型、金红石型和锐钛型3种类型;其中金红石型和锐钛型 $\text{TiO}_2$ -NPs具有生物毒性且不易被生物体排出(Ferin & Oberdorster, 1985)。 $\text{TiO}_2$ -NPs可导致大鼠肺泡巨噬细胞数量明显增加及DNA氧化损伤(Olmedo et al, 2005; Chen et al, 2007);对小鼠的肝、脑等组织也具有细胞毒性,影响其基因稳定并造成组织病变

(Wang et al, 2007; 2008);对人类也具有神经毒性(Long et al, 2006)。在水生动物中, $\text{TiO}_2$ -NPs可随食物链从低等级生物如溞类等向高等级生物如斑马鱼(*Danio rerio*)中迁移(Zhu et al, 2010); $\text{TiO}_2$ -NPs短期暴露可影响紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)血细胞免疫,对鳃、消化腺细胞溶酶体膜稳定性造成损伤并影响组织的抗氧化酶活性(Canesi et al, 2009; 2010);此外, $\text{TiO}_2$ -NPs对尖膀胱螺(*Physa acuta*)、铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)的生活与生存繁殖也有影响(Musee et al, 2010; 刘佳, 2012);但国内关于纳米粒子对软体动物生态毒性的报道较少。

河蚬(*Corbicula fluminea*)广泛分布于亚洲、非洲及欧美等地,是一种栖息于湖泊、河流、人工运河等水体中的淡水软体动物,主要以浮游生物为食(Spann et al, 2011);其肉鲜味美,具有较高的经济价值(刘敏和熊邦喜, 2008);同时也是一种重要的环境污染指示生物(Cid et al, 2015)。已有研究报道了纳米三氧化二铝粒子在河蚬中的富集(Stanley et al, 2010)以及金刚石纳米粒子暴露下河蚬的氧化应激和组织学变化(Cid et al, 2015),但未见 $\text{TiO}_2$ -NPs对河蚬毒性效应的报道。本实验测定了锐钛型 $\text{TiO}_2$ -NPs暴露下河蚬鳃、消化腺、斧足肌肉组

收稿日期:2015-03-31

基金项目:水体污染控制与治理科技重大专项(2014ZX07203010-4; 2012ZX07202-004-02)。

作者简介:王路平,1989年生,男,硕士研究生,主要从事渔业生态与增养殖研究。E-mail: 810079844@qq.com

通信作者:魏开建,1969年生,男,副教授。E-mail: kjwei@mail.hzau.edu.cn

织中钛含量以及谷胱甘肽S转移酶(GST)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化,旨在评价不同浓度TiO<sub>2</sub>-NPs暴露对河蚬的亚急性毒性效应,为水生动物生态毒理学研究积累资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料采集

河蚬成体样本于2014年7月采自湖北省红安县高桥河,平均壳长( $33.05 \pm 4.23$ ) mm,平均体重( $14.48 \pm 2.31$ ) g。样本运回实验室后,在10个水体体积为20 L的PVC水族箱中暂养1周。采用充分曝气的无余氯自来水暂养,期间每天换水80%,水温为26~27℃,pH值7.8~7.9,保持自然光周期。

### 1.2 暴露处理

采用粒径为25 nm锐钛型纳米二氧化钛(TiO<sub>2</sub>-NPs,纯度>99.8%,上海阿拉丁试剂有限公司)对河蚬进行暴露处理实验。将TiO<sub>2</sub>-NPs配制成0.1、1.0、2.0 g/L的母液,超声波震荡(40 kHz BX2200 LH超声波清洗仪,上海新苗医疗器械制造公司)处理10 min以分散TiO<sub>2</sub>-NPs,用曝气自来水分别稀释为5、50、100 mg/L共计3个浓度的TiO<sub>2</sub>-NPs溶液用于河蚬暴露处理,以曝气自来水处理作为空白对照。暴露实验在容积为50 L的水族箱中进行,每个水族箱处理溶液体积为20 L,每个TiO<sub>2</sub>-NPs处理浓度组和空白对照组各设3个重复。每箱随机放入健康且大小均匀的河蚬20只。实验期间水温26~27℃,pH值7.8~7.9,保持自然光周期,每隔24 h更换80%的暴露处理溶液,不投食。

### 1.3 指标测定

1.3.1 组织样品采集 在暴露实验进行到24、48、96、192 h时分别取样。每次取样时,从每个水族箱中随机取3只河蚬,在冰上迅速解剖,分别取消化腺及适量的鳃和斧足肌肉组织,将3个样本的每种组织分别混合作为该实验单元的1个样品。3种组织分别称取300 mg, -80℃保存,用于钛含量的测定;剩余的组织样品称量后分别置液氮中快速冷冻,再转入-80℃保存,用于酶活力的测定。

1.3.2 钛含量测定 每个试验单元的鳃、消化腺、斧足组织样品各取300 mg,150℃烘干至恒重后冷却,分别加入6 mL浓HNO<sub>3</sub>,150℃下将组织完全消化,然后用去离子水重悬浮消化产物至6 mL用于检测。在电感耦合等离子发射光谱仪(Optima 8000DV

