

文章编号:1674-9669(2024)04-0623-10 DOI:10.13264/j.cnki.yjskx.2024.04.018

引文格式:曾露雪,边子俊,宁周神,等.稀土铽对斑马鱼急性毒性及抗氧化酶活性的影响[J].有色金属科学与工程,2024,15(4):623-632.

## 稀土铽对斑马鱼急性毒性及抗氧化酶活性的影响

曾露雪<sup>a,b</sup>, 边子俊<sup>a,b</sup>, 宁周神<sup>a,b</sup>, 陈明<sup>a,b</sup>, 董伟<sup>\*a,b,c</sup>

(江西理工大学, a. 江西省矿冶环境污染控制重点实验室; b. 资源与环境工程学院;

c. 生命科学学院,江西 赣州 341000)

**摘要:**以斑马鱼(*Danio rerio*)为受试鱼种,采用半静态急性暴露实验,研究了稀土离子铽(Terbium, Tb)对斑马鱼的急性毒性,并根据急性毒性实验结果设置含Tb浓度分别为2.0、20.0、40.0 mg/L 3个组,分别对斑马鱼3个组织(头部、肌肉、内脏)的过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量进行测定,以此来研究Tb对斑马鱼的毒理作用。结果表明,高浓度Tb会对斑马鱼产生较大的毒性,Tb对斑马鱼的48 h和96 h半致死浓度(LC<sub>50</sub>)分别为81.39 mg/L和79.03 mg/L,安全浓度(C<sub>s</sub>)为7.90 mg/L; Tb<sup>3+</sup>对斑马鱼各部位CAT活性均有不同影响。随着Tb<sup>3+</sup>浓度升高,CAT活力逐渐减弱,肌肉和内脏的CAT活性也随暴露时间的增加,在呈现前期被显著诱导后又被显著抑制,但40.0 mg/L浓度组内脏的CAT活力在净化期内始终未恢复。斑马鱼内脏MDA含量受Tb<sup>3+</sup>胁迫,呈现诱导-抑制反复变化,肌肉MDA含量在胁迫期间表现为明显的诱导效应,在暴露的第14天时达到峰值为57.13%;40.0 mg/L浓度组内脏MDA含量在进入净化阶段仍被显著诱导,最高诱导率达28.99%。研究探究了Tb<sup>3+</sup>对斑马鱼的急性毒性与氧化应激毒性,对防止和减少稀土离子对水生生物的毒性作用提供参考依据。

**关键词:**铽;斑马鱼;急性毒性;过氧化氢酶(CAT);丙二醛(MDA)

中图分类号:X503.225 文献标志码:A

## Effects of terbium on acute toxicity and antioxidant enzyme activity of zebrafish

ZENG Luxue<sup>a,b</sup>, BIAN Zijun<sup>a,b</sup>, NING Zhoushen<sup>a,b</sup>, CHEN Ming<sup>a,b</sup>, DONG Wei<sup>\*a,b,c</sup>

(a. Jiangxi Key Laboratory of Mining and Metallurgy Environmental Pollution Control; b. School of Resources and Environmental Engineering;

c. School of Life Sciences, Jiangxi University of Science and Technology, Ganzhou 341000, Jiangxi, China)

**Abstract:** The acute toxicity of Terbium (Tb) to zebrafish (*Danio rerio*) was investigated by a semi-static acute exposure test. Based on the acute toxicity test, the concentration groups of low (2.0 mg/L), medium (20.0 mg/L), and high (40.0 mg/L) of Tb were set up to determine the toxicological effects of Tb on zebrafish by analyzing catalase (CAT) activity and malondialdehyde (MDA) content in three tissues (head, muscle and viscera) of zebrafish. The results showed that a high concentration of Tb was more toxic to zebrafish. The 48 h and 96 h median lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) of Tb to zebrafish were 81.39 mg/L and 79.03 mg/L, respectively. The safe

收稿日期:2023-02-22;修回日期:2023-07-20

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2019YFC1805100);江西省杰出青年基金资助项目(2021ACB213004);江西省青年井冈学者奖励计划资助项目(QNJC2020050);赣州市创新领军人才计划资助项目(202101095076)

通信作者:董伟(1982— ),博士,教授,主要从事环境生物学方面的研究。E-mail:wdong@jxust.edu.cn.

concentration ( $C_s$ ) was 7.90 mg/L. Terbium (III) ion ( $Tb^{3+}$ ) had different effects on CAT activity in various parts of zebrafish. CAT activity decreased gradually with the increase of Tb concentration. With increased exposure time in muscle and viscera, CAT activity was initially induced and then significantly inhibited, while it did not recover in viscera during the purification period in the 40mg/L group. Under Tb stress, the MDA content in viscera of zebrafish showed repeated induction-inhibition changes, while MDA content in muscle exhibited an obvious induction effect during stress, peaking 57.13% on the 14th day after exposure. The visceral MDA content of zebrafish treated with 40.0 mg/L concentration was still significantly induced at the purification phase, with the highest induction rate of 28.99%. The study revealed the acute toxicity and oxidative stress toxicity of Tb to zebrafish and provided a reference for preventing and reducing the toxicity of rare earth ions to aquatic organisms.

**Keywords:** terbium; zebrafish; acute toxicity; catalase (CAT); malondialdehyde (MDA)

中国是稀土的主要生产国,1996年稀土储备总量达4300万吨,占全球总量的89.6%<sup>[1]</sup>。稀土元素在工业、材料等领域的广泛应用<sup>[2-3]</sup>导致了它们在水生和陆生生态系统中过度积累。GU等<sup>[4]</sup>、WANG等<sup>[5]</sup>测量了来自南海北部沿海地区的14种海洋野生鱼类的总稀土浓度( $\Sigma$  REE)为1.02~178.55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,来自南海南部贝类的 $\Sigma$  REE为0.35  $\text{mg}/\text{kg}$ ,来自意大利西北部浮游动物的 $\Sigma$  REE平均值为0.12  $\text{mg}/\text{kg}$ 。BAU等<sup>[6]</sup>首次在水生环境中观察到稀土含量的增加,发现钆(Gd)浓度与来自工业高发地区的淡水输入量之间呈正相关关系。相关动物实验表明,稀土元素能够引起组织特异性生物蓄积和肝、肺、脑损伤,同时接触稀土元素和酸性污染物可能会加剧以上不良后果<sup>[7-8]</sup>。此外,稀土元素还可以在环境中积累或扩散,对生物体和人体而言,具有潜在的危害效应<sup>[9]</sup>。