型,美国Perkin Elmer公司)上测定上述组织样品中的钛含量。

1.3.3 酶活性测定 测定河蚬3种组织中谷胱甘肽S转移酶(GST)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性(U/mg),以评价TiO<sub>2</sub>-NPs对河蚬的毒性效应。每个实验单元的每种组织样品取0.05~0.15 g,按照样品重量(g)/生理盐水(mL)=1/9加入0.65%生理盐水,低温条件下在组织匀浆器(Tissue Lyser II型,德国QIAGEN公司)中1 800 r/min匀浆3 min;匀浆液在4℃下2 500 r/min离心10 min,取上清液。采用蛋白质测定试剂盒、GST测定试剂盒、SOD测定试剂盒(南京建成生物公司),按照操作步骤处理上清液。利用酶标仪(Infinite M2000 PRO Nano Quant,奥地利Tecan公司)在595、412、550 nm波长下分别测定处理后上清液中蛋白质、GST、SOD的OD值,并根据试剂盒上相关公式计算获得3种组织每毫克蛋白质中GST、SOD酶的活性(U/mg)。

### 1.4 数据分析

运用STATISTICA 8.0软件(美国Stat Soft公司)对3个TiO<sub>2</sub>-NPs浓度组和暴露时间对不同指标的影响进行两因素方差分析(Two-way ANOVA),采用单因素方差分析(One-way ANOVA)比较同一暴露时间下各浓度组与空白对照组的差异以及空白对照组随暴露时间的变化。各测定指标以(平均值±标准差)表示,处理间平均数的比较采用Duncan检验, $P<0.05$ 表示差异显著。

## 2 结果与分析

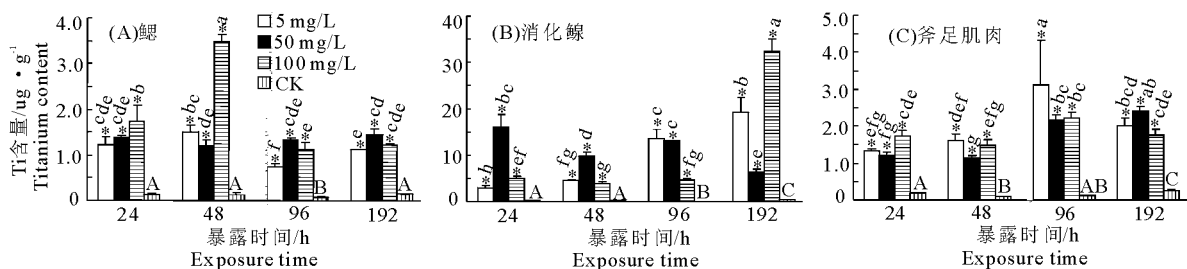
### 2.1 不同组织中的钛含量变化

2.1.1 鳃 空白对照组河蚬鳃组织中平均钛含量为0.08~0.14 μg/g。在相同暴露时间下,鳃组织中平均钛含量均显著高于空白对照组( $P<0.05$ )(图1-A)。暴露24~192 h,5、50、100 mg/L浓度组鳃组织平均钛含量分别为0.73~1.49、1.20~1.46、1.13~3.50 μg/g,浓度组间平均值差异显著( $P<0.05$ ),并随处理浓度增大而上升。4个暴露时间下鳃组织平均钛含量之间存在显著差异( $P<0.05$ ),总体上48 h最高,96 h最小。

随着暴露时间延长,100 mg/L浓度组鳃组织平均钛含量表现出先显著增加再显著下降的变化趋势,而5 mg/L和50 mg/L浓度组鳃组织平均钛含量处于较稳定水平。暴露浓度与暴露时间之间存在显著交互作用( $P<0.05$ )。暴露24 h和48 h,100 mg/L浓度组鳃组织平均钛含量分别为

1.743  $\mu\text{g/g}$ 和3.496  $\mu\text{g/g}$ ,显著高于其他浓度组;暴露96 h和192 h,50 mg/L浓度组鳃中平均钛含量分

别为1.316  $\mu\text{g/g}$ 和1.461  $\mu\text{g/g}$ ,显著高于5 mg/L浓度组。



钛含量为(平均值 $\pm$ 标准差)。CK为空白对照。柱形图上方的不同斜体小写字母表示浓度组之间存在显著性差异,不同的大写字母表示空白对照组之间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。\*表示在某暴露时间下浓度组与对照组之间存在显著性差异( $P < 0.05$ )。

图1 不同浓度  $\text{TiO}_2$ -NPs 暴露后河蚬3种组织中钛含量的变化

CK is the control group. Different lower case letters indicate significant differences among concentration groups and different capital letters indicate significant differences among control groups ( $P < 0.05$ ). "\*" indicates a significant difference between treatment groups and control group at a given exposure time ( $P < 0.05$ ).