水生动物抗氧化酶、解毒酶能抵御外源性污染物质产生的氧自由基(ROS)以及由自身的代谢物所引起的危害,过氧化氢酶(CAT)能将体内的氧自由基清除;丙二醛(MDA)为在体内氧自由基和脂质过氧化反应的终末产物,可以破坏蛋白质和核酸等生物大分子,而过量的MDA又能引起细胞膜的损伤。这些抗氧化酶的活力及动态变化常被作为生物敏感指标,用来检测生物体氧化应激的程度<sup>[10]</sup>。研究已经证实稀土离子能够干扰生物自身的抗氧化防御体系,从而使得ROS数量增多,抗氧化酶的活性和功能也会发生变化。CAT和MDA作为细胞的保护酶系统,能够形成有效的保护屏障,防止细胞氧化损伤,已被广泛应用于环境污染的有效生物标志物<sup>[11-12]</sup>。

目前国内外有关稀土元素对鱼类的毒性的探讨主要集中在一些常用的稀土元素,如镧(La)<sup>[13]</sup>、钆(Gd)<sup>[14]</sup>、钇(Y)<sup>[15]</sup>等,研究不同浓度下急性或慢性暴露对生物体的毒性影响,而研究铽(Tb)对鱼类体内的抗氧化活性的影响还未见相关报道。Tb作为重稀土元

素,主要应用于燃料电池、伸缩合金及磁光贮存等领域,在赣南地区的存储量较高<sup>[16]</sup>。本文选择了斑马鱼(*Danio rerio*)作为模型生物,进行急性毒性实验,对斑马鱼在Tb暴露的不同时期的异常活动、半致死浓度( $LC_{50}$ )和安全浓度( $C_s$ )等进行监测、计算,并通过宏观数据统计分析和生化分析技术,研究了斑马鱼的不同组织(头部、肌肉和内脏)在Tb胁迫下,其暴露和净化过程中的CAT活力、MDA含量的动态变化,以便更深入认识Tb对鱼的毒性效应和毒性机理。

## 1 实验部分

### 1.1 实验生物

成年斑马鱼,购自于上海费曦生物科技有限公司,体长为3~4 cm,体重为0.3~0.7 g,养殖水用曝气24 h以上的自来水,需要经过活性炭过滤和紫外灯灭菌后,在独立循环的养殖系统中进行养殖驯化,方可加入到循环系统中,饲养水温为(28±0.5)°C,控制光暗比为14:10,每天喂食1次,其间及时清理食料残渣和粪便。暴露实验所用的实验鱼需在实验室提前驯化培养7 d,其自然死亡率小于2%,实验开始前筛选健康活泼且体长均匀的斑马鱼,实验前禁食1 d。

### 1.2 主要试剂与仪器

实验所用试剂均为分析纯,六水合氯化铽( $TbCl_3 \cdot 6H_2O$ )购自国药控股化学试剂有限公司。过氧化氢酶(CAT)活力测定试剂盒(紫外分光光度法)、丙二醛(MDA)含量测定试剂盒(可见分光光度法)购自北京索莱宝科技有限公司。

实验主要仪器包括:多功能酶标仪、紫外可见分光光度计、解剖镜、手持匀浆仪、高速低温冷冻离心机等。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 急性毒性实验

依据前期的急性毒性预实验结果, 以及稀土矿山冶炼废水中稀土离子的浓度(1~200 mg/L)<sup>[17]</sup>, 结合经济合作与发展组织(OECD)的标准以及我国《化学品测试方法》确定的浓度范围, 最终选用了8个浓度组: 60、70、80、85、87、90、93、95 mg/L, 以及对照组(0 mg/L), 每组设置2个平行实验。采用半静态实验法, 在实验前的24 h不喂食, 每隔24 h更换实验溶液。随机挑选健康未染病且体型接近的斑马鱼进行实验, 每组投放20尾, 养殖缸中暴露液总体积为2 L, 每个养殖缸需添加增氧泵以确保水中有充足的溶解氧, 实验周期为96 h, 实验期间不喂食, 每天定时测定并记录溶液pH、温度, 每隔24 h观察并拍照记录斑马鱼的症状及死亡情况。以鳃盖关闭并沉于水底, 用玻璃棒触碰尾部无反应或者在5 min内没有机械运动的表现即被认定为死亡<sup>[18]</sup>, 并及时移除。

#### 1.3.2 酶活性影响实验

根据急性毒性研究, 设置3个处理组, 分别为1/2-96 h LC<sub>50</sub>(40.0 mg/L)、1/4-96 h LC<sub>50</sub>(20.0 mg/L)和1/40-96 h LC<sub>50</sub>(2.0 mg/L), 以及一个对照组, 各个处理设置3个重复实验。养殖缸中暴露液总体积为2 L, 每组投放20尾成年且体型接近的斑马鱼, 实验时间包括Tb暴露阶段和净化阶段, 分别为14 d和7 d, 暴露阶段完成后将斑马鱼迁移至干净的饲养水体中, 在暴露阶段以及净化阶段中每48 h更换实验溶液或干净的养殖水1次, 在喂食后, 将残渣和排泄物清理干净, 整个实验阶段保证水温和光周期的稳定, 在第1天、第7天、第14天、第15天、第21天采样, 每个平行样随机采集3尾进行合并处理, 确保每个部位收集到的样本量大于0.1 g。

#### 1.4 CAT活力和MDA含量的测定

斑马鱼样品采用冰浴法(放在冰水中10~15 min)麻醉后用预冷的蒸馏水进行冲洗, 随后用滤纸吸去鱼体水分, 放在冰上待解剖。解剖时, 将斑马鱼放在解剖镜下, 用解剖工具将鱼头、鱼身及内脏分开, 肌肉组织取自鱼身, 需要将主骨去除, 内脏中若有鱼子也需要去除。取下的各组织放入预先称好重量的EP管进行称重, 按照比例加入提取液, 放置冰水浴中匀浆, 随后在4 °C、8 000 r/min条件下离心10~15 min。离心后的混合液置于冰上待测, 同一组织的提取液用来测定2种酶活力, 测定需在24 h内完成。CAT活力和MDA含量测定按照测试盒(北京索莱宝科技有限公司)说明书的方法实施。

### 1.5 数据处理与分析

参照张云等<sup>[19]</sup>对研究过程中统计得到的斑马鱼96 h内的死亡率, 采用SPSS 25.0软件计算不同暴露时间Tb对斑马鱼的LC<sub>50</sub>和95%置信区间。CAT活力和MDA含量采用单因素方差做显著性差异分析, 0.01≤p<0.05被认为有统计学的显著性差异, 以\*表示; p<0.01被认为有统计学的极显著性差异, 以\*\*表示。

## 2 结果与讨论

### 2.1 斑马鱼的中毒症状

斑马鱼在不同浓度的Tb暴露组中的表现如下: 在急性毒性进行的前6 h, 85、87、90、93、95 mg/L浓度组中大部分斑马鱼出现异常行为, 如: 游动速度加快、呼吸频率加快、四处游窜、撞击缸壁等; 随着暴露时间的延长, 越来越多的斑马鱼聚集水底, 并游动缓慢, 且高浓度组斑马鱼出现异常行为增多, 如: 无法控制身体平衡、身体侧翻或竖直游动, 鳃盖不停张合等。急性毒性实验结束后, 高浓度组(93、95 mg/L)的斑马鱼在48 h内全部死亡, 死亡后的斑马鱼体表通常附着白色絮状物, 头部和腹部伴随红肿, 且水族箱的内壁出现一圈白色泡沫、溶液变得浑浊; 对于低浓度组的实验斑马鱼而言, 中毒症状基本相同但时间会有所延迟。

### 2.2 Tb对斑马鱼的急性毒性

统计各浓度组斑马鱼的死亡数量, 计算24、48、72、96 h死亡率(表1)以及LC<sub>50</sub>和C<sub>s</sub>(表2)。结果表明, 除了对照组及最低浓度组(60 mg/L)之外, 其他浓度下的受试斑马鱼出现了不同程度的死亡, 计算后得到Tb对斑马鱼的48、96 h的LC<sub>50</sub>分别为81.39、79.03 mg/L, 根据1986年国家环保局的《环境检测技术规范》<sup>[20]</sup>中给出的污染物对鱼类急性毒性分级标准, 96 h LC<sub>50</sub>在1~100 mg/L之间为高毒, S<sub>c</sub>为1/10的96 h LC<sub>50</sub>(7.90 mg/L)。

### 2.3 Tb对斑马鱼体内过氧化氢酶活力的影响

图1—图3所示分别为斑马鱼在不同浓度的Tb溶液中, 头部、肌肉和内脏的CAT活力变化, 表3所列为不同时间段斑马鱼各部位的CAT活力及其变化率。对照组中头部、肌肉、内脏的平均CAT活力依次为258.95、1722.91、46643.92 U/g, 内脏的平均CAT活力最高, 其次是肌肉和头部。在暴露初期, 20.0、40.0 mg/L浓度组头部的CAT活力明显增加(p<0.05), 诱导率分别为46.87%、42.36%; 在暴露7天时下降到对照水平, 而40.0 mg/L浓度组在14天时受到显著抑制(p<

表1 Tb对斑马鱼急性毒性实验结果  
Table 1 Acute toxicity test results of Tb to zebrafish

Tb质量浓度/(mg/L)	死亡率/%			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
60	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
70	5.000±0.005	15.000±0.005	15.000±0.005	15.000±0.005*
80	15.000±0.005	55.000±0.015**	60.000±0.010**	60.000±0.010**
85	10.000±0.000	45.000±0.015**	60.000±0.010**	70.000±0.000**
87	40.000±0.000**	60.000±0.000**	75.000±0.005**	85.000±0.005**
90	55.000±0.015**	55.000±0.005**	100.000±0.000**	100.000±0.000**
93	55.000±0.015**	100.000±0.000**	100.000±0.000**	100.000±0.000**
95	100.000±0.000**	100.000±0.000**	100.000±0.000**	100.000±0.000**

注：“\*”表示Tb浓度组和对照组之间差异显著( $p<0.05$ )，“\*\*”表示Tb浓度组和对照组之间差异极显著( $p<0.01$ )。

表2 Tb对斑马鱼的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)  
Table 2 Median-lethal concentration LC<sub>50</sub> of Tb to zebrafish

暴露时间/h	线性回归方程	相关系数	LC <sub>50</sub> /(mg/L)	95%置信区间/(mg/L)	C <sub>s</sub> /(mg/L)	毒性强弱(96 h)
24	$y=3.905x-7.116$	0.610 5	89.06	86.25~92.47		
48	$y=5.108 3x-9.192$	0.8876	81.39	77.27~84.38	7.90	高毒
72	$y=5.493 6x-9.866$	0.940 1	79.73	75.44~82.71		
96	$y=5.630 7x-10.103$	0.960 3	79.03	74.87~81.89		

注: $y$ 代表死亡率, $x$ 代表浓度的常用对数。

0.01),抑制率为45.56%,但2.0 mg/L浓度组和20.0 mg/L浓度组CAT活力仍低于对照水平。在净化阶段,2.0 mg/L浓度组CAT活力仍显著高于对照组水平( $p<0.05$ ),20.0 mg/L浓度组的CAT活力恢复速度较快,而40.0 mg/L浓度组仍显著低于对照组水平( $p<0.01$ )。20.0、40.0 mg/L浓度组肌肉中的CAT活性在暴露第7天和第1天均受到了显著诱导( $p<0.05$ ),诱导率峰值分别为44.18%、50.08%;在暴露第14天时各浓度组CAT活力均被显著抑制( $p<0.01$ ),抑制率从低浓度组至高浓度组依次为30.45%、37.67%、42.93%;此后,各浓度组在净化期间都恢复到了对照水平。在暴露的第1天至第14天,内脏的CAT活力呈现先下降后增加的趋势,其中20.0 mg/L浓度组较

其他组更早出现诱导效应,诱导率为46.77%,在第1天达到峰值;各浓度组内脏的CAT活力均在第7天受到显著抑制( $p<0.01$ ),抑制率由低到高依次为49.62%、57.20%、66.26%。在净化期内,2.0 mg/L浓度组和20.0 mg/L浓度组已基本恢复,而40.0 mg/L浓度组恢复较慢。整体而言,内脏对Tb较为敏感,40.0 mg/L浓度组的CAT活力在暴露第7天时抑制率较其他组更高。

#### 2.4 Tb对斑马鱼体内丙二醛含量的影响

图4—图6所示分别为斑马鱼3种组织内MDA含量的变化,表4所列为不同时间段斑马鱼各部位的MDA含量及其变化率。在暴露期间,除40.0 mg/L浓度组外,2.0、20.0 mg/L浓度组斑马鱼头部MDA含