Fig. 1 Titanium content in the three tissues of *Corbicula fluminea* exposed to different concentrations of  $\text{TiO}_2$ -NPs and different exposure time

2.1.2 消化腺 空白对照组中,消化腺组织平均钛含量为0.10~0.35  $\mu\text{g/g}$ 。在相同暴露时间下,3个浓度组消化腺组织平均钛含量均显著高于空白对照组( $P < 0.05$ ) (图1-B)。暴露24~192 h,5、50、100 mg/L浓度组消化腺组织平均钛含量分别为2.88~19.14、6.22~15.98、3.88~32.37  $\mu\text{g/g}$ ,其中50 mg/L浓度组消化腺组织平均钛含量显著高于其他浓度组( $P < 0.05$ )。

随暴露时间延长,消化腺组织平均钛含量在96~192 h显著增加( $P < 0.05$ ),并在192 h达到最大值。暴露浓度与暴露时间存在显著交互作用( $P < 0.05$ )。暴露24 h和48 h,50 mg/L浓度组消化腺组织平均钛含量分别为15.98  $\mu\text{g/g}$ 和9.70  $\mu\text{g/g}$ ,显著高于其他浓度组;暴露96 h,5 mg/L和50 mg/L浓度组消化腺组织平均钛含量分别为13.67  $\mu\text{g/g}$ 和13.05  $\mu\text{g/g}$ ,显著高于100 mg/L浓度组;暴露192 h,100 mg/L浓度组消化腺组织平均钛含量达到最高值(32.37  $\mu\text{g/g}$ ),5 mg/L浓度组次之(19.14  $\mu\text{g/g}$ )。

2.1.3 斧足 空白对照组中,斧足肌肉组织平均钛含量为0.09~0.24  $\mu\text{g/g}$ 。在相同暴露时间下,3个浓度组斧足组织平均钛含量均显著高于空白对照组( $P < 0.05$ ) (图1-C)。暴露24~192 h,5、50、100 mg/L浓度组斧足组织平均钛含量分别为1.32~3.11、1.15~2.41、1.47~2.23  $\mu\text{g/g}$ ,浓度组间平均值差异不显著( $P > 0.05$ )。

随暴露时间延长,斧足组织平均钛含量在96 h显著上升达到最大值( $P < 0.05$ ),在192 h又显著下

降。暴露浓度与暴露时间存在显著交互作用( $P < 0.05$ )。暴露24 h,100 mg/L浓度组斧足组织平均钛含量(1.73  $\mu\text{g/g}$ )显著高于50 mg/L浓度组;暴露48 h和96 h,5 mg/L浓度组斧足组织平均钛含量分别为1.62  $\mu\text{g/g}$ 和3.11  $\mu\text{g/g}$ ,高于另外2个高浓度组;暴露时间延长至192 h,50 mg/L浓度组斧足组织平均钛含量(2.41  $\mu\text{g/g}$ )显著高于100 mg/L浓度组。

## 2.2 不同组织中的 GST 活性变化

2.2.1 鳃 空白对照组鳃组织中 GST 平均活性呈现先显著下降再回升的趋势,其变化范围为122.64~295.73 U/mg。暴露24~96 h,3个浓度组鳃组织中 GST 平均活性与空白对照组无显著差异( $P > 0.05$ );192 h时,5 mg/L和50 mg/L浓度组 GST 平均活性显著低于对照组( $P < 0.05$ ) (图2-A)。暴露24~192 h,5、50、100 mg/L浓度组鳃组织 GST 平均活性分别为99.60~206.36、128.35~371.44、97.39~328.83 U/mg,其中50 mg/L浓度组 GST 平均活性最高,100 mg/L浓度组次之,且均显著高于5 mg/L浓度组( $P < 0.05$ )。

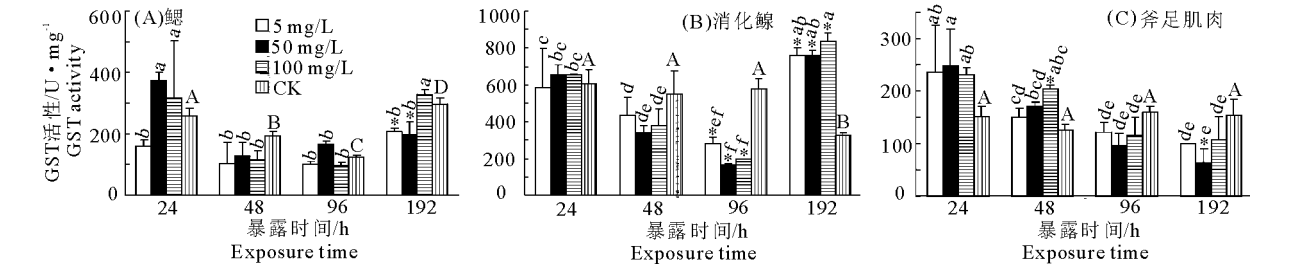
随暴露时间延长,鳃组织 GST 平均活性呈现先显著下降再回升的趋势,24 h时 GST 平均活性最大,192 h次之,但均显著高于48 h和96 h时 GST 平均活性( $P < 0.05$ )。暴露浓度与暴露时间存在显著交互作用( $P < 0.05$ )。暴露24 h,50 mg/L和100 mg/L浓度组 GST 平均活性(371.44 U/mg和317.05 U/mg)显著高于5 mg/L浓度组( $P < 0.05$ )。暴露192 h,5 mg/L和50 mg/L浓度组 GST 平均活性