表 3 斑马鱼各部位在不同时间段的 CAT 活力及其变化率

Table 3 CAT activity and its changing rate in different parts of zebrafish in different time periods

部位	组别	第1天		第7天		第14天		第15天		第21天	
		CAT活力/(U/g)	变化率/%	CAT活力/(U/g)	变化率/%	CAT活力/(U/g)	变化率/ (%)	CAT活力/(U/g)	变化率/%	CAT活力/(U/g)	变化率/%
头部	对照组	212.48	—	203.60	—	225.30	—	209.31	—	209.31	—
	2.0 mg/L	208.77	-1.75	203.54	-0.03	212.26	-5.79	239.44	14.39	203.54	-2.76
	20.0 mg/L	312.07	46.87	198.25	-2.63	184.08	-18.30	198.25	-5.28	155.48	-25.72
	40.0 mg/L	302.49	42.36	220.93	8.51	122.66	-45.56	157.60	-24.70	177.01	-15.43
肌肉	对照组	1 449.07	—	1 561.90	—	2 250.93	—	1 676.33	—	1 686.56	—
	2.0 mg/L	1 475.03	1.79	1 296.67	-16.98	1 565.43	-30.45	1 424.27	-15.04	1 532.90	-9.11
	20.0 mg/L	1 955.66	34.96	2 251.93	44.18	1 402.97	-37.67	1 600.27	-4.45	1 767.07	4.77
	40.0 mg/L	2 203.73	52.08	2 317.93	48.40	1 284.70	-42.93	1 666.17	-0.61	1 857.87	10.16
内脏	对照组	51 681.80	—	46 628.50	—	47 432.80	—	42 043.70	—	45 432.80	—
	2.0 mg/L	52 712.00	1.99	23 491.36	-49.62	50 603.90	6.69	52 397.66	24.63	51 064.33	12.40
	20.0 mg/L	75 854.2	46.77	19 958.06	-57.20	63 217.30	33.28	54 728.96	30.17	48 062.30	5.79
	40.0 mg/L	61 402.9	18.81	15 731.56	-66.26	67 491.80	42.29	35 825.13	-14.79	43 101.36	-5.13

注: “—”表示无数据; 变化率显示为负数说明抑制, 反之为诱导。

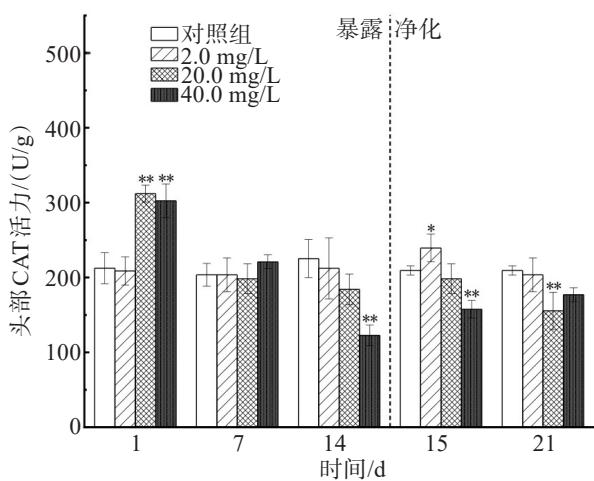


图1 Tb暴露与净化过程中斑马鱼头部CAT活力的变化  
Fig.1 Changes of CAT activity in zebrafish head during Tb exposure and purification process

量明显提高( $p < 0.05$ ), Tb 对第 1 天 2.0 mg/L 浓度组和 20.0 mg/L 浓度组的诱导率依次为 78.46% 和 16.17%; 而其余各组的水平在暴露和净化期间均无显著变化。2.0 mg/L 浓度组和 40.0 mg/L 浓度组的肌

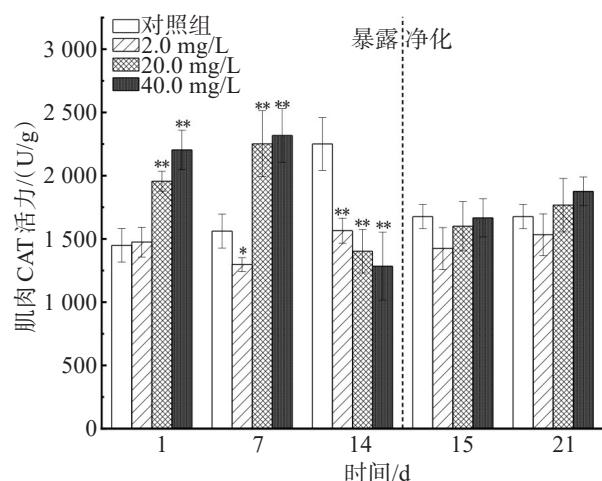


图2 Tb暴露与净化过程中斑马鱼肌肉CAT活力的变化  
Fig.2 Changes of CAT activity in zebrafish muscle during Tb exposure and purification process

肉 MDA 含量分别在暴露第 1 天和第 7 天明显提高( $p < 0.05$ ), 其诱导率分别为 56.61%、42.32%; 在暴露的第 14 天, 40.0 mg/L 浓度组的 MDA 含量仍显著高于对照水平( $p < 0.01$ ), 此时诱导率达到峰值, 为 57.13%;

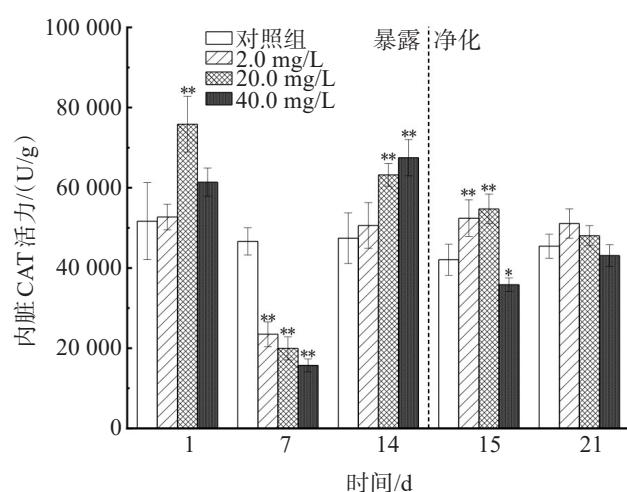


图3 Tb暴露与净化过程中斑马鱼内脏CAT活力的变化

Fig.3 Changes of CAT activity in zebrafish viscera during Tb exposure and purification process

净化阶段各组肌肉MDA含量均不同程度高于对照组水平( $p<0.05$ )，其中40.0 mg/L浓度组是对照组的1.6倍。内脏部分，在Tb暴露期间，20.0 mg/L浓度组和40.0 mg/L浓度组的MDA含量呈现了抑制-诱导反复出现的波动规律。20.0 mg/L浓度组和40.0 mg/L浓度组在第1天时MDA含量显著减少，抑制率分别为19.67%、46.75%；但在第7天又被显著诱导，诱导率分别为24.57%、44.49%。20.0 mg/L浓度组在第14天时显著低于对照组，抑制率为24.82%；40.0 mg/L浓度组仍然被显著诱导，诱导率为42.34%，其中20.0 mg/L浓度组在第14天抑制率达到峰值，40.0 mg/L浓度组诱导率在第7天达到峰值。整个净化阶段，Tb对40.0 mg/L浓度组MDA含量仍有明显诱导，一直超出对照组水平( $p<0.01$ )，诱导率在净化后第1天和第7天分别为20.50%、28.99%，其余浓度组基本恢复到对照水平。

表4 斑马鱼各部位在不同时间段的MDA含量及其变化率

Table 4 MDA content and its change rate in different parts of zebrafish in different time periods

部位	组别	第1天		第7天		第14天		第15天		第21天	
		MDA含量/(mol/g)	变化率/%								
头部	对照组	22.91	—	19.79	—	17.63	—	20.46	—	17.90	—
	2.0 mg/L	40.80	78.46	20.76	4.89	15.90	-9.78	21.76	6.36	18.76	4.82
	20.0 mg/L	26.62	16.17	26.63	34.51	19.58	11.06	18.41	-10.02	18.41	2.85
	40.0 mg/L	20.96	-8.52	20.40	3.07	20.14	14.24	21.38	4.48	15.11	-15.56
肌肉	对照组	16.29	—	14.90	—	11.59	—	10.57	—	10.57	—
	2.0 mg/L	25.51	56.61	22.94	53.92	12.47	7.59	13.94	31.87	13.27	25.56
	20.0 mg/L	15.76	-3.29	16.97	13.91	11.95	3.13	12.31	16.45	14.31	35.38
	40.0 mg/L	16.68	2.39	21.21	42.32	18.21	57.13	13.77	30.31	16.87	59.68
内脏	对照组	54.06	—	47.22	—	39.94	—	46.55	—	44.80	—
	2.0 mg/L	54.14	0.14	40.84	-13.51	42.97	7.58	50.03	7.47	48.84	9.02
	20.0 mg/L	43.42	-19.67	58.82	24.57	30.03	-24.82	41.10	-11.72	43.10	-3.08
	40.0 mg/L	28.79	-46.75	68.23	44.49	56.85	42.34	56.12	20.50	57.79	28.99

注：“—”表示无数据；变化率显示为负数说明抑制，反之为诱导。

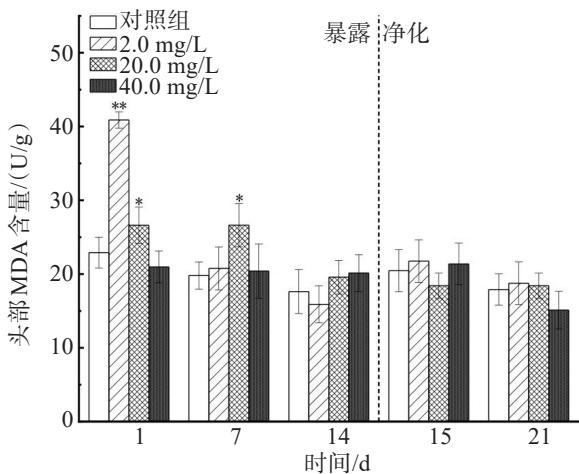


图 4 Tb 暴露与净化过程中斑马鱼头部 MDA 含量的变化  
Fig.4 Changes of MDA content in zebrafish head during Tb exposure and purification process

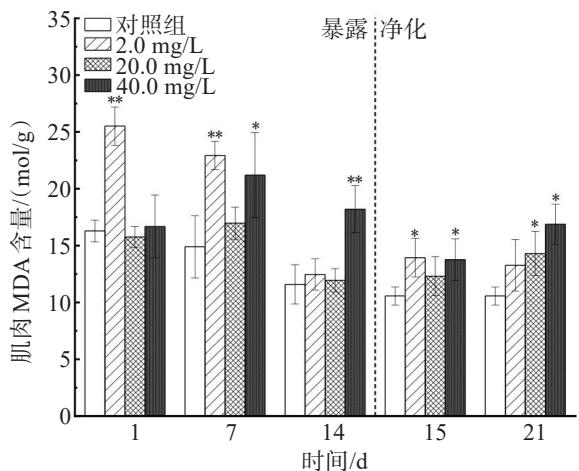


图 5 Tb 暴露与净化过程中斑马鱼肌肉 MDA 含量的变化  
Fig.5 Changes of MDA content in zebrafish muscle during Tb exposure and purification process

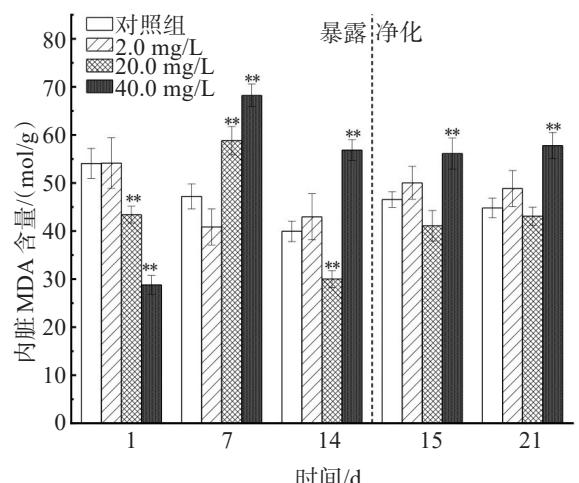


图 6 Tb 暴露与净化过程中斑马鱼内脏 MDA 含量的变化  
Fig.6 Changes of MDA content in zebrafish viscera during Tb exposure and purification process