显著低于 100 mg/L 浓度组 ( $P < 0.05$ )。

2.2.2 消化腺 空白对照组消化腺组织中 GST 平均活性在 192 h 时显著下降,其变化范围为 326.09 ~ 606.81 U/mg。暴露 24 h 和 48 h,3 个浓度组消化腺组织 GST 平均活性与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ ),其中 48 h 时 GST 平均活性均低于对照组。暴露 96 h,3 个浓度组 GST 活性显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。暴露 192 h,3 个浓度组 GST 平均活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 2-B)。暴露 24 ~ 192 h,5、50、100 mg/L 浓度组消化腺组织 GST 平均

活性分别为 281.98 ~ 759.39、164.92 ~ 757.50、197.72 ~ 837.22 U/mg,浓度组间平均值差异不著 ( $P > 0.05$ ),其中 100 mg/L 浓度组 GST 平均活性最高,50 mg/L 浓度组最低。

随着暴露时间延长,消化腺组织 GST 平均活性呈现先显著下降再显著回升的趋势,192 h 时 GST 平均活性最大,24 h 次之,48 h 最小 ( $P < 0.05$ )。暴露浓度与暴露时间存在显著交互作用 ( $P < 0.05$ )。暴露 192 h,3 个浓度组 GST 平均活性均最大,96 h 时均处于最低水平。



GST 活性为(平均值 ± 标准差)。CK 为空白对照。柱形图上方的不同斜体小写字母表示浓度组之间存在显著性差异,不同的大写字母表示空白对照组之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。\* 表示在某暴露时间下浓度组与对照组之间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

图 2 不同浓度 TiO<sub>2</sub>-NPs 暴露后河蚬 3 种组织中谷胱甘肽 S 转移酶活性

CK is the control group. Different lower case letters indicate significant differences among concentration groups and different capital letters indicate significant differences among control groups ( $P < 0.05$ ). “\*” indicates a significant difference between treatment groups and control group at a given exposure time ( $P < 0.05$ ).

Fig.2 Glutathione S-transferase (GST) activities in the three tissues of *Corbicula fluminea* exposed to different concentrations of TiO<sub>2</sub>-NPs and different exposure time

2.2.3 斧足 空白对照组斧足肌肉组织中 GST 平均活性为 124.38 ~ 160.37 U/mg,不同暴露时间之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。暴露 24 h 和 48 h,3 个浓度组斧足肌肉组织 GST 平均活性略高于对照组,仅暴露 48 h 时 100 mg/L 浓度组 GST 平均活性显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。暴露 96 h 和 192 h 时,3 个浓度组 GST 平均活性低于对照组,仅 192 h 时 50 mg/L 浓度组 GST 平均活性显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ) (图 2-C)。暴露 24 ~ 192 h,5、50、100 mg/L 浓度组斧足肌肉组织 GST 平均活性分别为 99.72 ~ 236.23、63.39 ~ 247.75、107.90 ~ 231.45 U/mg,浓度组间平均值差异不著 ( $P > 0.05$ ),其中 100 mg/L 浓度组 GST 平均活性最高,50 mg/L 浓度组最低。

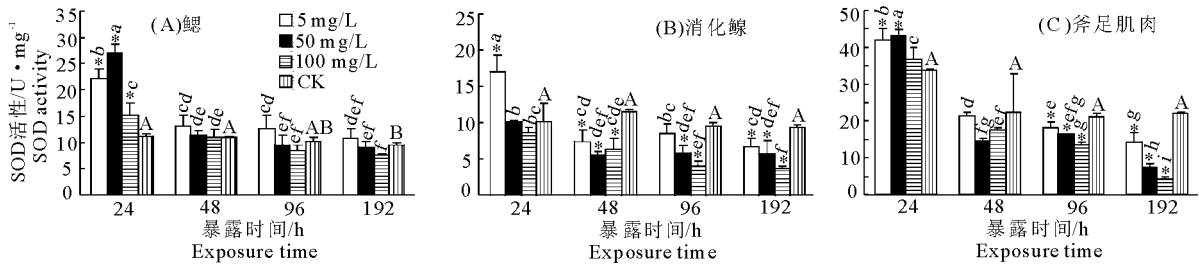
随着暴露时间延长,斧足肌肉组织 GST 平均活性呈现逐渐下降的趋势(其中 48 h 和 96 h 时显著降低,  $P < 0.05$ ),24 h 时 GST 平均活性最大,48 h 次之,192 h 最小。

2.3 不同组织中的 SOD 活性变化

2.3.1 鳃 空白对照组鳃组织中 SOD 平均活性为

9.58 ~ 11.18 U/mg,在 192 h 时显著下降 ( $P < 0.05$ )。暴露 24 h,3 个浓度组鳃组织中 SOD 平均活性均显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。暴露 48 ~ 192 h,3 个浓度组 SOD 平均活性均与对照组无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 3-A)。暴露 24 ~ 192 h,5、50、100 mg/L 浓度组鳃组织 SOD 平均活性分别为 10.72 ~ 22.12、9.05 ~ 27.05、7.68 ~ 15.26 U/mg,其中 5 mg/L 浓度组 SOD 平均活性最高,50 mg/L 浓度组次之,但均显著高于 100 mg/L 浓度组 ( $P < 0.05$ )。

随暴露时间延长,鳃组织 SOD 平均活性呈现逐渐下降的趋势(其中 48 h 时显著降低,  $P < 0.05$ ),暴露 24 h 时 SOD 平均活性最大,48 h 次之,192 h 最小。暴露浓度与暴露时间存在显著交互作用 ( $P < 0.05$ )。暴露 24 h,3 个浓度组 SOD 平均活性处于较高水平,其中 50 mg/L 浓度组 SOD 平均活性最高(27.05 U/mg)。暴露 96 h 和 192 h,50 mg/L 和 100 mg/L 浓度组 SOD 平均活性降至低于对照组水平 ( $P > 0.05$ )。



SOD 活性为(平均值±标准差)。CK 为空白对照。柱形图上方的不同斜体小写字母表示浓度组之间存在显著性差异,不同的大写字母表示空白对照组之间存在显著性差异( $P<0.05$ )。\* 表示在某暴露时间下浓度组与对照组之间存在显著性差异( $P<0.05$ )。

图 3 不同浓度  $\text{TiO}_2\text{-NPs}$  暴露后河蚬 3 种组织中超氧化物歧化酶活性

CK is the control group. Different italic small letters above the bars indicate significant differences among different concentration groups and different capital letters indicate significant differences among the control groups ( $P<0.05$ ). “\*” indicates a significant difference between the different concentration groups and the control group at the given exposure time ( $P<0.05$ ).

Fig.3 Superoxide dismutase (SOD) activities in the three tissues of *Corbicula fluminea* exposed to different concentrations and different exposure time

2.3.2 消化腺 空白对照组消化腺组织中 SOD 平均活性为 9.32 ~ 11.50 U/mg。暴露 24 h, 5 mg/L 浓度组消化腺组织中 SOD 平均活性(16.92 U/mg)显著高于空白对照组(10.23 U/mg) ( $P<0.05$ ) (图 3-B)。暴露 48 h, 3 个浓度组 SOD 平均活性均显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。暴露 96 h, 50 mg/L 和 100 mg/L 浓度组 SOD 平均活性显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。暴露 192 h, 3 个浓度组 SOD 平均活性均显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。暴露 24 ~ 192 h, 5、50、100 mg/L 浓度组消化腺组织 SOD 平均活性分别为 6.73 ~ 16.92、5.58 ~ 10.14、3.63 ~ 8.67 U/mg, 浓度组间平均值差异显著 ( $P<0.05$ ) 并随浓度增加而依次降低。

随暴露时间延长,消化腺组织 SOD 平均活性呈现逐渐下降的趋势(其中 48 h 时显著降低,  $P<0.05$ ), 暴露 24 h 时 SOD 平均活性均最大, 48 h 次之, 192 h 最小。暴露浓度与暴露时间存在显著交互作用 ( $P<0.05$ )。暴露 24 h, 3 个浓度组 SOD 平均活性处于较高水平, 其中 5 mg/L 浓度组 SOD 平均活性最高并显著大于另 2 个高浓度组 ( $P<0.05$ )。暴露 192 h, 100 mg/L 浓度组 SOD 平均活性降至最低水平。

2.3.3 斧足 空白对照组斧足肌肉组织中 SOD 平均活性为 21.01 ~ 33.66 U/mg。暴露 24 h, 5 mg/L 和 50 mg/L 浓度组 SOD 平均活性(41.94 ~ 43.08 U/mg) 显著高于对照组(33.66 U/mg) ( $P<0.05$ ) (图 3-C)。暴露 48 h, 3 个浓度组 SOD 平均活性略低于对照组 ( $P>0.05$ )。暴露 96 h 和 192 h, 3 个浓度组 SOD 平均活性均显著低于对照组 ( $P<0.05$ )。暴露 24 ~ 192 h, 5、50、100 mg/L 浓度

组斧足组织 SOD 平均活性分别为 14.23 ~ 41.94、7.49 ~ 43.08、4.25 ~ 36.84 U/mg, 浓度组间平均值差异显著 ( $P<0.05$ ) 并随浓度增加而依次降低。

随暴露时间延长,斧足组织 SOD 平均活性依次呈现显著下降趋势, 其中 24 h 时 SOD 平均活性最大, 48 h 次之, 192 h 最小 ( $P<0.05$ )。暴露浓度与暴露时间存在显著交互作用 ( $P<0.05$ )。暴露 24 h, 3 个浓度组 SOD 平均活性处于较高水平, 其中 50 mg/L 浓度组 SOD 平均活性最高, 大于低、高浓度组 ( $P<0.05$ )。暴露 192 h, 3 个浓度组 SOD 平均活性降至最低水平, 其中 100 mg/L 浓度组 SOD 平均活性最低。