### 3 讨 论

鱼类急性毒性实验一般用于研究短期毒性药物暴露对鱼类造成的危害作用, 可用以研究毒性药物的毒性大小以判断其毒性级别, 通常采用  $LC_{50}$  为效应终端进行初步评判。计算结果显示, 随着 Tb 浓度的上升, 斑马鱼的死亡率也进一步增加, 且两者之间存在明显的剂量-效应关系。实验所使用的鱼种类和暴露物质不同, 其毒性强弱也不同, 本研究采用鱼龄 3 个月以上的成鱼作为研究对象, Tb 对其的 96 h  $LC_{50}$  为 79.03 mg/L, 在其他研究中 La、钕(Nd)、铈(Ce) 对成年斑马鱼(体长约为 3.5 cm)的 96 h  $LC_{50}$  分别为 2.53、2.03、2.76 mg/L<sup>[21]</sup>。由此可知, 由于饲养条件和环境的不同, 不同种类的稀土离子对同一种类的生物所造成的毒性效应也不同。

鱼类在接触到水域中的有毒物质后会产生各种中毒症状。本实验的斑马鱼暴露于 Tb 溶液中出现的异常行为有: 乱窜、侧翻、运动急促、活动迟缓等, 并有大量的絮状物附着。与报道的稀有鱼在接触氯化镧<sup>[22]</sup>和氯化铈<sup>[23]</sup>出现的异常行为类似。稀土离子可造成动物神经系统的损伤, 实验中监测到斑马鱼侧翻、移动迟缓等的不稳定情况, 可能是由于 Tb 溶液对动物神经的有害影响引起身体失衡<sup>[24]</sup>。另外, 身体的黏液细胞对鱼本身具有非常重要的防护功能, 不但能够降低鱼体内部与外部之间的摩擦, 避免外部物质直接流入身体, 而且还能够对疾病的发生及时进行免疫反应<sup>[25]</sup>。所以, 在本实验中, 斑马鱼产生的大量的白色絮状物很可能是由于毒物刺激引起黏液细胞的损伤, 造成黏液分泌异常。斑马鱼中毒后期呼吸急促、浮头、侧翻等, 可能是由于鳃细胞功能的损伤和大量密集的黏液引起通气不畅, 最后由于缺氧而导致死亡<sup>[26]</sup>。

对于需氧生物而言, 在代谢外源污染物的过程中会产生 ROS, 并具有高度的活泼反应性, 如果这些自由基长期滞留在生物体内, 会影响细胞的完整性和功能, 对细胞造成严重损伤, 而其中的 ROS 与膜发生脂质反应, 则将导致脂质过氧化<sup>[27]</sup>。生物体内的抗氧化防御系统, 能够缓冲 ROS 的毒性作用, CAT 通常被认为是抗氧化系统受到氧化损伤的重要指标, 可对 ROS 形成有效的保护屏障, 防止氧化细胞损伤。

CAT 能将  $H_2O_2$  转化为  $H_2O$  和  $O_2$ , 从而抑制其在细胞和组织中的积累<sup>[28]</sup>。CAT 作为过氧化物酶的重要标志酶, 其活性升高表明生物体内产生的 ROS

逐渐增多,提示环境污染物的毒性逐渐增强。本研究结果表明,在Tb胁迫下,中高浓度组斑马鱼头部的CAT活力受到了显著诱导( $P<0.05$ ),但暴露后期40.0 mg/L浓度组仍然显著低于对照组水平,且在净化期间一直处于被抑制的状态,说明该组织对酶系统的调节能力较差,受高浓度的Tb影响而呈现了中毒性的失活,同时受体内残留的Tb影响而难以恢复。头部由于通过鳃直接吸收过滤水中的有毒物质,是最容易蓄积有毒离子的器官<sup>[29]</sup>。有研究指出,稀土离子在鲤鱼体内的积累含量从高至低为鳃>内脏>鳞>头>骨骼>肌肉<sup>[30]</sup>。与头部CAT活力变化不同的是,肌肉组织受Tb胁迫后,CAT活力在暴露后期显著增加( $P<0.05$ ),在净化期间降低至对照组水平。暴露初期,40.0 mg/L浓度组内脏的CAT活性显著增强( $P<0.05$ ),随着暴露时间的增加,内脏相比头部和肌肉更早出现CAT活力被显著抑制的现象,于7天后被显著诱导超过对照水平后再次被抑制( $p < 0.05$ )。40.0 mg/L浓度组在净化7天后仍受到明显的抑制效应( $p<0.05$ )。这表明内脏对Tb的敏感性高于其他组织,对水环境中的污染物能做出更快响应<sup>[31]</sup>。这与郭红岩等<sup>[32]</sup>研究镱(Yb)暴露对鲫鱼肝脏酶活性结果相似,内脏的CAT活力相比于其他组织更容易对稀土离子表现出明显的时效性。一些学者提出肝脏CAT活力降低证明稀土离子可使肝脏抗氧化能力下降,发生肝脏脂质化损害,可能是因为稀土离子对谷胱甘肽的影响所致,致使肝脏解毒能力减弱<sup>[33]</sup>。

MDA是脂质过氧化(LPO)反应的重要产物,能与游离氨基酸作用,损伤生物大分子和细胞膜系统<sup>[34]</sup>。郭婷等<sup>[35]</sup>在研究铬(Cr)对草鱼的氧化损伤机制时发现,MDA含量随着Cr<sup>6+</sup>浓度的上升在不断增加,通过检测MDA含量能了解反应机体的中毒情况。刘占才等<sup>[36]</sup>将草鱼暴露在Hg<sup>2+</sup>中,发现内脏MDA含量在暴露初期显著上升( $p<0.05$ ),随之转移到净化后期,其内脏MDA含量基本恢复到正常水平。黄志斐等<sup>[37]</sup>的研究表明,翡翠贻贝(*Perna viridis*)受到十溴联苯醚(BDE209)胁迫时,高浓度组外套膜的MDA浓度随着时间增长反而明显上升,并认为其成因极有可能是由于长期的BDE209胁迫,对翡翠贻贝所产生的破坏太大而短期内无法修复。在实验中,中低浓度组的肌肉MDA浓度从暴露第7天后明显上升( $p<0.05$ ),随后在净化期间基本恢复;而40.0 mg/L浓度组从暴露初期MDA含量一直显著高于对照水平( $p<0.05$ ),但在净化阶段后也随着持续时间的增长而出现显著下降,与上述研究结果一致。不同Tb浓度下,斑马鱼内脏中MDA含量与对照组