3 讨论

3.1 河蚬 3 种组织中钛含量差异与变化趋势

据报道, 栖息于法国 La Rochella 海湾的杂色扇贝 (*Chlamys varia*) 鳃、消化腺、斧足肌肉组织中钛含量(25.8、64.5、4.84  $\mu\text{g/g}$ ) 分别高于相距 15 km 的 Ré 岛 Saint Martin 海湾栖息个体 3 种组织中钛含量(18.6、42.6、1.73  $\mu\text{g/g}$ ), 其中消化腺中钛含量最高 (Bustamante et al, 2005), 均明显高于本实验中野生河蚬 3 种组织中的钛含量。本实验中河蚬 3 种组织中的钛含量处于较低水平, 但以消化腺中的钛含量最高, 与野生虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的鳃、肝脏、肌肉等组织中钛含量(0.04 ~ 0.34  $\mu\text{g/g}$ ) 相当 (Ramsden et al, 2009)。实验观测到空白对照组中河蚬组织中钛含量存在不同程度的差异, 这可能与其采集位置、个体大小以及不同个体内钛含量的差异有关。

纳米物质可进入真核生物的细胞甚至细胞器并

在其中富集(Zhuang & Gao, 2014)。河蚬在纳米 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 浓度为25 mg/g底泥中养殖28 d后,其肠道组织中钛含量达到117  $\mu\text{g/g}$ (Stanley et al, 2010);同时,纳米物质进入动物体后,可通过代谢循环等途径在体内组织间转移,如虹鳟摄食含 $\text{TiO}_2$ -NPs的饲料后,可由肠粘膜吸收进入鱼体,进而转移到肝脏中,导致肝脏中钛含量升高(Ramsden et al, 2009)。本实验中, $\text{TiO}_2$ -NPs暴露后河蚬3种组织中钛含量均显著高于对照组,说明水环境中较高浓度 $\text{TiO}_2$ -NPs可以通过呼吸活动被其鳃、斧足等组织吸收和富集;随着暴露时间延长,河蚬鳃组织中钛含量总体呈现先升高、后下降的变化趋势,在高浓度组这一趋势更加明显,低浓度和中浓度组鳃组织中钛含量处于较稳定的水平,暴露后期鳃组织中钛含量下降可能与 $\text{TiO}_2$ -NPs刺激下河蚬的行为如呼吸活动频率变化有关(Buffer et al, 2011);同时,鳃组织中的钛可通过血液循环转移到其它组织(Li et al, 2009)或通过呼吸活动直接排出体外。随着暴露时间增加,消化腺和斧足肌肉组织中钛含量总体呈上升趋势,说明其它组织如鳃吸收的钛可能转移到这2种组织中。消化腺是河蚬的消化和解毒器官,因此较多的钛被输送到消化腺组织并在其中富集(Li et al, 2009; Ramsden et al, 2009)。

### 3.2 $\text{TiO}_2$ -NPs对河蚬GST和SOD活性的影响

$\text{TiO}_2$ -NPs进入生物体后能产生活性氧自由基,进而对机体造成氧化应激并影响抗氧化酶的活性(Federici et al, 2007; Kahru et al, 2008)。生物体内的氧化应激具有一定的浓度效应,机体在高浓度 $\text{TiO}_2$ -NPs暴露条件下比低浓度时产生更多的活性氧自由基(Jaeger et al, 2012)。在鲤(*Cyprinus carpio*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)、浅沟蛤(*Scrobicularia plana*)等水生动物中,为了缓解 $\text{TiO}_2$ -NPs等纳米物质暴露下活性氧自由基对机体的损伤,体内组织中GST等酶的活性显著增加(Hao et al, 2009; Canesi et al, 2010; Buffet et al, 2011)或产生其它抗氧化平衡(Federici et al, 2007)。在本实验 $\text{TiO}_2$ -NPs暴露初期,河蚬3种组织GST酶活性呈现不同程度的上升;随着暴露时间延长,鳃组织GST活性先下降、后上升,192 h时100 mg/L浓度组的GST活性恢复到对照组水平,表明鳃组织因其钛含量较稳定而产生了新的抗氧化平衡(Federici et al, 2007);消化腺GST活性表现出与鳃组织相似的变化趋势,但在192 h后3个浓度组消化腺的GST活性显著上升,这可能与消化腺中钛

含量显著升高、产生的活性氧自由基较多有关(Hao et al, 2009)。斧足肌肉组织GST活性呈逐步下降趋势,暴露96~192 h时,3个浓度组的GST活性低于对照组,尚未达到新的抗氧化平衡。