相比,中高浓度组在暴露初期先下降后升高,在第7天显著高于对照组水平( $P<0.05$ );2.0 mg/L浓度组无显著变化,说明Tb能在短期内引起肝脏抗氧化系统的损伤,反过来又影响脂质过氧化等代谢活动,长期暴露可导致肝损伤。随着暴露时间的延长,MDA含量呈上升趋势,脂质过氧化程度增加,说明细胞受损程度增大。受到金属铜(Cu)的胁迫,斑马鱼鳃内MDA的含量随暴露时间的延长不断升高,并且高浓度组的MDA含量显著高于对照水平<sup>[38]</sup>。吉富罗非鱼(GIFT,*Oreochromis niloticus*)肝脏的MDA含量在重金属Cu的胁迫下,随着含量的上升而出现了先下降后增加的倾向,表明Cu可以引起抗氧化过程的损伤,并因此产生过多自由基,而造成抗氧化过程的清除功能显著降低<sup>[39]</sup>。

低浓度的稀土离子可诱导生物体内产生更多的抗氧化酶,而较高剂量的稀土离子随着作用时间的延长,其抗氧化作用逆转为促进细胞氧化<sup>[40]</sup>。本实验结果表明,Tb对斑马鱼具有急性毒性和氧化应激效应,斑马鱼头部、肌肉和内脏的CAT酶活性和MDA含量变化,在一定程度上可以反映Tb对斑马鱼的损伤作用,其中内脏中的CAT活性和MDA含量,可以更好的体现机体的抗氧化系统对Tb胁迫的响应。

总之,本研究结果不仅加深了对Tb胁迫下斑马鱼的急性毒性效应和抗氧化酶动态变化的认识,也为今后继续研究稀土离子对水生生物的毒理学效应提供了借鉴和参考,为生物摄入稀土元素的风险评判提供科学依据。

## 4 结 论

1)本研究采用半静态急性毒性实验,研究了稀土元素Tb对斑马鱼的急性毒性,Tb对斑马鱼96 h的LC<sub>50</sub>为79.03 mg/L,C<sub>s</sub>为7.90 mg/L,毒性评价等级为高毒。

2)Tb暴露能引起斑马鱼出现不同程度的中毒症状,其中头部和腹部出现红肿并伴有血丝,可能是鳃组织和内脏组织出现病变,可结合组织病理学进一步研究其病变部位。

3)Tb胁迫致使内脏组织中抗氧化酶系统发生紊乱,随着暴露时间的延长,CAT含量受到显著抑制。斑马鱼内脏中MDA含量受Tb胁迫的影响较大,在净化期间显著增加,机体脂质过氧化程度加剧。

因此,本文建议稀土矿区冶炼废水尽可能经过稀土资源二次回收后进行排放,尽量避免其对水生生物造成危害。

**参考文献:**

- [1] HEIN F J, AMBROSE W A, HACKLEY P, et al. Unconventional energy resources: 2017 review[J]. *Natural Resources Research*, 2019, 28(4): 1661-1751.
- [2] 钟灵强, 汪志刚, 陈荣春, 等. 稀土在汽车用先进高强钢中的研究现状[J]. 有色金属科学与工程, 2020, 11(6): 114-123.
- [3] 王玉香, 赖华生, 文小强, 等. 氟化物体系熔盐电解制备YNi合金[J]. 有色金属科学与工程, 2021, 12(1): 126-130.
- [4] GU Y Y, GAO Y P, GUO H H, et al. First attempt to assess ecotoxicological risk of fifteen rare earth elements and their mixtures in sediments with diffusive gradients in thin films[J]. *Water Research*, 2020, 185: 116254.
- [5] WANG X N, GU Y G, WANG Z H. Rare earth elements in different trophic level marine wild fish species[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 292: 118346.
- [6] BAU M, DULSKI P. Anthropogenic origin of positive gadolinium anomalies in river waters[J]. *Earth and Planetary Science Letters*, 1996, 143(1/2/3/4): 245-255.
- [7] CALABRESE E J. Hormesis is central to toxicology, pharmacology and risk assessment[J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2010, 29(4): 249-261.
- [8] PAGANO G, GUIDA M, TOMMASI F, et al. Health effects and toxicity mechanisms of rare earth elements-knowledge gaps and research prospects[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 115: 40-48.
- [9] 王慧敏, 宁周神, 徐鸿涛, 等. 固定化芽孢对铽离子的吸附特性[J]. 有色金属科学与工程, 2022, 13(5): 155-164.
- [10] ABHIPSA B, FALGUNI P, PATI SAMAR G, et al. Modulation of physiological oxidative stress and antioxidant status by abiotic factors especially salinity in aquatic organisms[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2021, 241: 108971.
- [11] HUANG P, LI J, ZHANG S, et al. Effects of lanthanum, cerium, and neodymium on the nuclei and mitochondria of hepatocytes: accumulation and oxidative damage[J]. *Environment Toxicology and Pharmacology*, 2011, 31(1): 25-32.
- [12] FREITAS R, COSTA S, CARDOSO C E D, et al. Toxicological effects of the rare earth element neodymium in *Mytilus galloprovincialis*[J]. *Chemosphere*, 2020, 244 (C): 125457.
- [13] ZHAO Y B, LIANG J H, MENG H Y, et al. Rare earth elements lanthanum and praseodymium adversely affect neural and cardiovascular development in zebrafish (*danio rerio*)[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(2): 1155-1166.
- [14] HANANA H, AGRAWAL P, ANDRÉ C, et al. Comparative study of the effects of gadolinium chloride and gadolinium-based magnetic resonance imaging contrast agent on freshwater mussel, *dreissena polymorpha*[J]. *Chemosphere*, 2017, 181: 197-207.
- [15] MOREIRA A, HENRIQUES B, LEITE C, et al. Potential impacts of lanthanum and yttrium through embryotoxicity assays with *crassostrea gigas*[J]. *Ecological Indicators*, 2020, 108: 105687.
- [16] DONG W, LI S, CAMILLERI E, et al. Accumulation and release of rare earth ions by spores of *bacillus* species and the location of these ions in spores[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(17): e00956-19.
- [17] DONG W, WANG H, NING Z, et al. Bioadsorption of terbium(iii) by spores of *bacillus subtilis*[J]. *Minerals*, 2022, 12(7): 866-879.
- [18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法[D]. 北京: 中国标准出版社, 1991.
- [19] 张云, 刘国栋, 欧峰, 等. 氯化镧对湖北钉螺的急性毒性研究[J]. 科技视界, 2014, 88(1): 19, 52.
- [20] 国家环境保护局. 环境监测技术规范. 第四册, 生物监测(水环境)部分[M]. 北京: 国家环境保护局, 1986.
- [21] HUANG Z H, GAO N, ZHANG S Y, et al. Investigating the toxicologically homogenous effects of three lanthanides on zebrafish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2022, 253: 109251.
- [22] 华东. 镧对稀有鮈急性、亚慢性及生理遗传毒性研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2017.
- [23] 邱逸忱. 氯化铈对稀有鮈急性、亚慢性及慢性毒性研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学, 2020.
- [24] FIGUEIREDO C, GRILLOTF, LOPES C, et al. Accumulation, elimination and neuro-oxidative damage under lanthanum exposure in glass eels (*anguilla anguilla*)[J]. *Chemosphere*, 2018, 206: 414-423.
- [25] 张贵生, 吴红松, 朱道玉, 等. 邻苯二甲酸二乙酯对鲤鱼鳃及消化道黏液细胞的影响[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2013, 33(5): 524-529.
- [26] HUA D, WANG J W, YU D H, et al. Lanthanum exerts acute toxicity and histopathological changes in gill and liver tissue of rare minnow (*gobiocypris rarus*) [J]. *Ecotoxicology*, 2017, 26(9): 1207-1215.
- [27] GRAVATO C, GUIMARAES L, SANTOS J, et al. Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*anguilla anguilla*) from the estuaries of minho, lima and douro rivers (nw portugal) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(4): 524-533.
- [28] 吉贵祥, 石利利, 刘济宁, 等. BDE-47对斑马鱼胚胎-幼鱼的急性毒性及氧化应激作用[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 731-736.