纳米粒子进入水生生物体内后,也会影响组织中SOD酶活性,且具有一定的时间和浓度效应。如青鳉(*Oryzias latipes*)胚胎中SOD活性在最初4 d内随纳米铁暴露时间延长而降低,且高浓度暴露组的SOD活性下降幅度大于低浓度组,但4 d后SOD活性有回升趋势(Li et al, 2009); $\text{CuO}$ -NPs对浅沟蛤暴露处理16 d后,组织中SOD酶活性显著增加(Buffer et al, 2011)。在本实验暴露最初24 h时,河蚬鳃、斧足肌肉组织中SOD活性均有不同幅度上升;随着暴露时间延长,3种组织中SOD活性均呈逐渐下降趋势,且SOD活性下降幅度与 $\text{TiO}_2$ -NPs处理浓度呈正相关,说明 $\text{TiO}_2$ -NPs对河蚬软体组织造成氧化损伤而引起SOD活性下降。在暴露后期,河蚬鳃组织SOD活性的下降趋缓,提示其SOD酶活性接近一种新的平衡(Li et al, 2009);而消化腺和斧足肌肉组织中SOD活性在暴露后期下降幅度较大,可能与2种组织中累积的 $\text{TiO}_2$ -NPs较多、受到的氧化损伤较大有关,反映了钛离子对机体的致毒效应(Kahru et al, 2008);此外,在对照组中观测到河蚬组织GST和SOD活性随实验时间延长而有所变化,与金刚石纳米粒子对河蚬暴露实验结果相似(Cid et al, 2015),这种显著性变化可能与个体大小、个体内钛含量的差异等有关。

综上所述,本实验中3种浓度 $\text{TiO}_2$ -NPs暴露导致钛在河蚬体内显著富集并引起氧化应激反应,具有明显的毒性效应。

### 参考文献

- 刘佳. 2012. 纳米氧化铜对底栖动物铜锈环棱螺的生态毒理学效应[D]. 吉首: 吉首大学.
- 刘敏, 熊邦喜. 2008. 河蚬的生态习性及其对重金属的富集作用[J]. 安徽农业科技, 36(1): 221-224.
- 王娜, 程炯佳, 金焰, 等. 2007. 人工纳米材料的生物效应及其对生态环境的影响[J]. 生态毒理学报, 2(2): 252-264.
- Buffer P E, Tankoua O F, Pan J F, et al. 2011. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles[J]. Chemosphere, 84(1): 166-174.
- Bustamante P, Miramand P. 2005. Subcellular and body distributions of 17 trace elements in the variegated scallop *Chla-*

- mys varia* from the French coast of the Bay of Biscay[J]. Science of the Total Environment, 337(1-3): 59-73.
- Canesi L, Ciacci C, Vallotto D, et al. 2009. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>) on *Mytilus* hemocytes[J]. Aquatic Toxicology, 96(2): 151-158.
- Canesi L, Fabbri R, Gallo G, et al. 2010. Biomarkers in *Mytilus galloprovincialis* exposed to suspensions of selected nanoparticles (Nano carbon black, C60 fullerene, Nano-TiO<sub>2</sub>, Nano-SiO<sub>2</sub>) [J]. Aquatic Toxicology, 100(2): 168-177.
- Chen G F, Zhao J, Liu X J, et al. 2007. Electrochemical sensing DNA damage with nano-titanium dioxide and repair with a medicinal herb species resveratrol[J]. Journal of Biotechnology, 127(4): 653-656.
- Cid A, Picado A, Correia J B, et al. 2015. Oxidative stress and histological changes following exposure to diamond nanoparticles in the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea* (Muller, 1774) [J]. Journal of Hazardous Materials, 284: 27-34.
- Federici G, Shaw B J, Handy R D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects[J]. Aquatic Toxicology, 84(4): 415-430.
- Ferin J, Oberdorster G. 1985. Biological effects and toxicity assessment of titanium dioxides: anatase and rutile[J]. American Industrial Hygiene Association Journal, 46(2): 69-72.
- Hao L H, Wang Z Y, Xing B S. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Journal Environmental Sciences-China, 21(10): 1459-1466.
- Jaeger A, Weiss D G, Jonas L, et al. 2012. Oxidative stress-induced cytotoxic and genotoxic effects of nano-sized titanium dioxide particles in human HaCaT keratinocytes [J]. Toxicology, 296(1-3): 27-36.
- Kahru A, Ivask A, Blinova I, et al. 2008. Bioavailability and ecotoxicology of nanoparticles[J]. Toxicology Letters, 180(1): S20.
- Li H C, Zhou Q F, Wu Y, et al. 2009. Effects of waterborne nano-iron on medaka (*Oryzias latipes*): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72(3): 684-692.
- Long T C, Saleh N, Tilton R D, et al. 2006. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticle neurotoxicity[J]. Environmental Science & Technology, 40(14): 4352-4346.
- Musee N, Oberholster P J, Sikhivhilu L, et al. 2010. The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805) [J]. Chemosphere, 81(10): 1196-1203.
- Nel A, Xia T, Madler L, et al. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel[J]. Science, 311: 622-627.
- Nowack B, Bucheli T D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment [J]. Environmental Pollution, 150(1): 5-22.
- Olmedo D G, Tasat D R, Guglielmotti M B, et al. 2005. Effect of titanium dioxide on the oxidative metabolism of alveolar macrophages: An experimental study in rats[J]. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 73A(2): 142-149.
- Ramsden C S, Smith T J, Shaw B J, et al. 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain [J]. Ecotoxicology, 18(7): 939-951.
- Service R F. 2003. American Chemical Society meeting: Nanomaterials show signs of toxicity[J]. Science, 300: 243-243.
- Spann N, Aldridge D C, Griffin Julian L, et al. 2011. Size-dependent effects of low level cadmium and zinc exposure on the metabolome of the Asian clam, *Corbicula fluminea* [J]. Aquatic Toxicology, 105(3-4): 589-599.
- Stanley J K, Coleman J G, Weiss C A, et al. 2010. Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 29(2): 422-429.
- Wang J, Chen C, Liu Y, et al. 2008. Potential neurological lesion after nasal instillation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the anatase and rutile crystal phases[J]. Toxicology Letters, 183(1-3): 72-80.
- Wang J, Zhou G, Chen C, et al. 2007. Acute toxicity and bio-distribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration[J]. Toxicology Letters, 168(2): 176-185.
- Zhu X S, Wang J X, Zhang X Z, et al. 2010. Trophic transfer of TiO<sub>2</sub> nanoparticles from *Daphnia* to zebrafish in a simplified freshwater food chain[J]. Chemosphere, 79(9): 928-933.
- Zhuang W, Gao X L. 2014. Methods, mechanisms and typical bio-indicators of engineered nanoparticle ecotoxicology: an overview[J]. Clean-Soil Air Water, 42(4): 377-385.