- [29] 胡勤海,胡志强,叶兆杰.稀土元素镧在草鱼体中的分布与积累[J].农业环境保护,1996(5): 218-220, 241.
- [30] KANG S, GUO C, XUE C Y, et al. Toxic effects of two representative rare earth elements (La and Gd) on *danio rerio* based on transcriptome analysis[J]. Toxics, 2022, 10(9): 519-627.
- [31] 张银杰,张洪昌,凌思源,等.壬基酚对斑马鱼不同组织中抗氧化酶活力的影响[J].生态毒理学报,2022, 17(2): 362-371.
- [32] 郭红岩,陈亮.低浓度镉暴露对鲫鱼肝脏多种酶活性的影响[J].南京大学学报(自然科学版),2001, 37(6): 665-670.
- [33] 卢然,倪嘉缵.稀土对肝脏作用的机制[J].中国稀土学报,2002, 20(3): 193-198.
- [34] NAGARANI N, DEVI V J, KUMARAGURU A K. Mercuric chloride induced proteotoxicity and structural destabilization in marine fish (*therapon jarbua*) [J]. Toxicological and Environmental Chemistry, 2011, 93(2): 296-306.
- [35] 郭婷,马园园,田鹏,等.铬暴露对草鱼的氧化损伤及抗氧化能力的影响[J].安徽农业科学,2012, 40(28): 13832-13834.
- [36] 刘占才,牛景彦,郭彦玲,等.汞暴露对草鱼氧化损伤及抗氧化能力的影响[J].浙江农业学报,2016, 28(7): 1148-1155.
- [37] 黄志斐,张喆,马胜伟,等.BDE209胁迫对翡翠贻贝(*perna viridis*)SOD、MDA和GSH的影响[J].农业环境科学学报,2012, 31(6): 1053-1059.
- [38] 赵巧雅,孙雪婧,王玲玲,等.铜对斑马鱼鳃的损伤及其作用机制[J].解剖学报,2018, 49(3): 367-373.
- [39] 单丹,钟欢,郭忠宝,等.重金属铜暴露对吉富罗非鱼组织残留及抗氧化酶活性的影响[J].南方农业学报,2016, 47(10): 1784-1789.
- [40] 岳鑫,杨爱江,徐鹏,等.锑胁迫对斑马鱼酶活性的影响研究[J].生物技术通报,2019, 35(6): 107-113.

(责任编辑:朱冬梅)

(上接第587页)

- [21] 吴志军,卢槐,翁磊,等.基于核磁共振实时成像技术的裂隙砂岩渗流特性研究[J].岩石力学与工程学报,2021, 40(2): 263-275.
- [22] 杨亮,杨永涛,郑宏.相场数值流形法模拟岩石裂纹扩展[J].岩土力学,2021,42(12): 3419-3427.
- [23] 李博,朱强,张丰收,等.基于矿物晶体模型的非均质性岩石双裂纹扩展规律研究[J].岩石力学与工程学报, 2021,40(6): 1119-1131.
- [24] 刘享华,张科,李娜,等.含孔双裂隙3D打印类岩石试件破裂行为定量识别[J].岩土力学,2021,42(11):3017-3028.
- [25] 李地元,万千荣,朱泉企,等.不同加载方式下含预制裂隙岩石力学特性及破坏规律试验研究[J].采矿与安全工程学报,2021,38(5): 1025-1035.
- [26] 刘鑫,许宏发,范鹏贤,等.围压下岩石填充裂隙对应力波衰减规律的试验研究[J].岩土力学,2021,42(8):2099-2108, 2119.
- [27] FAIRHURST C, HUDSON J. Draft ISRM suggested

method for the complete stress-strain curve for intact rock in uniaxial compression [J]. International Journal of Rock Mechanics and Mining Science & Geomechanics Abstracts, 1999,36(3): 279-289.

- [28] 金解放,梁晨,王杰,等.围压对红砂岩应力波频谱和频带能量特性的影响[J].有色金属科学与工程,2018, 9(4): 76-82.
- [29] 邝泽良,郑小龙,陈军,等.循环荷载作用下胶结充填体声发射特征试验研究[J].有色金属科学与工程,2017,8 (4): 91-97.
- [30] PAN P Z, MIAO S T, JIANG Q, et al. The influence of infilling conditions on flaw surface relative displacement induced cracking behavior in hard rock[J]. Rock Mechanics and Rock Engineering, 2020,53(10): 4449-4470.
- [31] HOU P Y, CAI M. Post-peak stress-strain curves of brittle hard rocks under different loading environment system stiffness[J]. Rock Mechanics and Rock Engineering, 2022, 55(7): 3837-3857.

(责任编辑:赵中波)