Oxidative Stress Response of *Corbicula fluminea* Exposed to  
Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles

WANG Lu-ping, HU Tao, ZHANG Gui-rong, MA Xu-fa, WEI Kai-jian

( College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Freshwater Aquaculture  
Collaborative Innovation Center of Hubei Province, Wuhan 430070, P. R. China)

**Abstract:** In recent years, the wide use of nano-materials has led to accumulation of these materials in water and soil, bringing potential risk to the environmental and ecological health. Anatase titanium dioxide nanoparticles (TiO<sub>2</sub>-NPs) migrate between aquatic animals, from species lower on the food chain to species higher on the food chain. Whereas there are few reports on the ecotoxicity of titanium to mollusks. *Corbicula fluminea* is a mollusk with high nutrient content and economic value in China. It grows in a wide range of fresh water habitats and is an important indicator of environment pollution. In this study, titanium bioaccumulation and oxidative stress response of *Corbicula fluminea* exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs were investigated. Twelve treatment groups with 20 *C. fluminea* of each group included three TiO<sub>2</sub>-NPs exposure concentrations (5 mg/L, 50 mg/L and 100 mg/L) and four exposure durations (24 h, 48 h, 96 h and 192 h). After exposure, titanium concentrations and enzyme activities of glutathione S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) were measured in gill, digestive gland and foot muscle tissues of *C. fluminea*. Results are as follows: (1) Average titanium content of gill, digestive gland and foot muscle tissues of *C. fluminea* exposed to TiO<sub>2</sub>-NPs were significantly higher than for the control group ( $P < 0.05$ ). Average titanium content in digestive gland and foot muscle increased with time and was higher in the digestive gland than in the foot muscle. Average titanium content in gills was similar in the low and medium TiO<sub>2</sub>-NPs concentration groups. After exposure for 24 h to 192 h, the ranges of average titanium content in the gill, digestive gland and foot muscle were, respectively, 0.73 – 3.50 μg/g, 2.88 – 32.37 μg/g and 1.15 – 3.11 μg/g. (2) Initially, GST enzyme activities in the three tissues increased, but at different rates. Over time, GST activities in gill and digestive gland tissues rose again after a significant decline, whereas GST activity in foot muscle tissue gradually decreased. After exposure for 24 h to 192 h, the ranges of GST activities in the gill, digestive gland and foot muscle tissues were, respectively, 97.39 – 371.44 U/mg, 164.92 – 837.22 U/mg and 63.39 – 247.75 U/mg. (3) After exposure for 24 h, SOD activities in gill and foot muscle tissues increased markedly in all three TiO<sub>2</sub>-NPs concentration groups, as did SOD activity in digestive gland tissues for the low TiO<sub>2</sub>-NPs concentration group. SOD activities in the three tissues all gradually declined over time and the rate of decline was proportional to TiO<sub>2</sub>-NPs concentration. After exposure for 24 – 192 h, SOD activities in gills, digestive glands and foot muscles were, respectively, 7.68 – 27.05 U/mg, 3.63 – 16.92 U/mg and 4.25 – 43.08 U/mg. Exposure to TiO<sub>2</sub>-NPs at all three concentrations leads to significant titanium bioaccumulation and oxidative stress reaction in *C. fluminea*.

**Key words:** *Corbicula fluminea*; anatase titanium dioxide nanoparticles; antioxidant enzymes; oxidative stress